



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์

วิทยาศาสตร

สาขา

สายวิชา

เรื่อง การพัฒนาโซมาโคลนของเสาวรสพันธุ์สีม่วงเพื่อความต้านทานต่อไวรัส

Development of Purple Passion Fruit Somaclones for Virus Resistance

นามผู้วิจัย นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สิริภัทร พรหมณีย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เจริมสมบัติ, Dr.Agr.)

รักษาราชการแทนหัวหน้าสายวิชา

(อาจารย์อานามย์ ดำเนตร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาโซมาโคลนของเสาวรสพันธุ์สีม่วงเพื่อความต้านทานต่อไวรัส

Development of Purple Passion Fruit Somaclones for Virus Resistance

โดย

นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวผลิตภัณฑ์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มาริษา สุขปานแก้ว 2557: การพัฒนาโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์ส้มวงเพื่อความ
ต้านทานต่อไวรัส ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวผลิตภัณฑ์) สาขา
วิทยาศาสตรชีวผลิตภัณฑ์ สายวิชาวิทยาศาสตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รอง
ศาสตราจารย์สิริภัทร พรหมณีย์, Ph.D. 142 หน้า

การเพาะเลี้ยงเซลล์ของใบอ่อนเสาวรพันธุ์ส้มวงในสูตรอาหาร Murashige and skoog's
medium (MS) ที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9
สัปดาห์ พบว่าเซลล์ที่ได้มีสีเขียวอ่อน มี 2 ลักษณะ คือ แข็งและอ่อนนุ่ม เมื่อนำเซลล์ทั้ง
สองลักษณะมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม benzyladenine (BA) ในระดับความ
เข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8
สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อ
การชักนำให้เกิดยอด โดยสามารถชักนำให้เซลล์ที่มีลักษณะแข็ง เกิดยอดได้ร้อยละ 80 นำ
ยอดที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อขยายยอดพันธุ์ จากนั้นชักนำให้
เกิดรากในอาหารสูตร MS ที่เติม indole-3-butyric acid (IBA) 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 8
สัปดาห์ จากนั้นนำปลูกลงดินภายในโรงเรือนเพาะชำ วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม
ของโซมาโคลนด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA โดยสุ่มจำนวน 40 ตัวอย่าง โดยใช้
ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิดมีแถบดีเอ็นเอพอลิเมอร์ฟิเคชันจำนวน 16 แถบ คิดเป็นร้อยละ 14.9 ของแถบดี
เอ็นเอทั้งหมด ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.94 ถึง 1.0 จากแผนภูมิความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรมแยกประชากรออกเป็นสองกลุ่ม การคัดเลือกโซมาโคลนที่มีความต้านทานต่อโรค
ไวรัส PWV โดยวิธีกล จากทั้งหมด 300 โซมาโคลน สามารถคัดเลือกได้จำนวน 2 โซมาโคลน (โซมา
โคลนที่ 18 และ 79) โดยทำการตรวจสอบโรคโดยใช้เทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์. โซมาโคลนที่ 18, 79
และตัวอย่างที่ปราศจากโรค ไม่พบแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลแต่ โซมาโคลนที่เป็นโรคไวรัส และชุด
ควบคุม พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิตอาร์ทีพีซีอาร์ ซึ่งประสบความสำเร็จในการคัดเลือกโซมาโคลน
ที่มีความต้านทานต่อโรคไวรัส PWV

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Marisa Sukpankeaw 2014: Development of Purple Passion Fruit Somaclones for Virus Resistance. Master of Science (Bioproducts Science), Major Field: Bioproduct Science, Division of Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Siripatr Prammanee, Ph.D. 142 pages.

Young leaves of virus-free purple passion fruit were used for callus culture on MS medium (Murashige and Skoog's medium) supplemented with 3 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) for 9 weeks. The results showed that callus were formed in light green color of compact and friable callus. The both callus were shoot regenerated on MS medium without 2,4-D supplement with vary concentration at 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mg/l of BA (Benzyladenine) for 8 weeks. The suitable concentration of BA was 2.0 mg/l which 80 % of compact callus could regenerate their shoots. The shoot propagation were continuous cultured on MS medium supplement with 2.0 mg/l BA for 4 weeks. The root formation was conducted by shoot culturing on MS medium supplemented with 0.4 mg/l IBA for 8 weeks. The whole new somaclone plants were transferred into pot plants in green house. The genetic variation of 40 somaclones were analysed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Ten primers were used and generated 16 (14.9%) polymorphic bands. The genetic distances among the 40 somaclone accessions varied from 0.94 to 1.0. The phylogenetic tree constructed using RAPD data that shown in two groups. Three hundred somaclones were selected for passion fruit woodiness virus (PWV) resistance by using mechanical inoculation. Only two somaclones (no. 18 and 79) showed no symptom of disease after inoculation with PWV crude sap for 42 days. Plant inoculation were detected by RT-PCR method. The somaclones no. 18, 79 and healthy showed no band on the gel but other plants disease and control showed RT-PCR product band. The resistant somaclones were successful selection.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริภัทร์ พราหมณีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสุวรรณ เจริญสมบัติ กรรมการร่วม ที่ได้ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษาถึงหัวข้อ วิธีการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมทั้งเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม ประธานการสอบ และ ดร.ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอน และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อสมควร คุณแม่ศิริรัตน์ และครอบครัวสุขปานแก้ว ทุกคน ที่ได้อบรม ให้กำลังใจ ซึ่งเป็นพลังให้สู้กับอุปสรรคต่างๆ และส่งเสริมการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

มาริษา สุขปานแก้ว

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	31
อุปกรณ์	31
วิธีการ	37
ผลและวิจารณ์	52
ผล	52
วิจารณ์	88
สรุปและข้อเสนอแนะ	90
สรุป	90
ข้อเสนอแนะ	91
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	92
ภาคผนวก	102
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	142

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณและมูลค่าของผลผลิตเสาวรสวนที่ส่งผ่านตลาดมูลนิธิโครงการหลวง	8
2	การจัดชนิดของจีโนมของไวรัสในกลุ่ม Potyvirus	12
3	ข้อดีและข้อเสียของ somaclonal variation	17
4	พันธุ์พืชที่รายงานจากการพัฒนาด้วยวิธี somaclonal variation	21
5	ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	34
6	Degenerate primers ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Potyvirus ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR	36
7	ตารางการสุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโซมาโคลนด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)	45
8	การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D	54
9	แสดงการเจริญของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 0 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	56
10	แสดงการเจริญของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 0-2 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	57
11	แสดงการเจริญของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2-4 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	58
12	แสดงการเจริญของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 4-6 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	59
13	แสดงการเจริญของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 6-8 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	60
14	ผลการปลูกเชื้อไวรัส PWV โดยวิธีกลดบบนใบเสาวรสวน	81
ตารางผนวกที่		
ก1	องค์ประกอบสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS, 1962)	104
ก2	การเตรียม Stock อาหารปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (1 ลิตร)	105

