ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249982

รหัสโครงการ SUT3-302-49-36-13

รายงานการวิจัย

การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

(Development of hybrid cucumber (*Cucumis sativus* L.) for downy mildew resistance)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

b00255281
249982
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249982

รหัสโครงการ SUT3-302-49-36-13

รายงานการวิจัย

การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

(Development of hybrid cucumber (*Cucumis sativus* L.) for downy mildew resistance)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-302-49-36-13

รายงานการวิจัย

การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

(Development of hybrid cucumber (*Cucumis sativus* L.) for downy mildew resistance)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว

อาจารย์ ดร.สุจินต์ เจนวีรวัฒน์

นางสาวนิรัชดา กองไธสง

นางสาวอทิตยา ศรทิพย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2551

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2554

คำชี้แจง

รายงานวิจัยโครงการการพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างฉบับนี้ ครอบคลุมงานวิจัยที่ดำเนินการตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2548 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2554 ซึ่งยาวนานกว่าที่ตั้งเป้าหมายไว้ 3 ปี และเนื่องจากการผลิตสายพันธุ์แท้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ จึงไม่สามารถพัฒนาพันธุ์ลูกผสมได้ ทั้งนี้เป็นผลจากการขาดความพร้อมด้านห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปัญหาไฟดับและเครื่องปรับอากาศเสียซึ่งเกิดขึ้นบ่อยครั้ง ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเฉพาะในช่วงระยะแรกของการทดลอง ในแต่ละครั้งทำให้สูญเสียเนื้อเยื่อแตงกวาที่อยู่ในระหว่างการทดลองหลายร้อย/พันชิ้น และต้องเริ่มทำการทดลองใหม่หลายครั้ง แต่ละครั้งต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 6-8 เดือน และเนื่องจากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาจนได้ต้นสาย-พันธุ์แท้ต้องใช้เวลานาน และยังมีเนื้อเยื่อบางส่วนที่ยังอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโต ข้อมูลที่ปรากฏในรายงานนี้จึงยังไม่เสร็จสิ้นสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยกำลังดำเนินการต่อเพื่อรวบรวมข้อมูลให้ได้สมบูรณ์ที่สุดเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ต่อไป แม้ว่าได้สิ้นสุดเวลาแล้วก็ตาม

หัวหน้าโครงการ

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2551 คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณ ผศ. ดร. มล.อโณทัย ชุมสาย ประธานกรรมการบริหาร บริษัท Green World Genetics Co. Ltd. จ.เชียงราย ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์แตงกวา นอกจากนี้ คณะวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย รวมทั้งนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่ช่วยจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

249982

โรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* เป็นโรคที่ทำความเสียหายแก่ผลผลิตแตงกวาทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การเพาะเลี้ยงรังไข่เพื่อผลิตสายพันธุ์แท้เป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาลูกผสมเพื่อให้ต้านทานโรคราน้ำค้างที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างเบื้องต้นจากแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ 2) เพื่อพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่สำหรับผลิตแตงกวาสายพันธุ์แท้ 3) เพื่อพัฒนาวิธีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล สำหรับตรวจสอบและแยกความแตกต่างของต้นสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่และต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อต้น donor การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ และการตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ โดยการนับจำนวนโครโมโซม และการใช้เครื่องหมาย inter-simple sequence repeat (ISSR) จากการศึกษาความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน พบว่าสามารถจัดระดับความต้านทานได้ 3 ระดับคือ ต้านทาน จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ไฉไล CU 075 และ CU 4305 ต้านทานปานกลางจำนวน 11 พันธุ์ และอ่อนแอจำนวน 9 พันธุ์ จากการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา พบว่าต้นแตงกวาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่เจริญมาจาก embryo-like structure (ELS) โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิด ELS มากกว่า 35°ซ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 1.3 เท่า และอาหารระยะที่ 1 สูตร $I2G_{MA}$ มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูง และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกลุ่มสูงที่สุด อาหารระยะที่ 2 และ 3 มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ ELS และแคลลัส รวมทั้งการพัฒนาไปเป็นยอดกลุ่ม อย่างไรก็ตามการพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์เกิดขึ้นในอาหารชักนำต้นที่ปราศจากฮอร์โมน คืออาหารสูตร MS0 โอวุลของแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบว่าได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ ($2n = 2x = 14$) 60% ต้นแฮพลอยด์ ($2n = 1x = 7$) 30% และต้นทริพลอยด์ ($2n = 3x = 21$) 10% และการวิเคราะห์ ISSR ยืนยันว่าต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาทั้งสองพันธุ์เป็นสายพันธุ์แท้ซึ่งมีพันธุกรรมต่างจากต้น donor ทุกต้น

