# การประเมินอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรม

# Allelopathic Assessment of Transgenic *Dendrobium* Sonia Bom 17

ชมภูนุช ลิ้มประสาท[1], สนธิชัย จันทร์เปรม[1,2], พรศิริ เลี้ยงสกุล[2] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,3*]

Chompunut Limprasat[1], Sontichai Chanprame[1,2], Ponsiri Liangsakul[2] and Sermsiri Chanprame[1,3*]

**Abstract**

Allelopathic assessment on transgenic plant is one of the key elements in environmental biosafety assessment prior to the adoption of transgenic plant for commercial release. Allelopathic effect of transgenic *Dendrobium* Sonia 'Bom 17' transformed with antisense papaya *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* (*CPACO*) on germination and growth of lettuce by sandwich method, soil germination method and high performance liquid chromatography were evaluated. The results showed that there was no negative allelopathic effect of transgenic orchid lines on germination and growth of lettuce. The HPLC chromatogram pattern of phenolic compounds from leaf and flower of transgenic and non-transgenic orchid lines are also similar.

**Keywords** : allelopathic effect, biosafety, transgenic orchid, sequential crop, sandwich method

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140 และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[2] ภาควิชาพืชไร่นา และ [3]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[2] Department of Agronomy and [3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : พฤศจิกายน 2557

* Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

## บทคัดย่อ

การประเมินผลทางอัลลิโลพาธีของพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นวิธีการหนึ่งในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ ซึ่งมีส่วนสำคัญเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพธรรมชาติ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลทางอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งได้รับการถ่ายยีน antisense *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* (*CPACO*) จากมะละกอ ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ด้วยเทคนิค sandwich method, soil germination method และ high performance liquid chromatography (HPLC) ผลการทดลองพบว่า กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม เมื่อเปรียบเทียบกับกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และรูปแบบโครมาโทแกรมของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในส่วนของใบและดอกของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมีความคล้ายคลึงกันกับในกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน


## คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และพบว่ามีการกระจายทั่วไปในทวีปเอเชีย ยุโรป และออสเตรเลีย มากกว่า 1,100 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การผลิตกล้วยไม้ส่งออกยังมีข้อจำกัดด้านคุณภาพของดอก อายุการใช้งาน หรืออายุการปักแจกันที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในธุรกิจการค้าขายไม้ดอก เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจึงมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาคุณภาพผลผลิต ดังเช่นพบการยืดอายุปักแจกันในคาร์เนชัน (Bovy *et al*., 1999; Kosugi *et al*., 2000) เบญจมาศ (Shinoyama *et al*., 2003; Shinoyama *et al*., 2006) และ Koto (2006) ได้ถ่ายยีน antisense *ACC oxidase* (*ACO*) จากมะละกอ เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ซึ่งมีผลทำให้กล้วยไม้มีอายุการปักแจกันนานขึ้น เนื่องจากการลดกิจกรรมของเอนไซม์ ACC oxidase ทำให้การผลิตเอทิลีนลดลง ในปัจจุบัน ประเทศสหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา เป็นผู้นำในการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมและมีการยอมรับให้ผลิตทางการค้าได้ (James, 2013) แต่พืชดัดแปลงพันธุกรรมยังไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคบางกลุ่ม รวมทั้งข้อกังวลถึงผลกระทบทางสภาพแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้น ทำให้ประเทศไทยยังไม่อนุญาตให้มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์ ดังนั้น การตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมอย่างสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพจึงเป็นกระบวนการที่สำคัญ

อัลลิโลพาธี (allelopathy) เป็นปรากฏการณ์ซึ่งสิ่งมีชีวิต อาทิ พืชและจุลินทรีย์ ผลิตสารเคมี (allele chemicals) ที่อาจมีผลทั้งในด้านสนับสนุนและยับยั้งการเจริญเติบโตและพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ที่อยู่ใกล้เคียง (Rice, 1984; Joung and Chung, 2000) การทดสอบผลทางอัลลิโลพาธี เป็นวิธีการหนึ่งในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม โดยศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมและสิ่งมีชีวิตที่อยู่รอบๆ โดยใช้เทคนิคต่างๆ อาทิ sandwich method และ soil germination method ซึ่งมีการรายงานโดย Kikuchi *et al*. (2009) และการเปรียบเทียบรูปแบบโครมาโทแกรมของ HPLC ซึ่งมีรายงานการศึกษาผลทางอัลลิโลพาธีในพืชหลายชนิด เช่นพืชที่มีสรรพคุณทางยา (Fujii *et al*., 2003; Morikawa *et al*., 2012) ยูคาลิปตัส (Kikuchi *et al*., 2009) และกุหลาบ (Nakamura *et al*., 2011)

การศึกษาวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของกิจกรรมทางอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* ที่มีต่อพืชทดสอบ คือ ผักกาดหอม เปรียบเทียบกับผลการศึกษาในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธี sand wich method และ soil germination method รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิก

โดยใช้ HPLC เนื่องจากมีรายงานการใช้กล้วยไม้สกุลหวายเป็นยาสมุนไพร และมีรายงานว่าสารทุติยภูมิหลักที่มีสรรพคุณทางยาคือกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Yang, *et al.* 2006; Zhang, *et al.* 2006)

## อุปกรณ์และวิธีการ

พืชที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย กล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุม (ABC) และกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งเกิดจากการถ่ายยีน antisense *CPACO* จากมะละกอ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ได้จากงานวิจัยของรักชนก ในปี 2549 (Koto, 2006) จำนวน 4 สายต้น โดย สายต้น AB1 และ สายต้น AB2 ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 1301a*ACO1* ที่มียีน *ACO1* วางตัวแบบ antisense สายต้น AB3 และ สายต้น AB4 ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 13121a*ACO2* ที่มียีน *ACO2* วางตัวแบบ antisense

### การศึกษาผลทางอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมต่อการงอกของผักกาดหอมทดสอบด้วยวิธี sandwich method

ศึกษาผลทางอัลลิโลพาธีต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูกตามหลัง (sequential crop) ในกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในการทดลองนี้สุ่มตัวอย่างกล้วยไม้สายต้นละ 5 ต้น โดยใช้ตัวอย่างใบแก่ใบล่างสุดในลำที่มีอายุมากที่สุด และตัวอย่างดอกบานโดยสุ่มคละจากดอกที่บาน 5 ดอกในแต่ละช่อ นำมาอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Fujii *et al.* (2003) โดยใส่ตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดหยาบ ลงใน multi-dish plate ชนิด 6 หลุม ตัวอย่างละ 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อหลุม เติมอาหารวุ้นที่หลอมละลายความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน multi-dish plate ซึ่งจะทำให้ตัวอย่างพืชลอยขึ้นมาที่ผิวหน้าวุ้น ปล่อยทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว จากนั้นเติมสารละลายวุ้นชั้นที่สอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดทับบนตัวอย่างพืช ปล่อยทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว แล้วจึงวางเมล็ดผักกาดหอมพันธุ์ แกรนด์ แรปิด 954 จำนวน 5 เมล็ดต่อหลุมบนผิวหน้าวุ้น ปิดฝา plate และเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

วางแผนการทดลองแบบ 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 วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

### การศึกษาผลทางอัลลิโลพาธีของวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมต่อการงอกของผักกาดหอมทดสอบด้วยวิธี soil germination method

สุ่มตัวอย่างกาบมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมและจากกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งใช้ปลูกกล้วยไม้มาแล้วเป็นเวลา 1 ปี สายต้นละ 5 กระถาง นำมาผสมในวัสดุเพาะเมล็ดผักกาดหอม โดยใช้อัตราส่วนดินผสม ทราย และกาบมะพร้าวเก่า 5 : 1 : 1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันและใส่ในกระถางพลาสติกทรงมาตรฐานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว เพาะเมล็ดผักกาดหอมกระถางละ 5 เมล็ด บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกและหลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ถอนแยกให้เหลือ 2 ต้นต่อกระถาง บันทึกผลการเจริญเติบโตหลังการปลูก 1 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ CRD ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชุดทดลองด้วยวิธี DMRT