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข1 ผลการชักนำให้แตกกอโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	108
ข2 ผลการชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	110
ค1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ต่างๆ	113
ค2 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Universal primer1 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	116
ค3 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Universal primer 3 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	118
ค4 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Universal primer 6 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	120
ค5 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-01 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	122
ค6 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	124
ค7 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	126
ค8 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-08 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	128
ค9 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	130
ค10 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-16 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	132

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค11 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18 กับโซมาโคลนของเสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control	134
ค12 ค่าความเหมือน (similarity matrix) ของโซมาโคลนเสาวรพันธุ์สีม่วง ที่ทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค RAPD	136

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ดอกของเสาวรสปันธ์สีม่วงเบอร์ 2	5
2	ผลของเสาวรสปันธ์สีม่วงเบอร์ 2 ปลุกโดยใช้ระบบค้างแบบฝืน	6
3	ผลของเสาวรสปันธ์สีม่วง	9
4	ผลของเสาวรสปันธ์สีเหลือง	10
5	ขั้นตอนในการตัดส่วนใบอ่อนของเสาวรสปันธ์ และเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D	38
6	ขั้นตอนในการตัดแคลลัสของเสาวรสปันธ์ และเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างๆ กัน	39
7	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอดโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	41
8	ขั้นตอนการพัฒนาให้เกิดต้นที่สมบูรณ์และนำลงปลูก	42
9	ลักษณะของใบเสาวรสปันธ์ที่เป็นโรคไวรัส PWV	49
10	การเจริญเติบโตของแคลลัสก. ใบอ่อนของเสาวรสปันธ์ขนาด 1x1 เซนติเมตร ข. แคลลัสในสัปดาห์ที่ 0-3, ค. แคลลัสในสัปดาห์ที่ 4-6 และ ง. แคลลัสในสัปดาห์ที่ 7-9	53
11	การพัฒนาให้เกิดยอด ก-ค friable callus ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 ตามลำดับ ง-ฉ compact callus ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 ตามลำดับ	61
12	การเพิ่มปริมาณยอด ก. ชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์, ข. ชักนำให้แตกกอโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	62
13	การเพิ่มจำนวนยอดเสาวรสปันธ์ในหิ้งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	การพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ ก. ชักน้ำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหาร สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ข. ขยายโซมาโคลนเสาวรสจำนวนมาก เพื่อนำไปปลูกเพื่อทำการคัดเลือกต่อไป	64
15	โซมาโคลนของเสาวรสที่ลงปลูกในกระถางภายในโรงเรือนเพาะชำ	64
16	แถบดีเอ็นเอของ SomacloneM= ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA/HindIII digest) 1-40= Somaclone ที่ทำการสุ่มมาจำนวน 40 ตัวอย่าง	66
17	Phylogenetic tree ของ Somaclone ที่ผ่านเทคนิค RAPD-PCR จำนวน 41 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.2 โดยอาศัยข้อมูล ความเหมือนที่คำนวณจากเทคนิค RAPD ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง มีค่าระหว่าง 0.94-1.00	67
18	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ Universal primer1 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสปันธ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)	68
19	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ Universal primer 3 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสปันธ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)	69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ Universal primer 6 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)	70
21	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-01 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)	71
22	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)	72
23	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)	73
24	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-08 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
25	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสปันธ์สีม่วงจำนวน 40 somaculture และ C คือ Control)	75
26	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-16 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสปันธ์สีม่วงจำนวน 40 somaculture และ C คือ Control)	76
27	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M ₁ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M ₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสปันธ์สีม่วงจำนวน 40 somaculture และ C คือ Control)	77
28	อาการของต้นเสาวรสปันธ์หลังจากปลูกเชื้อไวรัส PWV เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ; ก คือ somaculture ที่ 18 , ข คือ somaculture ที่ 79, ค-จ คือ somaculture ที่แสดงอาการของโรค และ ฉ คือ control	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 29 แสดงการตรวจสอบไวรัสโดยใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ PWV negative
(Lane 2: somaclone No.18, Lane 4: somaclone No.79, Lane 8: healthy
และ 11: H₂O) และ positive (Lane 1: somaclone No.8, Lane3:
somaclone No.25, Lane5: somaclone No.142, Lane 6: somaclone No.194,
Lane7: somaclone No.271, 9 และ Lane10: disease M: DNA size marker
(λDNA/*Hind*III digest).

