ผลกระทบต่อกลุ่มประชากรแบคทีเรียในดินบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

Effects of Transgenic Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus on Rhizosphere Bacterial Community

กษมา ชูสังข์[1,2], ปาริชาติ เบิร์นส[1,3]และ วิชัย โฆสิตรัตน[1,4]

Kasama Chusang[1,2], Parichart Burns[1,3]and Wichai Kositratana[1,4]

Abstract

Transgenic papaya resistant to papaya ringspot virus (PRSV), Khak Nual line 116/5 was investigated for the effect on the rhizosphere bacterial community under containment conditions. The attraction or repellent of rhizosphere bacteria to transgenic papaya was also evaluated using a satellite pot setting under greenhouse condition. The center pot, a diameter of 12 inches containing the native soil, was connected to six surrounded-pots with PVC tubes and filled with sterilized soils. Three of each, transgenic or non-transgenic papaya plants were individually planted in each pot by completely randomized design. Rhizosphere soil samples were taken every 30 days interval between papaya seedling state (60 days) and premature fruiting stage (210 days). Soil properties and bacterial population structure determined by using the community-level physiological profiles (CLPP) based on the utilization of 95 carbon sources were investigated. Bacterial population, diversity and species identification were also determined in order to evaluate the attracting or repelling effects of transgenic papaya to rhizosphere bacteria. The pH value, electrical conductivity, organic matter, major elements and minor elements content were not significantly different among soil samples. The CLPP results revealed that the population profiles of rhizosphere bacteria from transgenic papaya and non-transgenic papaya grown soils were grouped into the same cluster. Bacterial species and population obtained from both treatments were not different from each other. These results also lead to conclude that transgenic papaya neither attract nor repel rhizosphere bacteria and do not affect the rhizosphere bacteria ecology under the containment conditions.

Keywords: Transgenic papaya, Papaya ringspot virus, Community-level physiological profiles (CLPP), Biolog

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE)

[3] กลุ่มวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Plant Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[4] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง: พฤษภาคม 2550

*Corresponding author: agrwcl@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาผลกระทบที่มีต่อกลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แขกนวล 116/5 ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน(papaya ringspot virus, PRSV) ในสภาวะโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม ในกระถางขนาด 12 นิ้ว จำนวน 7 กระถาง วางกระถางในลักษณะดาวกระจาย ซึ่งกระถางกลางปลูกมะละกอดั้งเดิม ด้วยดินปลูกทั่วไป เชื่อมต่อกับกระถางรอบนอก 6 กระถาง ด้วยท่อ พีวีซี เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 12 นิ้ว ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม หรือ มะละกอดั้งเดิมในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ โดยวิธีสุ่ม กระถางละ 1 ต้นชนิดละ 3 ต้นรวมจำนวน 6 ต้นโดยการทดลองประกอบด้วย 4 ซ้ำ เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากทุก 30 วัน เริ่มจากระยะต้นกล้าที่มะละกออายุ 60 วัน จนถึงระยะที่มะละกอติดผลดิบอายุ 210 วัน มาตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในดิน รวมถึงศึกษาโครงสร้างกลุ่มประชากรแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา(community-level physiological profiles, CLPP) จากการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 95 ชนิด เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ การดึงดูด หรือขับไล่ ประชากรแบคทีเรียรอบราก ระหว่างของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอดั้งเดิม ผลการวิเคราะห์พบว่าคุณสมบัติทางเคมีของดิน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษา CLPP พบว่ากลุ่มประชากรแบคทีเรียรอบราก ระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และ มะละกอดั้งเดิมโดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน รวมถึงไม่พบความแตกต่างของปริมาณ และ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอ แสดงว่ามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลต่อการดึงดูด หรือ ขับไล่เชื้อแบคทีเรีย ที่เคลื่อนมาจากดินปลูกมะละกอดั้งเดิม ที่เชื่อมต่อไปยังกระถางปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่อยู่โดยรอบ ซึ่งจากผลการทดลองนี้สรุปผลได้ว่า การปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส PRSV ไม่มีผลกระทบต่อระบบนิเวศของแบคทีเรีย ที่อยู่บริเวณรอบรากมะละกอในสภาพโรงเรือนระบบปิด

คำนำ

นับตั้งแต่ที่มีการสร้างสายพันธุ์ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อโรคใบด่างของยาสูบ โดยการถ่ายยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส(coat protein gene) ของไวรัสใบด่างยาสูบ(tobacco mosaic virus, TMV) (Abel *et al*., 1986) ได้มีการนำเทคโนโลยีพืชดัดแปลงพันธุกรรม(transgenic plant) มาใช้พัฒนาพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดเพื่อให้มีลักษณะต้านทานต่อโรคพืช แมลงศัตรูพืช ตลอดจนต่อสารปราบวัชพืช เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด ฝ้าย คาโนลา ข้าว หัวบีท ข้าวสาลีและมีการปลูกเป็นการค้าตั้งแต่ พ.ศ.2539 จนถึงปัจจุบัน โดยในปี พ.ศ. 2552 มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อเป็นการค้าใน 25 ประเทศคิดเป็นเนื้อที่ถึง 837 ล้านไร่ และมีเกษตรกรที่เกี่ยวข้องในการเพาะปลูกมากถึง 14 ล้านคน (James, 2009)