**การศึกษารูปแบบของโครมาโทแกรมสารสกัดจากกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)**

วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก(phenolic compound) จากใบและดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* และกล้วยไม้สกุลหวายปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ที่มีอายุประมาณ 1 ปี โดยใช้ตัวอย่างใบแก่ใบล่างสุดในลำที่มีอายุมากที่สุด และตัวอย่างดอกบานโดยสุ่มคละจากดอกที่บาน 5 ดอกในแต่ละซ่อ ตรวจสอบตามวิธีการของ Yang *et al*. (2006) โดยนำใบและดอกกล้วยไม้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทซึ่งใช้เวลา 3 วัน นำตัวอย่างแห้งที่บดละเอียด น้ำหนัก 0.25 กรัม ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมธานอลต่อน้ำ (อัตราส่วน 8 : 2 โดยปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปแช่ใน sonicator bath เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองสารสกัดตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วย้ายใส่ลงใน insert vial นำไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC (Waters, Harrow, UK)โดยใช้ detector ชนิด photodiode array และคอลัมน์ Luna 5U C18 ใช้ acetonitrile และ 0.01% trifluoroacetic acid อัตราส่วน 32:68 เป็นสารละลายตัวพา กำหนดอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วิเคราะห์เปรียบเทียบโครมาโทแกรมจากกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนกับกล้วยไม้ปกติ

## ผลและวิจารณ์

**ผลทางอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมต่อการงอกของผักกาดหอม ตรวจสอบด้วยวิธี sandwich method**

การประเมินอัลลิโลพาธีของพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่ง เพื่อตรวจสอบการผลิตสารพิษหรือสารอัลลิโลพาธิคในพืช ที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงไปภายหลังการดัดแปลงพันธุกรรม (National Research Council, 2002; Pythoud, 2004) จากการทดสอบผลทางอัลลิโลพาธีของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ ‘บอม 17’ 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม พันธุ์ แกรนด์แรปิด 954 โดยวิธี sandwich method โดยทดสอบกับน้ำหนักตัวอย่าง 10 และ 50 มิลลิกรัม พบว่าการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนผักกาดหอมบนอาหารวุ้นที่มีตัวอย่างใบและดอกกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสองน้ำหนัก ตัวอย่างของสายต้น AB1-AB4 มีค่าใกล้เคียงกับการทดสอบในกล้วยไม้ปกติ (ตารางที่ 1) แสดงว่า ผลทางอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวายทุกสายต้นทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน ที่มีต่อค่าเฉลี่ยการงอกของเมล็ดและเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จึงสรุปได้ว่า การถ่ายยีน antisense *CPACO* จากมะละกอ เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายนี้ ไม่มีผลกระทบเชิงลบทางอัลลิโลพาธีต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของยอดและรากผักกาดหอม ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพในยูคาลิปตัสดัดแปลงพันธุกรรม โดยวิธี sandwich method ซึ่งพบว่า สายต้นยูคาลิปตัสดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลกระทบเชิงลบทางอัลลิโลพาธีต่อการเจริญของผักกาดหอม (Kikuchi *et al*., 2006, 2009 และ Ishii *et al*., 2012)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาในภาพรวมของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘บอม 17’ พบว่า ทั้งส่วนใบและดอกของกล้วยไม้ที่ใช้ตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 50 มิลลิกรัม มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญของยอดและรากผักกาดหอมมีค่าต่ำกว่าการใช้ตัวอย่างแห้งที่ 10 มิลลิกรัม โดยพิจารณาจากความยาว radical และ hypocotyls ที่ลดลง และตัวอย่างจากใบกล้วยไม้ มีผลทำให้มีการเจริญเติบโตลดลงมากกว่าการใช้ตัวอย่างจากส่วนของดอก (ตารางที่ 1) ผลดังกล่าวนี้อาจเนื่องมาจากสารทุติยภูมิที่สะสมอยู่ในส่วน

ต่างๆ ของกล้วยไม้ที่มีอยู่จำนวนมากอาจส่งผลกระทบเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือสิ่งมีชีวิตอื่น