87

การพัฒนาโคลนของเสาวรสปันธ์สีม่วงที่ต้านทานต่อโรคไวรัส

Development of Purple Passion Fruit Somaclones for Virus Resistance

คำนำ

เสาวรสเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญมากชนิดหนึ่ง ที่มีทั้งพันธุ์ที่รับประทานผลสดคือพันธุ์สีม่วงและพันธุ์ที่ใช้แปรรูป คือ พันธุ์สีเหลือง ซึ่งเสาวรสปันธ์สีม่วงเบอร์ 2 ได้รับการสนับสนุนให้ปลูกโดยมูลนิธิโครงการหลวง มีรสชาติที่หอมหวานกว่าพันธุ์สีเหลือง การขยายพันธุ์นิยมใช้การเสียบยอดโดยใช้ยอดพันธุ์สีม่วงเสียบกับต้นของพันธุ์สีเหลืองซึ่งใช้เป็นต้นตอ จะทำให้มีระบบรากและผลผลิตที่ดี มีช่วงเก็บเกี่ยวนานถึง 7 เดือน สามารถนำเสาวรสมารับประทานสดและแปรรูปเป็น อาหารคาวและหวานได้หลากหลายชนิด เช่น น้ำพริก ไอศกรีม และเค้กผลไม้ เป็นต้น ปัจจุบันราคาและความต้องการของตลาดสูงขึ้น จึงสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกเสาวรสได้อย่างดี ราคาขึ้นอยู่กับคุณภาพของผลผลิตซึ่งอยู่ในช่วง 20-100 บาทต่อกิโลกรัม แต่เนื่องจากปัญหาการเกิดโรคไวรัสระบาดโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส PWV (passion fruit woodiness virus) เป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรคทั่วไปในแปลงปลูก ทางมูลนิธิโครงการหลวงจึงได้สนับสนุนให้ทำการวิจัยเพื่อขยายต้นแม่พันธุ์เสาวรสที่ปลอดโรคไวรัส โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดเจริญ ซึ่งจะทำให้ต้นแม่พันธุ์ปลอดโรค แต่เมื่อนำไปขยายพันธุ์ในแปลงปลูกก็มีโอกาสถูกเชื้อเข้าทำลายภายหลัง จึงจำเป็นต้องลดการเกิดโรคโดยการเปลี่ยนต้นแม่พันธุ์ใหม่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งปัจจุบันพบว่าต้นแม่พันธุ์ที่ขยายพันธุ์ในขณะนี้แสดงอาการของโรคไวรัสแต่ใช้เวลาในการเกิดโรคนานกว่าพันธุ์เดิม เพื่อเป็นการแก้ปัญหาอย่างยั่งยืนจึงควรมีต้นแม่พันธุ์ที่ปลอดโรคและสามารถต้านทานต่อโรคไวรัสได้อีกด้วย

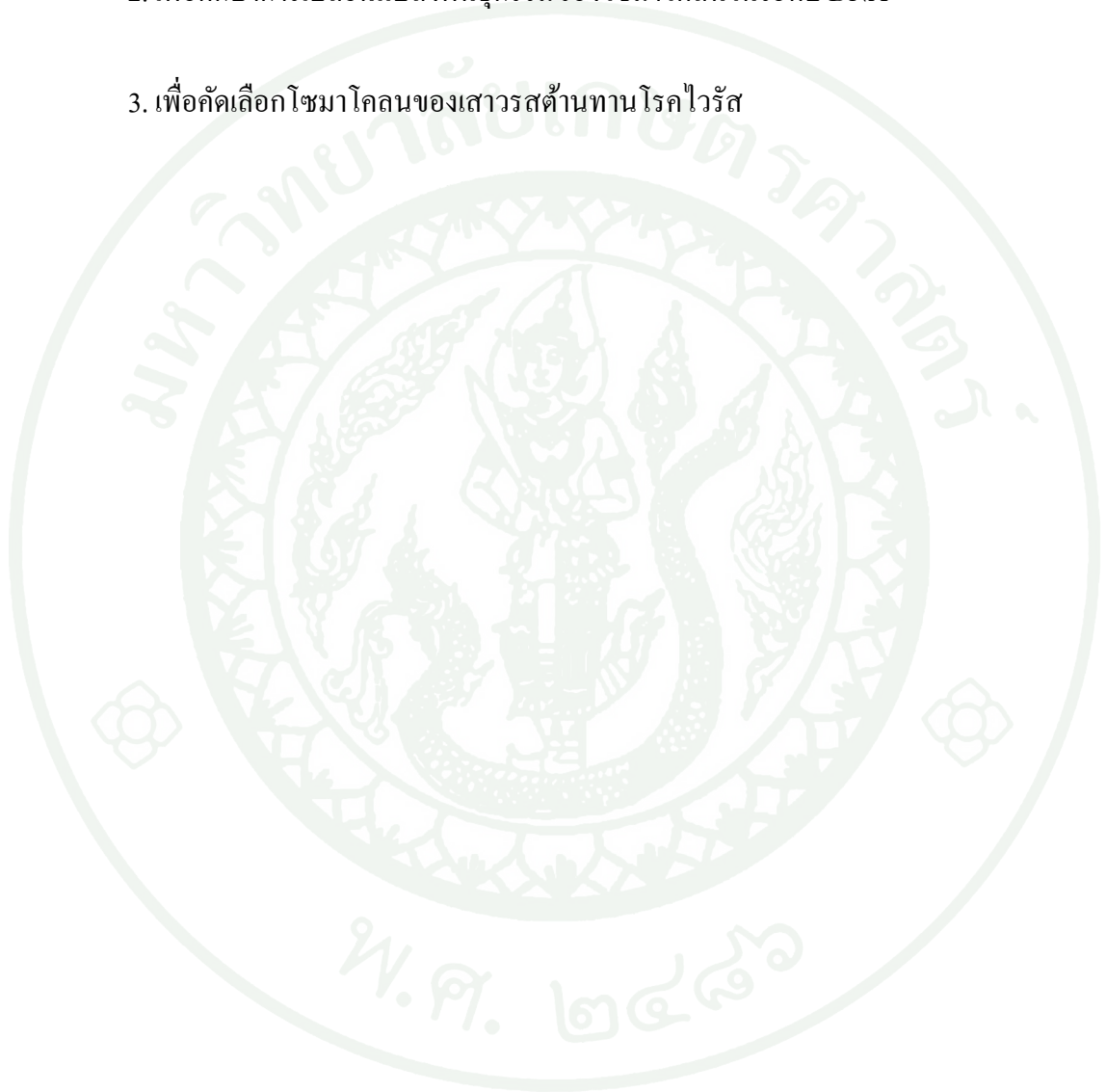
เทคนิค Somaclonal variation คือ เทคนิคที่ทำให้เกิดความหลากหลาย หรือการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของพืชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผลทำให้พืชแสดงลักษณะที่แตกต่างจากพืชต้นเดิม โดยมุ่งเน้นประโยชน์ทางการปรับปรุงพันธุ์ เช่น คุณภาพของผลผลิต ความทนทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช เป็นต้น

งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิค Somaclonal variation โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์สีก่อนที่จะพัฒนาให้เกิดยอดและต้นที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการคัดเลือกหาต้นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคไวรัส Passion fruit Woodiness Virus ต่อไป



วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาโคม่าโคลนของเสาวรศโดยใช้เทคนิค Somaclonal Variation
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของโคม่าโคลนในระดับ DNA
3. เพื่อคัดเลือกโคม่าโคลนของเสาวรศต้านทานโรคไวรัส



ตรวจเอกสาร

เสาวรส (Passion fruit)