มะละกอเป็นพืชที่คนไทยนิยมใช้บริโภคทั้งในรูปผลไม้และผัก โดยเฉพาะการแปรรูปเป็นอาหารหลัก ส้มตำ ซึ่งกลายเป็นอาหารทางด้านวัฒนธรรมของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ปัจจุบันการปลูกมะละกอในประเทศไทยประสบความเสียหายอย่างรุนแรง จากปัญหาโรคใบด่างวงแหวน ที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน (Papaya ringspot virus; PRSV) มีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกที่จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2518 และแพร่ระบาดมาในแหล่งปลูกมะละกอภาคกลาง และภาคอื่นๆทั่วประเทศไทย โรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจและสังคมอย่างร้ายแรง เนื่องจากมะละกอที่เป็นโรคนี้จะมีผลผลิตลดลงอย่างมาก ส่งผลให้เกษตรกรผู้ปลูกประสบปัญหาขาดทุนและบุกรุกเปิดป่าหาพื้นที่ปลูกใหม่เพื่อหนีการแพร่ระบาดของโรค ทำให้ศักยภาพการผลิตมะละกอของไทยลดลงอย่างมาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ได้

พัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานเชื้อไวรัส PRSV โดยการถ่ายชุดยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่(ภาพที่ 1) เข้าสู่เนื้อเยื่อมะละกอสายพันธุ์แขกนวล แล้วทำการคัดเลือกและตรวจสอบเลี้ยงพัฒนาจนได้ต้นมะละกอ ที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์และสามารถต้านทานต่อไวรัส PRSVได้ดี (Warin et al., 2003)

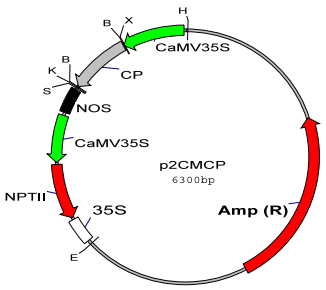
อย่างไรก็ตามพืชดัดแปลงพันธุกรรมยังคงเป็นสิ่งใหม่ของสังคมไทย ที่จะเข้ามาสู่ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งนักวิชาการบางส่วนเห็นว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจมีความเสี่ยงต่อความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น อาจกระตุ้นการสร้างสารที่เป็นพิษ สารก่อภูมิแพ้ หรือสารที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพเมื่อมีการสะสมในระยะยาว และอาจมีผลกระทบต่อระบบนิเวศของเชื้อจุลินทรีย์ในดิน เป็นต้น แม้จะยังไม่มีรายงานการพบผลกระทบใดๆ จากการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นการค้าที่มีมานานกว่า 10 ปีแล้วก็ตาม โดยมีการตั้งข้อสังเกตว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรม อาจมีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค และต่อสภาพแวดล้อมจึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาทดลองและหามาตรการป้องกัน หรือควบคุมความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นได้

การศึกษาทดลองครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงผลกระทบจากการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แขกนวล 116/5 ต่อระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากของพืช ภายใต้สภาวะโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยศึกษาเปรียบเทียบจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของดินที่ปลูก การดึงดูดหรือขับไล่ประชากรแบคทีเรีย จากบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยการวิเคราะห์เปรียบเทียบ ปริมาณชนิดของเชื้อแบคทีเรีย และโครงสร้างของกลุ่มประชากรแบคทีเรียจากคุณสมบัติทางสรีรวิทยา (community - level physiological profile) จากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ จำนวน 95 ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย(Garland and Mills, 1991)

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูกพืชทดลอง

การเตรียมดิน เพื่อใช้ในการปลูกมะละกอมีอัตราส่วนของดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ปุ๋ยหมัก : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 6:4:2:4 โดยปริมาตร ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนที่ 2 ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ออกแบบชุดกระถางทดลองที่เชื่อมต่อกันแบบดาวกระจาย เพื่อศึกษาความสามารถในการดึงดูดเข้าหา หรือขับไล่จุลินทรีย์บริเวณรอบรากมะละกอ โดยจัดวางกระถางปลูกพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ความสูงของกระถาง 14 นิ้ว เชื่อมต่อถึงกันระหว่างกระถางตรงกลาง



ภาพที่ 1 แสดงทิศทางและยีนของพลาสมิดดีเอ็นเอ P2CMCP ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่มะละกอ ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ 35S จากเชื้อไวรัส cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) ยีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (CP) ส่วนของ terminator จากเชื้อแบททีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* (NOS) ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (NPTII) และ terminator จากยีน 35SCaMV (35S) ของเชื้อไวรัส cauliflower mosaic virus (Warin et al., 2003)