ที่ผ่านมามีรายงานว่าในประเทศจีนมีการนำกล้วยไม้มาใช้เป็นยาสมุนไพรกันอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานาน โดยกล้วยไม้ที่นิยมใช้เป็นยากันมากคือ สกุลหวาย ซึ่งเชื่อกันว่ามีสรรพคุณหลายประการ เช่นช่วยบำรุงสายตา ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ระงับอาการคออักเสบ และลดไข้ เป็นต้น (Yang *et al.*, 2006)ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า ปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกต้นกล้วยไม้สกุลหวายอบแห้งไปประเทศจีนเป็นปริมาณมาก การศึกษาด้านสารทุติยภูมิรายงานว่าสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในลำต้นของกล้วยไม้โดยเฉพาะสกุลหวายมีหลายชนิด เช่น สารในกลุ่ม alkaloid phehol และ terpene ซึ่งรายงานทางการแพทย์แผนปัจจุบันระบุว่า สารเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่เป็นเนื้องอก ยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือด ยับยั้งการอักเสบ และ ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Yang *et al.*, 2006) ดังนั้น สารต่างๆ ที่พบมากในลำต้นอาจมีอยู่ในส่วนของใบและดอกด้วย ซึ่งอาจส่งผลข้างเคียงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์พืชได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าส่วนของใบมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดหอมมากกว่าส่วนของดอก และการใช้ใบปริมาณมากยิ่งส่งผลกระทบในการยับยั้งมากขึ้น

**ตารางที่ 1** ผลของใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ ‘บอม 17’ สายต้นปกติ (ABC) และสายต้นดัดแปลงพันธุกรรม 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 ต่อการงอกของเมล็ดผักกาดหอมพันธุ์แรนด์ แรปิด 954 ทดสอบโดยวิธี sandwich method โดยใช้ตัวอย่างแห้ง 10 และ 50 มิลลิกรัม (ข้อมูลเฉลี่ยจาก การทดลอง 3 ครั้ง)

**(A) 10 มิลลิกรัม**

| สายต้น | ตัวอย่างใบ | | | ตัวอย่างดอก | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | % การงอก | % ความยาว Radicle | % ความยาว Hypocotyl | % การงอก | % ความยาว Radicle | % ความยาว Hypocotyl |
| 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 |
| CV (%) | 12.54 | 12.38 | 11.14 | 15.85 | 12.44 | 11.82 |

**(B) 50 มิลลิกรัม**

| สายต้น | ตัวอย่างใบ | | | ตัวอย่างดอก | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | % การงอก | % ความยาว Radicle | % ความยาว Hypocotyl | % การงอก | % ความยาว Radicle | % ความยาว Hypocotyl |
| 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 |
| CV (%) | 11.99 | 14.61 | 14.85 | 15.12 | 16.27 | 12.83 |

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เปอร์เซ็นต์ความยาว radical และ hypocotyl คือเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการเพาะเมล็ดในวุ้นเปล่าซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

**ผลทางอัลลิโลพาธีของวัสดุปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมต่อการงอกของผักกาดหอม ตรวจสอบด้วยวิธี soil germination method**

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมภายใต้สภาพโรงเรือนเป็นสิ่งสำคัญต่อการประเมินความเสี่ยงอันอาจเกิดขึ้นได้ต่อพืชปลูกตามหลัง ซึ่งในการทดลองนี้พืชปลูกตามหลังที่ใช้ทดสอบ คือ ผักกาดหอม โดยตรวจสอบด้วยวิธี soil germination method ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการประเมินผลทางอัลลิโลพาธีของสารที่มีการปลดปล่อยออกจากรากพืช (Kannaiyan, 2007) และมีรายงานการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ในยูคาลิปตัสดัดแปลงพันธุกรรม (Kikuchi *et al.*, 2006, 2009) โดยในการทดลองนี้ ศึกษาผลของวัสดุปลูกกล้วยไม้ซึ่งในประเทศไทยใช้กาบมะพร้าวเป็นหลัก ที่อาจมีสารที่ปลดปล่อยออกมาจากรากกล้วยไม้และอาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม

จากการสุ่มตัวอย่าง กาบมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมและจากกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสายพันธุ์บอม 17 ซึ่งใช้ปลูกกล้วยไม้มาแล้วเป็นระยะเวลา 1 ปี นำมาผสมในวัสดุปลูกผักกาดหอม และศึกษาการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอม โดยบันทึกผลเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และลักษณะของต้นผักกาดหอม ให้ผลดังตารางที่ 2 ซึ่งพบว่า ผักกาดหอมที่ปลูกโดยใช้กาบมะพร้าวเก่าจากการปลูกกล้วยไม้สายพันธุ์บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรมและจากกล้วยไม้ปกตินั้นมีเปอร์เซ็นต์การงอกและความกว้างใบไม่ต่างกันทางสถิติ แต่มีการเจริญเติบโตด้านความสูงและน้ำหนักสดแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่าผักกาดหอมที่ปลูกในวัสดุปลูกเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม ทุกสายต้น มีการเจริญเติบโตด้านความสูงและน้ำหนักสดดีกว่าที่ปลูกโดยใช้กาบมะพร้าวจากต้นกล้วยไม้ปกติผสมในวัสดุปลูก ซึ่งแสดงว่ารากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ศึกษานี้ ไม่มีการปลดปล่อยสารทุติยภูมิที่มีผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดหอม ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการศึกษาการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดหอมในวัสดุปลูกที่มีเศษซากต้นคาร์เนชันดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน *flavoniod 3', 5'-hydroxylase* เป็นส่วนผสม ที่พบว่าผักกาดหอมที่ปลูกด้วยวัสดุปลูกทั้งที่มีซากต้นคาร์เนชันปกติและดัดแปลงพันธุกรรมมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน (Kikuchi *et al.*, 2008)

อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ พบความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของผักกาดหอม ระหว่างสายต้นของกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดจากผลของการถ่ายยีนที่แต่ละสายต้นอาจมีจำนวนชุดยีนที่ได้รับแตกต่างกัน หรืออาจเกิดจากตำแหน่งการเข้าเชื่อมต่อของยีนที่ถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้แต่ละสายต้นที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปไม่เท่ากัน (Aida *et al.*, 1998) ซึ่งมีผลทำให้มีการสร้างฮอร์โมนเอทิลีนในแต่ละสายต้นไม่เท่ากัน ซึ่ง Sornchai (2009) รายงานว่า กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 4 สายต้นนี้ มีการสร้างเอทิลีนน้อยกว่าสายต้นปกติ โดย AB1-AB3 มีการสร้างเอทิลีนใกล้เคียงกัน แต่น้อยกว่า AB4

นอกจากนี้ จากการทดลองมีข้อสังเกตว่าการเจริญเติบโตของผักกาดหอมในภาพรวมไม่ดีเท่าที่ควร โดยมีน้ำหนักสดค่อนข้างน้อยในทุกทรีทเมนต์ ทั้งนี้เป็นเพราะสภาพโรงเรือนชีวนิรภัยไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของผักกาดหอมเนื่องจากอุณหภูมิภายในโรงเรือนสูงมากกว่าปกติเพราะเป็นโรงเรือนมุ้งตาข่ายที่มีช่องเปิดขนาด 32 เมซ จึงทำให้การระบายความร้อนไม่ดี ดังนั้น ในอนาคตอาจต้องพิจารณาใช้พืชปลูกตามหลังซึ่งมีความสามารถทนทานต่อสภาพอากาศร้อนได้ดีกว่าผักกาดหอม

**ตารางที่ 2** เปอร์เซ็นต์การงอก และการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมเมื่อปลูกทดสอบในดินปลูกที่มีส่วนผสมของกาบมะพร้าวเก่าที่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ทั้งที่ดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ปกติ มาแล้วเป็นเวลา 1 ปี

| สายต้น | การงอก และ การเจริญเติบโตของผักกาดหอม | | | |
|---|---|---|---|---|
| | % การงอก | ความสูง (ซม.)[1/] | ความกว้างใบ (ซม.)[2/] | น้ำหนักสด (ก.)[3/] |
| 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 | ** |
| CV(%) | 1.9 | 1.0 | 0.9 | 1.4 |

[1/] ความสูงลำต้นวัดจากส่วนเหนือรากถึงปลายใบ, [2/] ความกว้างใบวัดจากกลางใบ, [3/] น้ำหนักสดทั้งต้นรวมราก

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

*, ** ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

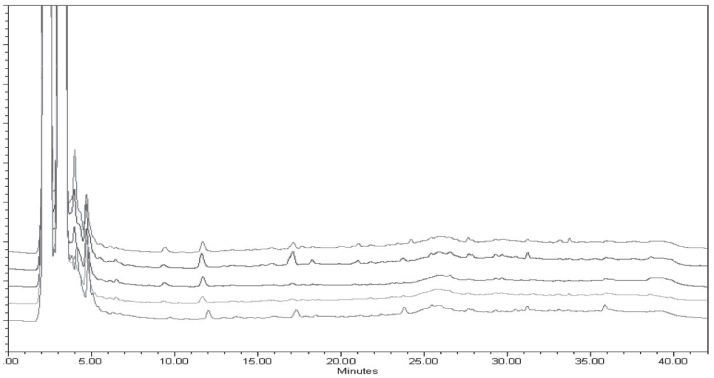
**ผลการเปรียบเทียบรูปแบบของโครมาโทแกรมสารสกัดจากกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน**