เสาวรสจัดอยู่ในตระกูล *Passifloraceae* จัดเป็นไม้ผลประเภทไม้เลื้อยที่มีชื่อต่างๆ กันไปในแต่ละท้องถิ่น ได้แก่ Granadilla ในอังกฤษ, Grenadille ในฝรั่งเศส, Buah negeri (JAVA), Pasi (Sunda), และ Konyal ในอินโดนีเซีย, Buah susu และ Markisa ในมาเลเซีย, Pasionnaria (Tagalog) และ Marafloa (Ilkano) ในฟิลิปปินส์, Linmangkong ในลาว, Chum bap ในเวียดนาม สำหรับประเทศไทยเคยมีการเรียกกันว่า กระทกรกฝรั่ง และต่อมาเปลี่ยนเป็น เสาวรส เพื่อผลประโยชน์ทางการค้าจนรู้จักอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน (ณรงค์ชัย, 2550)

แหล่งกำเนิดและการกระจายพันธุ์

เสาวรสเป็นพืชท้องถิ่นทางใต้ของประเทศบราซิลซึ่งมีพื้นที่เป็นสภาพป่าชื้นและฝนตกชุกได้มีการแบ่งออกเป็นสองชนิด คือ ชนิดผลสีม่วง (*Passiflora edulis*) สามารถพบในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศเย็น และชนิดผลสีเหลือง (*Passiflora flavicarpa*) ปลูกกันได้ทั่วไปตามพื้นที่ระดับต่ำในเขตร้อน เสาวรสทั้งสองชนิดมีการกระจายพันธุ์ทั่วพื้นที่ในเขตกึ่งร้อน (ณรงค์ชัย, 2550) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของออสเตรเลีย, รัฐฮาวาย (สหรัฐอเมริกา), อเมริกาใต้ และบราซิล (Knight and Sauls, 1994)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเสาวรสเป็นไม้เถาเลื้อยอายุหลายปีมีมือเกาะเกิดทางซอกใบ ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวเป็นรูปสามแฉก สีเขียวสด เกิดแบบเรียงสลับ ส่วนดอกเกิดที่โคนก้านใบของเถาใหม่ พร้อมกับการเจริญของเถา เป็นดอกสมบูรณ์เพศ โดยจะบานในตอนเช้าและผสมตัวเองได้ดี ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบ และกลีบดอกสีครีมมีประสีม่วง 5 กลีบ ภายในดอกมีระยะฝอยจำนวนมากมีสีม่วงและคาดสีขาวบริเวณโคนและปลายเกสรตัวผู้มี 5 อัน และมีเกสรตัวเมียที่ปลายมี 3 แฉก ดอกมีกลิ่นหอมอ่อน



ภาพที่ 1 ดอกเสาวรสพันธุ์สีม่วงเบอร์ 2

ผลของเสาวรสบ้างเป็นผลเดี่ยว ลักษณะกลมหรือรูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-5 เซนติเมตร น้ำหนัก 50-60 กรัมต่อผล ผิวของผลอ่อนมีสีเขียวเมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือเหลือง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ภายในผลมีเมล็ดจำนวนมาก สีน้ำตาลเข้มถึงดำ แต่เมล็ดถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้ม เมล็ดมีน้ำลักษณะเหนียวข้นอยู่ภายใน รสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย มีความเป็นกรด และมีกลิ่นหอม



ภาพที่ 2 ผลของเสาวรพันธุ์สีม่วงเบอร์ 2 ปลุกโดยใช้ระบบค้างแบบพื้น

การปลูกเสาวรในประเทศไทย

มีการรายงานว่าในประเทศไทยได้มีผู้นำเสาวรผลสีม่วงเข้ามาปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2498 นำเมล็ดผลสีเหลืองเข้ามาในปี พ.ศ. 2507 และยังมีการนำลูกผสมระหว่างสีม่วงและสีเหลืองจากประเทศออสเตรเลียเข้ามาในปี พ.ศ. 2523 เสาวรเป็นไม้ผลที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์ของมูลนิธิโครงการหลวงและหน่วยงานต่างๆ นำออกส่งเสริมให้กับเกษตรกรปลูกเป็นอาชีพ โดยได้พยายามศึกษาพัฒนาวิธีการผลิตอย่างต่อเนื่องจนได้เล็งเห็นว่าเป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการผลิตและมีความต้องการของตลาดอีกชนิดหนึ่ง ในอดีตได้ปลูกเป็นการค้าทั่วไปแต่ปลูกเพื่อส่งโรงงานแปรรูปเท่านั้น โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่, เชียงราย, น่าน, เพชรบูรณ์, ระยอง, ตราด, ปราจีนบุรี, บุรีรัมย์, ประจวบคีรีขันธ์, กาญจนบุรี, ชุมพร, นราธิวาสและ สุราษฎร์ธานี เป็นต้น ส่วนผลผลิตที่จำหน่ายเพื่อบริโภคเป็นผลรับประทานสดนั้นทางมูลนิธิโครงการหลวงได้เป็นผู้เปิดตลาดรับประทานสดโดยใช้เสาวรพันธุ์สีม่วงอย่างจริงจัง เนื่องจากมีรสชาติที่หอมหวานกว่าพันธุ์สีเหลือง จึงมีเป้าหมายของการขยายพื้นที่ส่งเสริมเสาวรให้เพียงพอับความต้องการของตลาดที่เพิ่มขึ้นและยังทดแทนพื้นที่การปลูกพันธุ์ที่ใช้แปรรูป ที่มีปัญหาด้านราคาตกต่ำมาโดยตลอดในระยะหลัง

ณรงค์ชัย (2550) รายงานว่าหน่วยงานต่างๆ เช่น มูลนิธิโครงการหลวงและกรมวิชาการเกษตร ได้มีความพยายามหาพันธุ์เสาวรสำหรับรับประทานสดโดยเฉพาะ เนื่องจากผลผลิต

เสาวรสำหรับรับประทานสดมีราคาสูงกว่าพันธุ์แปรรูปมาก ในส่วนของมูลนิธิโครงการหลวงนั้น ได้มีการวิจัยหาพันธุ์เสาวรสำหรับรับประทานสดมานานแล้วโดยได้นำสายพันธุ์เสาวรจากประเทศต่างๆ เช่น ออสเตรเลียและไต้หวัน มาปลูกทดสอบในสถานีต่างๆ ได้แก่ สถานีเกษตรหลวงปางดะ, สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์, ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยลึกและแม่ลาน้อย เป็นต้น แต่ในระยะแรกยังไม่มีพันธุ์ใดที่มีลักษณะครบถ้วนตามที่ต้องการ คือผลผลิตที่มีความหวานหรือค่อนข้างหวาน ขนาดผลใหญ่ ให้ผลผลิตสูง และการดูแลรักษาง่าย แต่พบว่าพันธุ์เสาวรรับประทานสดส่วนใหญ่ที่รสชาติดี ผลมักมีขนาดเล็กให้ผลผลิตต่ำ และค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคและแมลง

ต่อมามูลนิธิโครงการหลวงยังคงดำเนินการวิจัยและพัฒนาเสาวรอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งปี พ.ศ. 2539 จึงประสบความสำเร็จ งานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง ได้คัดเลือกเสาวร 2 สายพันธุ์ ที่มีลักษณะเหมาะสำหรับรับประทานสด คือ รสชาติค่อนข้างหวาน ผลมีขนาดใหญ่ และให้ผลผลิตสูง โดยคัดเลือกจากต้นเพาะเมล็ดที่ได้จากสายพันธุ์ของประเทศไต้หวัน งานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง จึงได้เริ่มนำออกส่งเสริมให้แก่เกษตรกรปลูกและใช้ชื่อ เสาวรหวาน ของการปลูกเสาวรพันธุ์สีม่วงเป็นการค้าในประเทศไทย (งานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง, 2555) ปัจจุบันเสาวรหวานได้กลายเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของพื้นที่สูง และปริมาณผลผลิตที่ผู้บริโภคต้องการในแต่ละปีมีจำนวนมาก และยังไม่เพียงพอ โดยราคาของผลผลิตที่เกษตรกรได้รับสูงกว่าเสาวรพันธุ์แปรรูปที่เคยปลูกมากกว่า 3-5 เท่า ซึ่งนับเป็นผลไม้ที่มีอนาคตสำหรับเกษตรกรในพื้นที่สูงตั้งแต่ 800 เมตร ขึ้นไปจากระดับน้ำทะเล สำหรับปริมาณและผลผลิตที่มีคุณภาพ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าของผลผลิตเสาวรสวนที่ส่งผ่านตลาดมูลนิธิโครงการหลวง

ปี พ.ศ.	ปริมาณผลผลิต (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2548	80,642	1,064,590
2549	122,313	2,004,412
2550	195,285	3,354,858
2551	334,290	6,552,070
2552	285,352	6,128,203
2553	319,505	8,047,165
2554	300,507	8,331,918

ที่มา: งานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง, 2555

ชนิดและสายพันธุ์ของเสาวรสวน

โดยทั่วไปแล้วเสาวรสวนแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดผลสีม่วงและชนิดผลสีเหลือง โดยแต่ละชนิดมีลักษณะดังนี้

1. เสาวรสวนชนิดผลสีม่วง (*Passiflora edulis*)

เสาวรสวนชนิดนี้ผิวผลจะเป็นสีม่วงเมื่อผลแก่ ผลมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ดอกสามารถผสมตัวเองได้ดีดอกจะบานในตอนเช้า ผลสุกมีรสหวานและกลิ่นหอมกว่าชนิดสีเหลืองแต่ผลมักจะมีขนาดเล็กกว่าคือเส้นผ่าศูนย์กลางผลประมาณ 4-5 เซนติเมตร น้ำหนัก 50-60 กรัมต่อผลเสาวรสวนชนิดผลสีม่วงที่ปลูกในประเทศไทยนั้นมียังพันธุ์สำหรับแปรรูป และพันธุ์สำหรับรับประทานสด ที่มีรสชาติหวานกว่า ซึ่งต่อมามูลนิธิโครงการหลวงได้เรียกว่า “เสาวรสวนหวาน”

มูลนิธิโครงการหลวงคัดเลือกได้เสาวรสวน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์เบอร์ 1 และเบอร์ 2 แต่ปัจจุบันได้ปลูกเป็นการค้าเฉพาะพันธุ์เบอร์ 2 เท่านั้น เพราะมีลักษณะเด่นกว่า คือ ผลมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 70-100 กรัม มีความหวาน 17-18 องศาบริกซ์ นอกจากนี้ยังเปลือกผลไม่บางเกินไป ทำให้อายุการวางจำหน่ายนานขึ้นและทนทานต่อการขนส่ง



ภาพที่ 3 ผลของเสาวรพันธุ์สีม่วง

2. เสาวรชนิดผลสีเหลือง (*Passiflora flavicarpa*)

ลักษณะผิวผลจะมีสีเหลืองเมื่อแก่ ผลมีขนาดใหญ่กว่าชนิดผลสีม่วง คือ เส้นผ่าศูนย์กลางผลประมาณ 6 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 80-120 กรัมต่อผล เนื้อในให้ความเป็นกรดสูงกว่าชนิดสีม่วงจึงมีรสเปรี้ยวมากและนิยมใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปทำน้ำผลไม้ ดอกของเสาวรชนิดผลสีเหลืองจะบานในตอนเที่ยง ส่วนใหญ่ผสมตัวเองได้ไม่ดี ต้องผสมข้ามต้น แต่ต้นมีความทนทานต่อโรคต้นเน่า เถาเหี่ยว โรคไวรัส และไล่เดือนฝอยมากกว่าพันธุ์สีม่วง จึงนิยมใช้เป็นต้นตอสำหรับเปลี่ยนพันธุ์เป็นเสาวรหวาน



ภาพที่ 4 ผลของเสาวรพันธุ์สีเหลือง

การปลูกเสาวรเพื่อการส่งโรงงานแปรรูปส่วนใหญ่ปลูกโดยใช้เมล็ด เมล็ดที่เพาะจะใช้ระยะเวลาในการงอกประมาณ 2-4 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับฤดูกาล หากเก็บไว้นานร้อยละของการงอกจะลดลง หลังจากนำไปปลูกในแปลง ประมาณ 4-5 เดือน เสาวรจะเริ่มออกดอกและติดผล ระยะเวลาจากดอกบาน ติดผล จนถึงเก็บเกี่ยวใช้ระยะเวลา ประมาณ 50-70 วัน การขยายพันธุ์โดยการปักชำและเสียบยอดจะทำให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์และให้ผลผลิตเร็วกว่าการใช้เมล็ด การเสียบยอดนิยมใช้กับพันธุ์สีม่วงโดยใช้พันธุ์สีเหลืองเป็นต้นตอ (งานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง, 2555)