Abstract

249982

Downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis*, is one of the most destructive cucumber diseases worldwide including Thailand. Production of inbred lines by ovary culture is an alternative strategy for rapid and efficient breeding of cucumber hybrids for downy mildew resistance. The objectives of this research were 1) to preliminarily evaluate the levels of downy mildew resistance in various cucumber cultivars, 2) to develop a suitable ovary culture method for the production of cucumber pure lines and 3) to develop molecular markers capable of differentiation between pure line plantlets arisen from ovary culture and hybrid plantlets regenerated from donor tissues. The study was divided into three parts: evaluation of downy mildew resistance levels of different cucumber cultivars, comparisons of various ovary culture media for pure line production, and assessment of inbred lines by chromosome counting and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. When the resistance levels of 23 cucumber cultivars were evaluated at 65 days after inoculation, three resistance levels were observed; resistance (3 cultivars; Chailai, CU 075 and CU 4305), moderately resistance (11 cultivars) and susceptible (9 cultivars). It was found from repeated experiments using various culture media that ovary-derived plantlets arose directly from ELS. Culturing at 25°C resulted in 1.3-fold significantly higher ELS induction efficiency than 35°C. The 1st stage medium $I2G_{MA}$ tended to give high percentage of ELS induction and the highest percentage of multiple shoot formation. Differentiation media (2nd and 3rd stage media) stimulated the growth and differentiation of ELS and callus, as well as the development of multiple shoots. However, regeneration into complete plantlets occurred on the regeneration medium without any phytohormones (MS0). Ovules of Chai Lai and Big C were equally competent at plantlet formation, producing 60% doubled haploid ($2n = 2x = 14$), 30% haploid ($2n = 1x = 7$), and 10% triploid ($2n = 3x = 21$). The ISSR analysis confirmed that all the doubled haploid plantlets derived from the ovary culture of both cucumber cultivars were pure lines which differed genetically from donor plants.

สารบัญ

หน้า

คำชี้แจง ..... ก

กิตติกรรมประกาศ ..... ข

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

สารบัญ ..... จ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 5

สถานที่ทดลอง และเก็บข้อมูล 5

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 5

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ 7

ส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ 9

ส่วนที่ 3 การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ 15

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ 17

ส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 21

การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1 21

การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2 34

การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3 44

การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4 49

ส่วนที่ 3 การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ 53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้ (ดับเบิลแฮพลอยด์) โดยการนับจำนวนโครโมโซม 54
การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้โดยใช้เครื่องหมาย ISSR 55
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 56
บรรณานุกรม 57
ภาคผนวก 61
ประวัติผู้วิจัย 74

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ความรุนแรงของโรคราน้ำค้างโดยรวมทั้งต้นซึ่งประเมินจากใบทั้งหมดของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน 18

2 การเปรียบเทียบความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้างระหว่างใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน 19

3 ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคราน้ำค้างจากใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 ลักษณะต้นโดยรวม และระดับความต้านทานโรคของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน 20

4 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 22

5 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 22

6 ผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ บนอาหารระยะที่ 1 22

7 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ 23

8 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 27

9 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 27

10 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 27

11 ผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 28

12 อิทธิพลของอุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ 28

13 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ 29

14 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 35

15 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 9 พันธุ์ 35

16 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 9 พันธุ์ 36

17 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 40

18 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

19 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 40
20 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 41
21 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 42
22 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 46
23 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47
24 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47
25 ผลของอาหารระยะที่ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47
26 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47
27 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 48
28 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม 51
29 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 51
30 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 52
31 จำนวนต้นแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ในสูตรอาหารต่าง ๆ 53
32 จำนวนโครโมโซมและการปรากฏแถบ ISSR ของต้นแตงกวาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 54

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ลักษณะของแคลลัส (ก) ELS (ข) ยอดกลุ่ม (ค) และต้น (ง) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 52

2 ต้นแตงกวาพันธุ์ไฉไลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ และย้ายปลูกในกระถาง ขนาด 4 นิ้ว 53