จากรายงานในปี 2006 โดย Yang *et al.* และ Zhang *et al.* ซึ่งพบว่า กล้วยไม้สกุลหวายมีสารทุติยภูมิหลักที่มีสรรพคุณทางยา คือ กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในส่วนใบและดอกของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับกล้วยไม้ปกติ โดยการวิเคราะห์ HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดจากส่วนใบและดอกกล้วยไม้สกุลหวายปกติเปรียบเทียบกับกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม สายพันธุ์ บอม 17 อายุประมาณ 1 ปี โดยวิเคราะห์และตรวจวัดตามวิธีการของ Yang *et al.* (2006) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลกับรายงานของ Yang *et al.* (2006) พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17 ทุกสายต้น ในงานวิจัยนี้ แสดงลักษณะพีคของสารในช่วงเวลาประมาณ 10-35 นาที คล้ายกันกับรายงานของ Yang *et al.* (2006) ซึ่งได้ตรวจสอบในกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น (ตารางที่ 3) โดยสารสกัดจากใบแสดงพีคที่มีค่า retention time ใกล้เคียงกับสารตามรายงานที่อ้างอิงได้จากรายงานของ Yang *et al.* (2006) คือ denchrysan A, moscatilin, gigantol, dengibsin และ moscatin (ภาพที่ 1A) ส่วนสารสกัดจากดอกแสดงพีคที่มีค่า retention time ใกล้เคียงกับสาร denchrysan A, erianthridin, moscatilin, confusarin, gigantol และ dengibsin (ภาพที่ 1B) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณสารได้อย่างชัดเจน เนื่องจากไม่ได้มีการเทียบกับสารมาตรฐาน

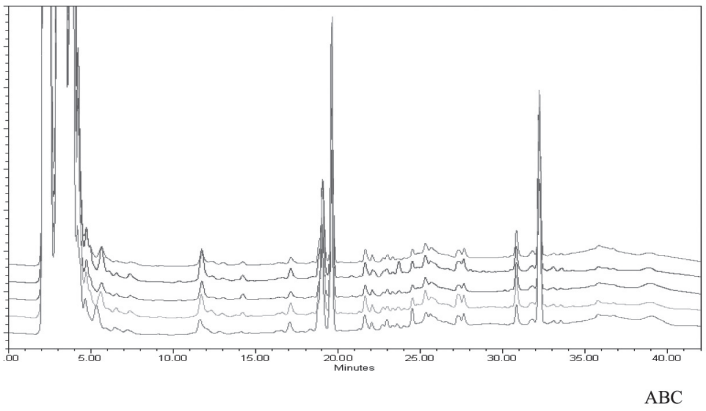
**ตารางที่ 3** การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี HPLC ในกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรม (AB1-AB4) และต้นปกติ (ABC) กับผลจากรายงานในกล้วยไม้ซึ่งรายงานโดย Yang *et al.* (2006) ในช่วงเวลาประมาณ 10-35 นาที

| Retention time (min) ในกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์ บอม 17 สายต้นต่าง ๆ (ใบ/ดอก) | | | | | Retention time (min) ที่รายงานโดย Yang *et al.* (2006) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ABC | AB 1 | AB 2 | AB 3 | AB 4 | retention time | ชนิดสาร |
| 12/11.5 | 11.5/11.5 | 11.5/11.5 | 11.5/11.5 | 11.5/11.5 | 12 | denchrysan A, |
| -/20 | -/20 | -/20 | -/20 | -/20 | 20 | eriamthridin |
| 24/24.5 | -/24.5 | -/24.5 | 24/24.5 | 24.5/24.5 | 24.5 | moscatilin, |
| -/26 | -/26 | -/26 | -/26 | -/26 | 26 | confusarin |
| 27.5/27.5 | 27.5/27.5 | 27.5/27.5 | 27.5/27.5 | 27.5/27.5 | 27 | gigantol, |
| 31/31 | -/31 | -/31 | 31/31 | 31/31 | 30.5 | dengibsin |
| -/- | 34/- | -/- | -/- | 34/- | 34 | moscatin |