โรคของเสาวรสาเหตุจากเชื้อไวรัส

โรคของเสาวรที่เกิดจากไวรัสที่สำคัญและรุนแรง คือ โรค Passion fruit woodiness virus (PWV) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม *Potyvirus* ทำให้เกิดอาการใบด่าง เส้นใบสี จุดด่างเหลือง จุดวงแหวน ใบเรียวยาว ลำต้นด่าง (Taylor and Kimble, 1964; Teakle and Wildermuth, 1967; Smith, 1972) ผลด่างทั่วไป มีอาการด่างเป็นแบบวงแหวน ผิวเปลือกไม่เรียบ (ณรงค์ชัย, 2550) ใบหงิกงอ คล้ายหนังสือ (สรสวดี, 2532) ผลด่าง เนื้อผลไม้เรียบบิดเบี้ยว ผลขนาดเล็กกว่าปกติ เปลือกของผลจะหนา แข็งคล้ายเนื้อไม้ (woody) และผลผลิตลดลง (Taylor and Kimble, 1964) เชื้อสาเหตุของโรค

นี้ถ่ายทอดโดยวิธีกล การทาบกิ่ง, โดยแมลงพาหะ *Aphis fabae*, *Aphis gossypii* (Taylor and Greber, 1973), การตัดแต่งกิ่ง และการเสียบยอด (ณรงค์ชัย, 2550) ไม่ถ่ายทอดทางเมล็ด (Koizumi, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) ในกลุ่ม Cucumovirus ทำให้เกิดโรค woodiness virus ซึ่งเชื้อไวรัสมีลักษณะอนุภาคกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร ทำให้เกิดอาการใบด่าง ใบด่างเหลือง ใบยอดบิดและหงิกงอ ผิวใบไม่เรียบ ผลบิดเบี้ยว ขนาดของผลเล็กลง เนื้อผลไม่เรียบ เชื้อ CMV นี้ถ่ายทอดโดยวิธีกล การทาบกิ่ง และแมลงพาหะ *Myzus persicae* (Smith, 1972) อาการของ woodiness virus นี้ ยังมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ PWV ร่วมกับ CMV ด้วย (Taylor and Kimble, 1964) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบเชื้อไวรัสชนิดอื่นในเสาวรส คือ Passiflora virus Y (*Potyvirus*) (Parry *et al.*, 2004), Puerto rican passionfruit virus (*Potyvirus*) (Niblett *et al.*, 1991), Passionfruit leaf mottle (*geminivirus*) (Brown *et al.*, 1993), Sri Lanka passionfruit mottle virus (*Potyvirus*) (Dassanayake and Hicks, 1992), Passionfruit mottle virus (*Potyvirus*) (Chang, 1992), Passiflora ringspot virus (*Potyvirus*) (De Wijs, 1974), Passionfruit yellow mosaic virus (*Tymovirus*) (Crestani *et al.*, 1986), Tomato ringspot virus (*Nepovirus*) (Koenig and Fribourg, 1986), Passionfruitvein-clearing (*Rhabdovirus*) (Kitajima and Crestani, 1985), Passionfruit nucleorhabdovirus (*Rhabdovirus*) (Brunt *et al.*, 1996), Maracuja mosaic virus (*Tobamovirus*), Telosma mosaic virus (Chiemsoombat *et al.*, 2014) และ Purple granadilla mosaic virus (*Tymovirus*) (Chagas *et al.*, 1984)

คุณสมบัติของ *Potyvirus*

ไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* จัดอยู่ในวงศ์ *Potyviridae* โดยไวรัสในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ คือ สาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดความเสียหายในพืช มีจีโนมเป็นแบบ monopartite มีกรดนิวคลีอิกเป็นแบบสายบวก เส้นเดี่ยว (single-stranded positive sense RNA) ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-enveloped) จีโนมทั้งหมดขนาดประมาณ 9,700 นิวคลีโอไทด์ กำหนดการสังเคราะห์โพลีโปรตีนเพียงชนิดเดียว (single polyprotein) ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์ผลผลิตอย่างน้อย 8 ชนิด บางครั้งพบการสังเคราะห์ได้ถึง 10 ชนิด ที่ตำแหน่งปลาย 3' ของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (coat protein) โดยมีการจัดชนิดของจีโนมดังนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การจัดชนิดของจีโนมของไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus*

ชนิดของจีโนม	ขนาด (kDa)	หน้าที่
P1 Protein	32.4	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
HC-Pro	51.9	Helper component (insect transmission)
P3 Protein	41.5	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
6K1	6.0	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
CI	71.4	กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน cylindrical inclusion ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายโครงสร้างอาร์เอ็นเอจากเซลล์สู่เซลล์ (cell to cell movement)
6K2	5.5	ไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน
VPg	21.7	Genome-linked protein
NIa-pro	27.7	กำหนดการสังเคราะห์ Nuclear Inclusion Proteinase
NIb	59.8	กำหนดการสังเคราะห์ Nuclear Inclusion Polymerase
CP	29.8	กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

PWV เป็นเชื้อสาเหตุหลักที่เข้าทำลายเสาวรสจัดอยู่ในกลุ่ม *Potyvirus* มีรายงานพบครั้งแรกที่รัฐควีนแลนด์ นิวเซาท์เวลส์ และออสเตรเลียตะวันตก ประเทศออสเตรเลีย (Taylor and Kimble, 1964) ส่วนในประเทศไทย ดวงใจและคณะ (2529) ได้ศึกษาและสำรวจโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสของเสาวรสที่บริษัทสยามอุตสาหกรรม จังหวัดระยอง ในปี 2528-2529 พบลักษณะอาการใบด่างถึงร้อยละ 100 ของตัวอย่างเสาวรส และทำให้ผลผลิตลดลงกว่าร้อยละ 50 โดยพบว่าเชื้อสาเหตุของโรคคือ PWV

คุณสมบัติของ PWV

ลักษณะทางสัณฐานอนุภาค PWV มีรูปร่างแบบท่อนยาวคด ไม่มีเยื่อหุ้ม ขนาดยาวประมาณ 670-745 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร (Taylor and Greber, 1973)

คุณสมบัติทางกายภาพในประเทศญี่ปุ่น Iwai *et al.*, (1996) ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ PWV isolate AO พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมคุณสมบัติ (TIP) 55-60