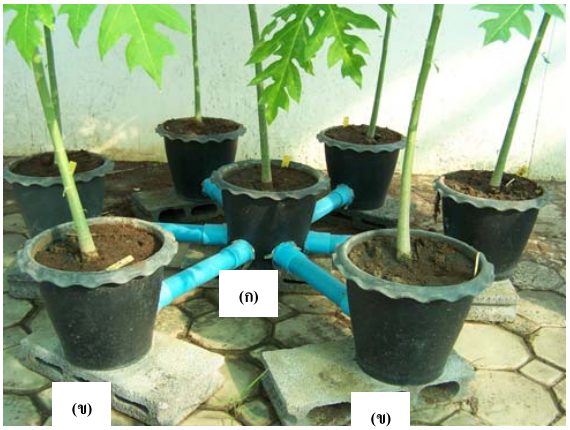
ด้วยท่อพลาสติก PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 12 นิ้ว ซึ่งกระถางกลางใส่ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ กระถางรอบนอกปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (GM) หรือ ปลูกด้วยมะละกอดั้งเดิม (Non-GM) ในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ โดยวิธีสุ่ม กระถางละ 1 ต้น ชนิดละ 3 ต้น รวมจำนวน 6 ต้นโดยการทดลองประกอบด้วย 4 ซ้ำ (replication) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียรอบรากมะละกอ เก็บตัวอย่างดินลึกจากผิวหน้าดิน 15 เซนติเมตร ด้วยอุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน (auger) นำตัวอย่างดินของทั้ง 3 กระถางของกรรมวิธีเดียวกันมาผสมคลุกเคล้ากันเป็น 1 ตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลอง โดยเก็บผลจาก 4 ชุดการทดลอง (4 ซ้ำ) เริ่มเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำไปวิเคราะห์ทุกๆ 30 วัน โดยเริ่มจากระยะต้นกล้าหลังย้ายปลูกเป็นเวลา 60 วัน จนถึงอายุ 210 วัน ที่เป็นระยะที่มะละกอติดผลดิบ

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดิน

ละลายดินกับน้ำในอัตราส่วน (1:1) แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity, EC)(ds/m) เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ ค่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ โดยส่งตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ดิน ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์จุลินทรีย์

ตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรีย บริเวณรอบรากมะละกอ เปรียบเทียบระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอพันธุ์ดั้งเดิม โดยนำตัวอย่างดินรอบรากมะละกอจำนวน 5 กรัมมาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปล่อยให้สารละลายดินตกตะกอน ดูดส่วนใสของสารละลายดินมาทำการเจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับขั้น (ten - fold serial dilution)ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-5} แล้วจึงนำสารละลายดินจำนวน 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NGA) (Schaad *et al*., 2001) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนี เก็บโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate ตรวจดูเชื้อแบคทีเรีย โดยย้อมสีแกรม (Gram's staining)



ภาพที่ 2 การทดสอบผลกระทบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต่อเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบราก โดยปลูกมะละกอดั้งเดิมด้วยดินจากแปลงปลูกมะละกอในกระถางที่อยู่ตรงกลาง(ก) ซึ่งเชื่อมต่อกับกระถางทดสอบรอบนอกแบบดาวกระจาย (ข) ที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อ และสุ่มปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมกับมะละกอดั้งเดิมชนิดละ 3 กระถาง

นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อบนอาหารแข็ง NA สำหรับเชื้อแกรมลบ หรือบนอาหาร BUG agar (Biolog™)สำหรับเชื้อแกรมบวก เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อการตรวจจำแนกชนิดด้วยระบบ Biolog™ (Biolog, Inc., Hayward, Calif., USA) จากการใช้แหล่งคาร์บอนจำนวน 95 ชนิดของเชื้อ โดยนำเชื้อมาละลายแขวนลอยด้วย inoculation fluid วัดและปรับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงตามคำแนะนำของผู้ผลิต ใส่ลงในถาดอาหารโดยแบคทีเรียแกรมลบ จะเติมลงในอาหาร GN2 MicroPlate™ และเชื้อแกรมบวกเติมลงในอาหาร GP2 MicroPlate™ในปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มถาดเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16-24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectro photometer (Vmax, Molecular Devices, Oxford, UK) นำข้อมูลที่ได้ วิเคราะห์ผลร่วมกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม MicroLog™ 2 System, database version 4.2 (Biolog, Inc., Hayward, Calif., USA) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

การจำแนกกลุ่มโครงสร้างประชากรแบคทีเรียด้วยความแตกต่างทางสรีรวิทยา(Community-level Physiological Profiles, CLPP)

การศึกษา Community-level physiological profiles(CLPP) เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ โดยใช้ความแตกต่างทางสรีรวิทยาของประชากรจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการประเมินผลกระทบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ที่มีต่อประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบราก อาศัยความสัมพันธ์ระหว่างพืชและแบคทีเรียบริเวณรอบรากที่จะแตกต่างกันไป ตามชนิดของพืชและแหล่งอาหารจากบริเวณรอบรากพืช(Lynch and Whipps, 1990) นำมาประยุกต์ เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบราก โดยการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 95 ชนิด ด้วยถาดอาหารสำเร็จรูป Biolog GN2 MicroPlate โดยเตรียมสารละลายดินจากบริเวณรอบรากให้มีความเข้มข้น 10^{-5} เติมลงในถาดอาหาร GN2 ในปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียใช้แหล่งคาร์บอนที่เคลือบอยู่ จากนั้นวัดการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนของกลุ่มแบคทีเรียทำให้สาร tetrazolium dye ที่เติมไว้ถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็นสีม่วง และตรวจวัดสีด้วยเครื่อง spectrophoto meter ที่ความยาวคลื่นแสง 590 นาโนเมตร นำค่าความเข้มของสีที่วัดได้ ไปคำนวณหาค่าเฉลี่ยในการเกิดสี (Average Well Color Development(AWCD)) ตามวิธีการของ Garland and Mills (1991)