**(A) ใบ**




**(B) ดอก**




**ภาพที่ 1** โครมาโทแกรมของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในสารสกัดจากส่วนใบและดอกของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17 สายต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ABC) และสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* (AB1-AB4) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC–DAD ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (การระบุชนิดของสารประกอบฟีนอลิกอ้างอิงโดยเทียบเคียงจาก Yang *et al.*, 2006)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน และไม่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า ลักษณะโครมาโทแกรมในแต่ละสายต้นมีรูปแบบคล้ายกัน แสดงว่า มีองค์ประกอบและปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลิกที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้สนับสนุนผลการทดลองข้างต้น ที่พบว่า เศษซากเนื้อเยื่อและวัสดุที่ใช้ปลูกของกล้วยไม้สกุลหวายดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน antisense *CPACO* ไม่ส่งผลเชิงลบในทางอัลลิโลพาธีในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดหอมซึ่งใช้เป็นพืชปลูกตามหลัง

## สรุป

การประเมินผลทางอัลลิโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวาย โซเนีย บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ปกติ ที่อาจส่งผลกระทบต่อพืชปลูกตามหลัง ด้วยวิธี sandwich method และ soil germination method พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายมีผลทางอัลลิโลพาธี ที่สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดหอมได้ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ปกติ และ

เมื่อตรวจสอบลักษณะ HPLC โครมาโทแกรมของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก พบว่า มีรูปแบบคล้ายกันระหว่างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ปกติ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลกระทบเชิงลบด้านอัลลิโลพาธีต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูกตามหลังที่ใช้ทดสอบ

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

## เอกสารอ้างอิง

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.

Bovy, A.G., G.C. Angenent, H.J.M. Dons and A.C. van Altvorst. 1999. Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. Mol. Breed. 5: 301-308.

Fujii, Y., 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.

Ishii, K., A. Kawaoka and T. Taniguchi. 2012. GMOs safety assessment-feasibility of bioassay to detect allelopathy using handy sandwich method in transgenic plant. Pp. 470-478 *In* Ozden, Y. ed. Transgenic Plants-Advances and Limitation. InTech, Shanghai, China.

James, C. 2013. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. Available at: http://www.isaaa.org/publications, July 1, 2014.

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.

Kannaiyan, S. 2007. Genetically modified (GM) crops and biosafety *In* The Biosafety Regulatory Framework: Assessment, Decision, Implication and Public and Private Interface held at Madurai Kamaraj University, Madurai, Tamil Nadu, India.

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.

Kikuchi, A., 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.

Kikuchi, A., 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. J. Wood Sci. 55: 149-153.

Kosugi, Y., K. Shibuya, N. Tsuruno, Y. Iwazaki, A. Mochizuki, T.Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh. 2000. Expression of genes responsible for ethylene production and wilting are differently regulated in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) petals. Plant Sci. 158: 139-145.

Koto, R. 2006. Transformation of *CPACO* antisense to *Dendrobium* orchid. Ph.D. Thesis. Kasetsart University.

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.

National Research Council. 2002. Environmental Effects of Transgenic Plants. National Academy Press, Washington DC, USA.

Pythoud, F. 2004. The Cartagena Protocol and GMOs. Nature Biotechnol. 22: 1347–1348.

Rice, E.L. 1984. Allelopathy. 2nd ed. Academic Press, New York, USA.

Shinoyama, H. and A. Mochizuki. 2006. Insect resistant transgenic chrysanthemum [*Dendranthema* x *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. Acta Hort. 714:177–183.

Shinoyama, H., A. Mochizuki, K. Komano, Y. Nomura and T. Nagai. 2003. Insect resistance in transgenic chrysanthemum [*Dendranthema* x *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] by the introduction of a modified *d-endotoxin* gene of *Bacillus thuringiensis*. Breeding Sci.53:359–367.

Sornchai, P. 2009. The expression of antisense papaya *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase* and the physiological study of transgenic *Dendrobium* orchids. M.S. Thesis. Kasetsart University.

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. Chrom. A 1104: 230-237.

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. Chem. Acta. 571:17–24.