องศาเซลเซียส การเจือจางเพื่อหา Dilution end-point (DEP) อยู่ในช่วง 10^{-4} - 10^{-5} และความคงทนของเชื้อไวรัสในน้ำคั้นที่เก็บไว้ในระดับอุณหภูมิห้อง (LIV) 2-3 วัน ในขณะที่ประเทศไทย วันทนี (2545) ทำการศึกษาคุณสมบัติของ PWV จากตัวอย่างเสาวรสีในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่า TIP เท่ากับ 55-60 องศาเซลเซียส DEP อยู่ในช่วง 10^{-4} - 10^{-5} และ LIV 3-4 วัน

พืชอาศัย PWV สามารถเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงคู่ได้ทั้งหมด 44 ชนิด ใน 5 วงศ์ (Taylor and Kimble, 1964; Teakle and Wildermuth, 1967) สำหรับพืชอาศัยประกอบด้วยพืชในกลุ่ม *Passiflora* จำนวน 10 ชนิด และ *Leguminosae* จำนวน 18 ชนิด

พบโครงสร้างโปรตีนของไวรัสเพียงชนิดเดียวโดยโปรตีนที่พบนั้นมีขนาด 3,300 Da เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย (cytopathology) พบอนุภาคไวรัสอยู่ในมิโซฟิลล์ และท่อลำเลียงพางเรงไคมาในไซโตพลาสซึมและภายในเซลล์ที่ถูกไวรัสเข้าทำลายยังพบ inclusion body 2 แบบ คือ pinwheel inclusion และ scroll inclusion พบในไซโตพลาสซึมของใบเสาวรสีที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย (Iwai *et al.*, 1996)

พบว่า PWV มีความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยาใกล้เคียงกับอนุภาค passiflora ringspot virus, bean common mosaic virus และ potato Y virus

Iwai *et al.* (1996) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทางซีรั่มวิทยาระหว่างไอโซเลต Passion fruit woodiness virus Amani Ohshima (PWV-AO) กับแอนติซีรั่มต่อไอโซเลต PWV-Brazilian (PWV-B), Soybean mosaic virus (SbMV) และ Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) จากผลการศึกษาพบว่า PWV-AO มีคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาล้ายกันกับ PWV-B มากที่สุด แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับ SbMV และ WMV-2 แสดงว่ามีความสัมพันธ์แตกต่างกันทางซีรั่มวิทยา

การป้องกันกำจัด วิธีการที่ดีที่สุด คือ การคัดเลือกต้นกล้าที่สมบูรณ์ปลอดจากเชื้อหรืออาการของโรคและต้านทานโรคไวรัส ไม่ควรปลูกปะปนกับพืชตระกูลแตง เมื่อนำต้นกล้างปลูกจนกระทั่งถึงเริ่มติดผล ควรพ่นยากำจัดแมลงพาหะเป็นระยะและระมัดระวังเครื่องมือที่ใช้ตัดแต่งกิ่ง โดยทำความสะอาดทุกครั้งที่ตัดแต่งต้นเสร็จในแต่ละต้นด้วยแอลกอฮอล์ (ณรงค์ชัย, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการพัฒนาให้เกิดขึ้นพืชที่สมบูรณ์จากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชเพียงชิ้นเล็ก ๆ การเลี้ยงจากเซลล์หรือการชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม มีผลทำให้พืชแสดงลักษณะที่แตกต่างจากต้นแม่เดิม การเกิดความหลากหลาย หรือการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เรียกเทคนิคนี้ว่า somaclonal variation (Larkin and Scwcroft, 1981) ความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ ทำให้เกิดประโยชน์โดยมุ่งเน้นประโยชน์ทางการปรับปรุงพันธุ์ นำความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นกับโซมาโคลนเหล่านี้มาคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ แต่การศึกษาถึงความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละพืชยังไม่ชัดเจนต้องทำการศึกษาให้ลึกซึ้งมากขึ้นเพื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

การเกิด somaclonal variation

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการเลี้ยงเซลล์รวมทั้งการคัดเลือกเซลล์ในอาหารสังเคราะห์เป็นระยะเวลานาน อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมได้ลักษณะใหม่ๆ เกิดขึ้น เรียกลักษณะที่เกิดการแปรผันที่เนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่า somaclonal variation

ความเป็นมาของ somaclonal variation ได้มีผู้ให้ความสนใจเมื่อประมาณ 30 ปีที่แล้วแต่ก่อนเข้าใจกันว่า พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเหมือนกันทั้งหมด ความเข้าใจนี้ค่อยๆ เปลี่ยนไปเริ่มตั้งแต่ Skirvin และ Janick (1976) เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่เน้นเกี่ยวกับเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตที่พันธุกรรมเหมือนกันและเน้นถึงความสำคัญของการเกิดความแปรผันของโคลน (clone) ต่างๆ เรียกว่า calliclone (พืชที่ได้มาจากการเลี้ยงแคลลัสจากส่วนลำต้นของพืช) ความแปรผันเกิดขึ้นในมันฝรั่งที่ได้เกิดจากการเพาะเลี้ยงโพโทพลาสต์จากใบว่า protoclon (พืชที่ได้มาจากการเลี้ยงโพโทพลาสต์จากส่วนของใบ) Larkin และ Scwcroft (1981) เสนอให้ใช้ somaclone สำหรับพืชที่ได้มาจากการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทุกรูปแบบ และใช้ somaclonal variation เป็นความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในระหว่างการเติบโตและการแปรสภาพของเซลล์ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหรือการคัดเลือกเซลล์ในสภาพต่างๆ

จากการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่จำนวนโครโมโซมจนกระทั่งเกิดความผิดปกติใน ดีเอ็นเอ การเกิดผิดปกตินี้อาจเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ

1. การเกิดความหลากหลายที่เกิดจากพันธุกรรม (genetic variability)

การเกิดความหลากหลายที่เกิดจากพันธุกรรม (genetic variability) เป็นการเกิดการกลายพันธุ์หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงแบบนี้มีผลต่อการเกิดความหลากหลายในกลไกต่าง ๆ ที่เกิดในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้โดยการเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวน ploidy ที่พบว่าเกิดขึ้นบ่อยมากในการเกิดความหลากหลายของโซมาโคลน คือ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมซึ่งการเปลี่ยนแปลงจำนวน ploidy อาจเกิดจากสาเหตุดังนี้คือ

1.1 การเกิดความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เช่นในวงจรของการแบ่งเซลล์ (cell cycle) ในระยะ interphase โดยเฉพาะในระยะการเพิ่มดีเอ็นเอ (DNA duplication) การขาดการสร้างเส้น spindle การแบ่ง cytoplasmic เป็นต้น