คำนวณค่าเฉลี่ย Average Well Color Development(AWCD) ของแต่ละแหล่งคาร์บอนโดยใช้สูตร

$$AWCD = C\text{-}R/\{[\Sigma(C\text{-}R)]/95\}$$

โดยนำค่าที่วัดได้จากการเกิดสี (C) ของตัวอย่างเชื้อในดิน หักออกด้วยค่าที่วัดได้จากการเกิดสีของน้ำ หรือตัวอย่างมาตรฐาน (R) หารด้วยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้งหมด 95 แหล่ง ดังสูตร จากนั้นนำค่า AWCD ที่ได้จากการวัดในทุกช่วงเวลาข้างต้นมาวิเคราะห์ ร่วมกับสายพันธุ์มะละกอ, แหล่งคาร์บอน และ ระยะเวลาต่างๆในการใช้แหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน 11 กลุ่ม 95 ชนิด คือ Carbohydrates, Carboxylic acids, Amino acids, Amines, Amides, Alcohols, Aromatic chemical, Esters, Polymers, Phosphorylated chemicals, Brominated chemicals ที่เคลือบอยู่ใน GN2 plate โดยการวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปรด้วยวิธี Principle component analysis (PCA) และใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เพื่อจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรีย เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม กับ มะละกอดั้งเดิม ในช่วงระยะเวลาต่างๆ หลังการปลูก

ผลและวิจารณ์

1. คุณสมบัติทางเคมีของดิน

ผลการวิเคราะห์ทางเคมีของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) ค่าการนำไฟฟ้า(Electrical conductivity, EC) ปริมาณอินทรียวัตถุ ธาตุอาหารหลักและรองในระยะ

ต้นกล้า(เดือนที่ 1และ2) ระยะออกดอก (เดือนที่ 3และ4) และระยะติดผลดิบ(เดือนที่ 5 และ 6) พบว่าในดินที่ปลูกมะละกอมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.11-5.52 ค่าการนำไฟฟ้า (EC) อยู่ในช่วง 0.882-1.617 dS/m ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในช่วง 6.31-8.39 เปอร์เซนต์ ค่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด 0.115-0.141 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในช่วง 205.72-384.49 mg/kg ปริมาณโพแทสเซียมอยู่ในช่วง 232.07-324.73 mg/kg ปริมาณแคลเซียมอยู่ในช่วง 2481.68-3385.28 mg/kg ปริมาณแมกนีเซียมอยู่ในช่วง 314.70-374.17 mg/kg (ตารางที่ 1) จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติดิน พบว่า ค่า pH จัดอยู่ในสภาพมีความเป็นกรด ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณของอินทรียวัตถุในดินสูงมาก(Suwanvesh., 1996) ค่าการนำไฟฟ้าของดินอยู่ในระดับต่ำแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณสารละลายเกลือน้อย จัดว่าเป็นประเภทดินไม่เค็ม ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูง ปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม ที่เป็นประโยชน์มีปริมาณสูงถึงสูงมากอีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ดินด้วยวิธีทางสถิติ T-test นั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Hsieh and Pan (2006) ที่ไม่พบผลกระทบของการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอต่อคุณสมบัติทางเคมีของดิน

2. ปริมาณและชนิดของแบคทีเรีย

จากการตรวจสอบหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบราก ในดินที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอดั้งเดิมในทุกๆเดือน พบว่ามีปริมาณเชื้อที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตัวอย่างดินจากกระถางที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอดั้งเดิม หลังปลูก 60-210 วัน มีค่าเฉลี่ยรวมของปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง $4.21\pm2.1x10^{6}$ CFU/g และ $4.21\pm1.89x10^{6}$CFU/g ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละระยะที่เก็บตัวอย่างดิน (ตารางที่ 2) เมื่อวิเคราะห์จำแนกเชื้อจากตัวอย่างดินทั้ง 2 แหล่ง (GM และ Non-GM) พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 33 ชนิด (species) ที่จำแนกได้(ตารางที่ 3) ซึ่งตรวจพบทั้งจากในดินที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าในดินที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลทำให้เกิดการดึงดูดหรือขับไล่จุลินทรีย์ โดยทั้งปริมาณจุลินทรีย์ และชนิดของจุลินทรีย์ในดินรอบรากที่ตรวจพบไม่แตกต่าง ไปจากในดินของมะละกอดั้งเดิม ที่ใช้เป็นชุดเปรียบเทียบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Phironrit et al.(2006) ที่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ในดินที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แขกนวล 116/5 ในรุ่นที่ 1 กับมะละกอดั้งเดิม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hsieh and Pan (2006) ที่รายงานว่าไม่พบผลกระทบของการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ต้านทานต่อเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอต่อปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในดินรอบราก

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดินปลูกมะละกอในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโต

ระยะการเจริญเติบโต	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ค่าการนำไฟฟ้า (dS/m)	ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (%)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)	ปริมาณฟอสฟอรัส (mg/kg)	ปริมาณโพแทสเซียม (mg/kg)	ปริมาณแคลเซียม (mg/kg)	ปริมาณแมกนีเซียม (mg/kg)
ระยะต้นกล้า								
Non-GM[1]	5.41	1.11	7.26	0.109	205.72	232.07	2751.75	341.37
GM[1]	5.42	0.88	8.40	0.12	252.19	247.67	2808.48	354.28
ระยะออกดอก								
Non-GM[1]	5.2	1.51	6.65	0.12	333.46	324.73	3385.28	374.17
GM[1]	5.17	1.52	6.32	0.12	384.49	315.79	2481.69	335.04
ระยะผลดิบ								
Non-GM[1]	5.11	1.62	6.58	0.12	298.21	319.19	2561.79	333.93
GM[1]	5.52	0.97	8.23	0.14	381.83	271.04	2595.76	314.70
CV%	3.38	26.25	13.28	7.37	18.54	13.99	9.09	4.15
T-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[1]Non-GM ดินปลูกมะละกอดั้งเดิม, GM ดินปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

NS ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 2 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย ในดินบริเวณรอบรากมะละกอ ในช่วงระยะเวลาต่างๆหลังการปลูก

	ปริมาณเชื้อ($x10^6$) CFU/g					
ชนิดดิน[1]	60 วัน	90 วัน	120 วัน	150 วัน	180 วัน	210 วัน
Non-GM	4±0.37	4±0.89	4±0.66	4±0.45	4±0.27	4±0.41
GM	4±0.42[b]	4±0.77	4±0.44	4±0.47	4±0.45	4±0.37
T-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[1]Non-GM ดินปลูกมะละกอดั้งเดิม, GM ดินปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม

NS ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียในดินบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม(GM) และมะละกอดั้งเดิม (Non-GM) ที่จำแนกเชื้อด้วยระบบ Biolog™

ลำดับ	หมายเลขสายพันธุ์เชื้อ[1]	ชนิดของเชื้อที่จำแนก[2]	การติดสีแกรม
1	2GM3, 17Non-GM1	*Pseudomonas viridilivida*	ลบ
2	22GM7, 9Non-GM3	*Sphingobacterium thalpophilum*	ลบ
3	23GM7, 16Non-GM4	*Pseudomonas citronellolis*	ลบ
4	3GM4, 2Non-GM2	*Achomobacter cholinophagum*	ลบ
5	13GM3, 3Non-GM6	*Pseudomonas nitroreducens (P. azelaica)*	ลบ
6	4GM3, 15Non-GM3	*Serratia marcescens*	ลบ
7	14GM3, 15Non-GM3	*Enterobacter aerogenes*	ลบ
8	6GM5, 16Non-GM4	*Pseudomonas fluorescens biotype* G	ลบ
9	5GM7, 18Non-GM4	*Pseudomonas fulva*	ลบ
10	8GM6, 1Non-GM6	*Pantoea dispersa*	ลบ
11	6GM5, 2Non-GM6	*Pseudomonas maculicola*	ลบ
12	3GM2, 9Non-GM3	*Chryseobacterium scophthalmum*	ลบ
13	3GM4, 10Non-GM7	*Pseudomonas boreopolis (Stenotrophomonas)*	ลบ
14	13GM4, 17Non-GM7	*Cardiobacterium hominis*	ลบ
15	1GM5, 12Non-GM7	*Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*	ลบ
16	3GM7, 14Non-GM7	*Burkholderia cepacia*	ลบ
17	1GM5, 18Non-GM5	*Pectobacterium cypripedii*	ลบ
18	8GM6, 15Non-GM3	*Empedobacter brevis*	ลบ
19	1GM3, 16Non-GM4	*Burkholderia pyrrocinia*	ลบ
20	14GM3, 15Non-GM2	*Acidovorax delafieldii*	ลบ
21	1GM1, 16Non-GM4	*Microbacterium testaceum*	บวก
22	2GM6, 4Non-GM3	*Staphylococcus saprophyticus*	บวก
23	1GM5, 19Non-GM5	*Staphylococcus warneri*	บวก
24	4GM5, 14Non-GM5	*Staphylococcus arlettae*	บวก
25	3GM3, 5Non-GM3	*Arthrobacter ilicis*	บวก
26	10GM3, 12Non-GM3	*Gordonia rubripertincta*	บวก
27	16GM7, 3Non-GM6	*Rhodococcus australis*	บวก
28	4GM7, 17Non-GM4/2	*Pediococcus pentosaceus*	บวก
29	3GM4, 17Non-GM	*Clavibacter agropyri*	บวก
30	8GM4, 13Non-GM7	*Corynebacterium urealyticum*	บวก
31	9GM6, 21Non-GM7	*Cellulosimicrobium cellulans*	บวก
32	7GM6, 15Non-GM3	*Kocuria rosea*	บวก
33	10GM4, 13Non-GM7	*Bacillus megaterium*	บวก

[1]หมายเลขสายพันธุ์แสดงโดยหมายเลขเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างตามด้วยกรรมวิธีทดลองและครั้งที่ของการเก็บตัวอย่าง เช่น 2GM3 หมายถึงเชื้อชนิดที่ 3 แยกได้จากดินปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมจากการเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 3

[2]จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็วด้วยระบบ Biolog™ เพียงอย่างเดียวเท่านั้น

3. กลุ่มโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (Community-level physiological profiles, CLPP)

จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรีย ที่จำแนกโดยความแตกต่างทางสรีรวิทยา (CLPP) กลุ่มประชากรแบคทีเรียในดินปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม(วงกลมดำ) และมะละกอดั้งเดิม (วงกลมสีขาว) ตั้งแต่ระยะต้นกล้าหลังการย้ายปลูก 60 วัน จนถึงระยะติดผลดิบ(210 วัน) มีกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่เกาะกลุ่มใกล้ชิดกัน ซึ่งระยะตำแหน่งของสัญลักษณ์จะแสดงความใกล้เคียงในการใช้แหล่งคาร์บอน

จากตัวอย่างดินที่ปลูกมะละกออายุ 60 วัน(ระยะต้นกล้า) มีกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมจัดกลุ่มออกเป็นสองกลุ่ม ซึ่งประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมนั้นเกาะกลุ่มกันเป็นส่วนใหญ่ มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรีย บริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แยกกลุ่มออกไป(ภาพที่ 3ก) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ กราฟที่ได้มีค่า Variance เท่ากับ 24.81% และ 13.64% ตามลำดับ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ Bromosuccinic-acid, Urocanic-acid, Carboxylic acids, D-Galacturonic-acid, D,L-Lactic acid, μ-Inositol, Acetic acid, cis-Aconitic acid, beta-hydroxybutyric-acid, gamma-hydroxybutyric-acid, Succinic acid, Pyruvic acid methyl ester, D-Gluconic acid แต่มีค่าสหสัมพันธ์ correlation (r^2) 0.897

จากตัวอย่างดินที่ปลูกมะละกอระยะต้นกล้า (อายุ 90 วัน) พบว่าประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ จัดกลุ่มออกเป็นสองกลุ่ม ซึ่งประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมส่วนใหญ่เกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่แยกกลุ่มออกไป(ภาพที่ 3ข) โดย Component ที่ 1และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอปกติ แสดงค่า Variance เท่ากับ 41.6% และ 14.41% ตามลำดับ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ L-Fucose, Phenyethylamine, Putrescine, D-L-Lactic acid, cis-Aconitic acid, alfa-Keto glutaric acid, beta-Hydroxybutyric acid, Quinic acid, L-Proline, gamma-Aminobutyric acid, Succinic acid, L-Asparagine แต่มีค่าสหสัมพันธ์ correlation (r^2) 0.938

จากตัวอย่างดินปลูกมะละกออายุ 120 วัน (ระยะติดดอก) พบว่าส่วนใหญ่ประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมเกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม บางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป(ภาพที่ 3ค) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอดั้งเดิม แสดงค่า Variance เท่ากับ 57.15% และ 13.41% ตามลำดับ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ L-Arabinose, alfa-D-Glucose, Tween-80, D-Melibiose, 2,3-Butanediol, D,L-Lactic acid, D-Fructose, Glucuronamide, alfa-Ketovaleric acid, L-Fucose, Turanose แต่มีค่าสหสัมพันธ์ correlation (r^2) 0.917

จากตัวอย่างดินปลูกมะละกออายุ 150 วัน (ระยะติดดอก) พบว่าส่วนใหญ่ของประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมเกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม บางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป(ภาพที่ 3ง) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอดั้งเดิม กราฟที่ได้มีค่า Variance เท่ากับ 43.7% และ 13.13 % ตามลำดับ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ Glycogen, alfa-Ketoglutaric acid, D-Gluconic acid, L-Glutamic acid แต่มีค่าสหสัมพันธ์ correlation (r^2) 0.933

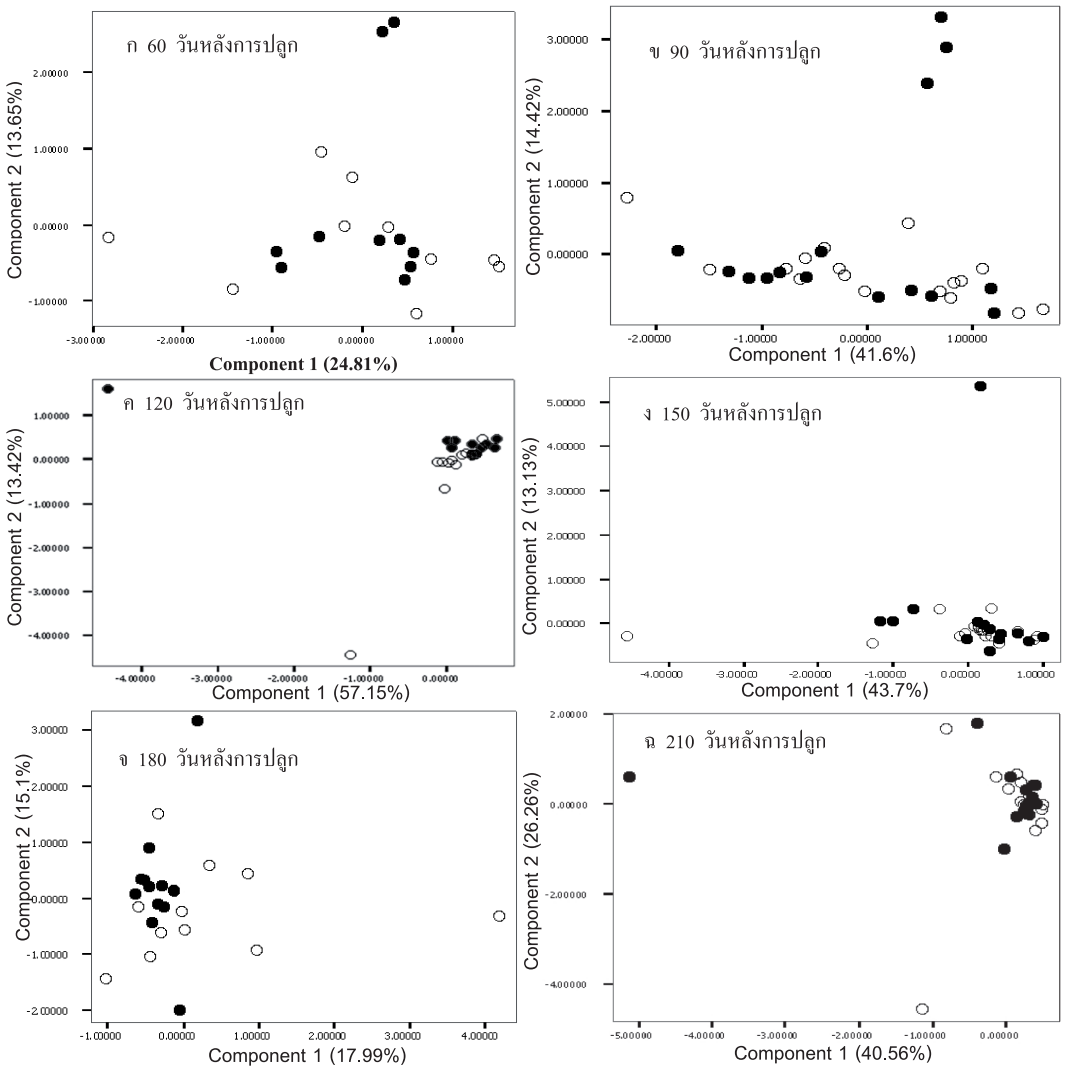
จากตัวอย่างดินปลูกมะละกออายุ 180 วัน (ระยะติดผลดิบ) พบว่าส่วนใหญ่ของประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม

เกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม บางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป(ภาพที่ 3จ) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอ แสดงค่า Variance เท่ากับ 17.99%และ 15.07 % ตามลำดับ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ L-Aspartic acid, alfa-Ketoglutaric acid, L-Pyroglutamic acid, Putrescine, Malonic acid, D,L-Carnitine แต่มีค่าสหสัมพันธ์ correlation (r^2) 0.922

จากตัวอย่างดินปลูกมะละกออายุ 210 วัน (ระยะติดผลดิบ) พบว่าส่วนใหญ่ของประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมเกาะกลุ่มกัน มีเพียงบางส่วนของกลุ่มประชากรแบคทีเรียมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอดั้งเดิมบางส่วนที่แยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 3ฉ) โดย Component ที่ 1 และ 2 ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม แสดงค่า Variance เท่ากับ 40.56% และ 26.26% ตามลำดับ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ Tween-80, D-Galacturonic acid, D-Saccharic acid, Citric acid, alfa-Keto-glutaric acid, Quinic acid, L-Asparagine, D,L-Lactic acid, D-Alanine, Putrescine แต่มีค่าสหสัมพันธ์ correlation (r^2) 0.872

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ารูปแบบ (profile) ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณดินรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอดั้งเดิม ในแต่ละช่วงอายุของการปลูกมะละกอทั้งสองกลุ่มนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษาของ Kongsawat(2010) ที่พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์นี้ (116/5 R4) กับมะละกอดั้งเดิม ไม่มีความแตกต่างของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งไม่พบการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส(PRSV-CP) พบเพียงการแสดงออกของยีน *nptII* เท่านั้น ซึ่งเป็นยีนที่ European Food Safety Authority (2007) ให้การรับรองว่าเป็นยีนต้านทานสารปฏิชีวนะในกลุ่มที่ 1 ที่มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ และสามารถพบยีนนี้ในแบคทีเรียที่อยู่ในดินโดยทั่วไป ซึ่งการพบว่าโปรตีนที่แสดงออกในมะละกอทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่าง จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้ไม่พบว่ามะละกอดัดแปลงพันธุกรรม มีผลต่อการดึงดูดหรือขับไล่เชื้อจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช ซึ่งเป็นผลให้ไม่พบความแตกต่างของโครงสร้างกลุ่มประชากรเชื้อแบคทีเรีย บริเวณรอบราก แต่หากเปรียบเทียบรูปแบบของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในช่วงระหว่างการเจริญเติบโตของมะละกอ (ภาพที่ 3) จะพบรูปแบบการจัดกลุ่มประชากรแบคทีเรีย ที่แตกต่างกันของทั้งในตัวอย่างดินจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม อาจเนื่องมาจากปัจจัยภายนอกที่ผันแปรได้ในแต่ละช่วงการเก็บตัวอย่าง เช่น สารที่ปลดปล่อยจากรากที่มีความแตกต่างกัน ในแต่ละช่วงการเจริญของพืช อุณหภูมิภายในโรงเรือนปลูกพืช ขนาดของกระถางที่จำกัด และปริมาณความชื้น เป็นต้น (Grayston *et al*., 2004)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Hsieh and Pan (2006) ที่ศึกษาผลกระทบของการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคใบด่างวงแหวนต่อจุลินทรีย์ในดินด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา เช่น AFLP, ARDRA, T-RFLP และ DGGE ซึ่งพบว่า รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากดินที่ปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมมีความเหมือนกันสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า ประชากรจุลินทรีย์รอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเช่นเดียวกันกับการศึกษาในมันฝรั่ง ที่มีการถ่ายยีน cystatin (cysteine proteinase inhibitor) เพื่อให้มันฝรั่งต้านทานต่อไส้เดือนฝอยซึ่งเป็นศัตรูพืช ไม่พบว่ามีผลกระทบต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในดิน เมื่อศึกษาวิเคราะห์ด้วยวิธี Phospholipid fatty acid analysis (PLFA) (Cowgill *et al*., 2002) ต่างจากรายงานของ Donegan *et al*., (1995) ที่ศึกษาในฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรมที่ถ่ายยีนโปรตีนพิษของเชื้อ Bt พบว่ากลุ่มประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบราก มีความแตกต่างไปจากฝ้ายพันธุ์ดั้งเดิม



ภาพที่ 3 การวิเคราะห์กลุ่มโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม (วงกลมดำ) และมะละกอดั้งเดิม (วงกลมขาว) ในระยะต่างๆ หลังการปลูก ด้วยลักษณะสรีรวิทยา (community-level physiological profiles, CLPP) โดยการวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร ด้วยวิธี Principal component analysis (PCA)

สรุป

การประเมินผลกระทบ ของการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์แขกนวล 116/5 ต่อระบบนิเวศของแบคทีเรียรอบราก เปรียบเทียบกับมะละกอดั้งเดิม ในสภาพโรงเรือน โดยปลูกมะละกอในกระถางที่เชื่อมต่อแบบดาวกระจาย จากกระถางกลางที่ปลูกมะละกอดั้งเดิมในดินที่ไม่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็นแหล่งแพร่กระจายแบคทีเรียไปยังกระถางรอบนอก ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) ค่าการนำไฟฟ้า(EC) ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณธาตุอาหารหลักและปริมาณธาตุอาหารรอง เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างดินจากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และมะละกอดั้งเดิม พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ และชนิดของเชื้อแบคทีเรียรอบรากมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม และ

มะละกอดั้งเดิมในช่วงระยะ เวลาต่างๆ ตั้งแต่มะละกออายุ 60 วันหลังการย้ายปลูก (ระยะต้นกล้า) จนถึงระยะที่มะละกอมีอายุ 210 วัน (ระยะติดผลดิบ) ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลต่อการชักนำ หรือการขับไล่เชื้อแบคทีเรียที่มาจากกระถางกลาง

การประเมินกลุ่มโครงสร้างประชากร ของแบคทีเรีย ด้วยคุณสมบัติทางสรีรวิทยา(CLPP) จากดินปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม เปรียบเทียบกับจากดินปลูกมะละกอดั้งเดิม โดยดูจากความแตกต่างของการใช้แหล่งคาร์บอนของกลุ่มประชากร พบว่าจุลินทรีย์จากมะละกอทั้งสองกลุ่มมีความใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ โดยมีค่าสหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.872 ถึง 0.938

ในการศึกษานี้ ได้เปรียบเทียบจำนวนและชนิดของเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งโครงสร้างกลุ่มประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิค CLPP เพื่อประเมินผลกระทบของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าการปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อไวรัส PRSV และต้านทานต่อโรคใบด่างวงแหวน ไม่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรอบๆรากพืช ในสภาวะการปลูกพืชในโรงเรือนระบบปิด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี(สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) กระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อดำเนินงานวิจัยนี้ทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

Abel P.P, R.S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S.G.Roger, R.T. Fraley and R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232:738-743.

Cowgill, S.E., R.D. Bardgett, D.T. Kiezebrink and H.J. Atkinson. 2002. The effect of transgenic nematode resistance on non-target organisms in the potato rhizosphere. J. Appl. Ecol. 39:915-923.

Donegan, K.K., C.J. Palm, V.J. Fieland, L.A. Porteous, L.M. Ganio, D.L. Schaller, L.Q. Bucao and R.J. Seidler. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* endotoxin. Appl. Soil Ecol. 2:111-124.

European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the Safe Use of the *nptII* Antibiotic Resistance Marker Gene in Genetically Modified Plants. European Food Safety Authority. Available Source:http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620775641.htm, December, 2009.

Garland, J.L. and A.L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol. 57:2351-2359.

Grayston, S.J., C.D. Campbell, R.D. Bardgett, J.L. Mawdsley, C.D. Clegg, K. Ritz, B.S. Griffiths, J.S. Rodwell, S.J. Edwards, W.J. Davies, D.J. Elston and P. Millard. 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. Appl. Soil. Ecol. 25:63-84.

Hsieh, Y.-T. and T.-M. Pan. 2006. Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity. J.Agric. Food Chem. 54:130-137.

James, C. 2009. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. *ISAAA* Briefs No.41. ISAAA: Ithaca, NY.

Kongsawat, C. 2010. Study of novel proteins and proteomics of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus. Ph.D. Thesis, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok, 187 p. (in Thai)

Lynch, J. M. and J. M. Whipps. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. Plant and Soil 129:1-10.

Phironrit, N., S. Chowpongpang, W. Kositratana, and S. Attathom. 2006. Assessment of soil microbes in rhizospheres of transgenic papayas grown in small scale field. Agricultural Sci.J. 37:407-413. (in Thai)

Rasmann, S., T.G. Kollner, J. Degenhardt, I. Hiltpold, S. Toepfer, U. Kuhlmann, J. Gershenzon and T.C.J. Turlings. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. Nature 434:732-737.

Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Suwanvesh. T. 1996. Soil Chemistry. Department of Soil Sciences, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok. (in Thai)

Warin, N., S. Chowpongpang, A. Bhunchoth, K. Romayanon, R. Rodaree, W. Kositratana, and S. Attathom. 2003. New papaya cultivars for papaya ringspot virus resistance. Proceedings of 41th Kasetsart University Annual Conference: Plants, Agricultural Extension and Communication. Kasetsart University, Bangkok, 3-7 February 2003, Bangkok, p539-546. (in Thai)