1.2 ในขณะที่พืชเจริญเติบโตในสภาพการเพาะเลี้ยงมีโอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวน ploidy จากการสังเกต และศึกษาเปรียบเทียบระหว่างพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยง กับพืชต้นแม่พันธุ์ที่นำมาเลี้ยง

1.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน จะทำให้จำนวนโครโมโซมเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

1.4 ส่วนประกอบของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มีส่วนให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวน ploidy เช่น อาหารที่เติม kinetin และ 2,4-D มีผลต่อการเปลี่ยนจำนวน ploidy

1.5 การเลือกส่วนของพืชที่จะนำมาเลี้ยง และอาหารที่เหมาะสมจะมีผลต่อความคงที่ของจำนวนโครโมโซม

2. การเกิดความหลากหลายที่เกิดจากสิ่งที่ไม่ใช่พันธุกรรม (epigenetic variability)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของนิวคลีอริคดีเอ็นเอการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของนิวคลีอริคดีเอ็นเอเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของ somaclone การเปลี่ยนแปลงอาจเป็นบริเวณใหญ่จนทำให้เกิดผลต่อยีนหลายยีนในเวลาเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลต่อการจัดเรียงลำดับของดีเอ็นเอทั้งโครงสร้างซึ่งอาจเกิดจาก

2.1 การเกิดการขาดหายไปของยีน (deletions)

2.2 เกิดการเรียงสลับกันของยีน (inversions)

2.3 เกิดการเพิ่มจำนวนยีน (duplications)

2.4 เกิดการเคลื่อนย้ายของชิ้นส่วนบนโครโมโซมไปที่ใหม่ (translocations)

นอกจากนี้การเกิด transposon สามารถทำให้เกิดความหลากหลายของ somaclone ได้ โดยที่ transposon หรือ transposable element เคลื่อนย้ายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไปแทรกในส่วนของดีเอ็นเอที่แปลรหัสได้ หรือยีนทำให้ยีนนั้นถูกรบกวนยีนจะเปลี่ยนไป ลักษณะที่แสดงออกก็จะเปลี่ยนแปลงไปด้วยการเกิดความหลากหลายที่เกิดจากสิ่งที่ไม่ใช่พันธุกรรม (epigenetic variability) การเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetic ทำให้เกิดความหลากหลายของ somaclone แบบชั่วคราว และเมื่อถึงระยะหนึ่งอาจกลับมาเกิดขึ้นได้ใหม่ แต่บางครั้งก็อาจเกิดตลอดชั่วอายุของพืชคือ การทำให้ดูสดชื่นแข็งแรงขึ้น (rejuvenation) การเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphology) เช่นการออกดอกเร็วขึ้น เพิ่มโอกาสที่จะสร้างรากแขนง การเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ epigenetic อาจเกิดจากสาเหตุของการเกิดการเติมกลุ่ม methyl ในลำดับของดีเอ็นเอ (DNA methylation) การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (DNA amplification) หรือการเกิดการกระทำของ transposable elements (transposons) Evans และคณะ (2003), Heinz และ Mee (1969) เป็นผู้หนึ่งที่สังเกตเห็นว่าอ้อยที่ชักนำให้เป็นต้นโดยผ่านการเกิดแคลลัสของกระบวนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดใบ และก้านช่อดอก ให้ลักษณะต้นที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาผิดปกติ และมีความแปรปรวนของจำนวนโครโมโซม จึงทำให้เป็นที่สนใจของนักวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจทำให้เกิดลักษณะใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อพืชนั้นๆ และสนองต่อความต้องการพืชที่มีคุณสมบัติที่ดีให้กับมนุษย์ได้ หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ดีขึ้นด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น ทำให้ผลผลิตต่อต้นเพิ่มมากขึ้น ทนทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช หรือแม้กระทั่งทนต่อสภาวะแห้งแล้ง (Jain, 2001) โดยเทคนิค somaclonal variation นั้นมีทั้งข้อดีและข้อเสียโดยสรุปดังนี้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ข้อดีและข้อเสียของ somaclonal variation

ข้อเสีย	ข้อดี
1. ไม่ได้ผลสำหรับลักษณะทางพืชไร่ที่มีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง	สามารถทำให้ลักษณะดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงได้
2. ลักษณะของพืชเปลี่ยนแปลงเพียง 2 ทิศทาง	มีความถี่ในการเกิดการเปลี่ยนแปลงสูง
3. ไม่สามารถพยากรณ์ได้ในธรรมชาติ	อาจพบลักษณะที่ไม่สามารถใช้วิธีปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม
4. การคัดเลือกโซมาโคลนในห้องปฏิบัติการไม่มีความเสถียร	การคัดเลือกโซมาโคลนในห้องปฏิบัติการสามารถคัดลักษณะด้านทานและทนทานได้ทั้งต่อปัจจัยชีวภาพและกายภาพ
5. โซมาโคลนที่คัดเลือกแล้วต้องนำไปคัดเลือกในแปลงอีกครั้งซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน	การคัดเลือกโซมาโคลนในห้องปฏิบัติการทำได้ในระยะเวลาสั้นๆ
6. โซมาโคลนไม่มีความเสถียรซึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการ DNA methylation และ transposon elements	ได้ประชากรจำนวนมากทำให้สามารถใช้คัดเลือกในห้องปฏิบัติการ

ที่มา: Jain, 2001.

ความสำคัญของเทคนิค somaclonal variation ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

ดังกล่าวมาแล้วว่าการพัฒนาต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสทำให้เกิดการกลายพันธุ์หรือเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากสูงถึง 10 % ต่อหนึ่งชั่วอายุ (regeneration) ซึ่งมากกว่าการใช้เทคนิคการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่น เช่น การใช้รังสี การใช้สารเคมี พืชที่เกิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือเรียกว่า เกิด somaclonal variation การคัดเลือกลักษณะที่ดีจากการดูแลลักษณะภายนอก จะได้พืชที่มีลักษณะที่ต้องการได้ทางหนึ่ง การคัดเลือกพืชให้มีลักษณะตามต้องการได้แก่ การคัดเลือกให้พืชต้านทานต่อโรค วัชพืช ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่างๆ รวมทั้งสภาวะเครียดต่อสารเคมี รวมทั้งการเพิ่มความสามารถในการผลิตสาร Secondary metabolites ต่างๆ การคัดเลือกในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ต้านทานต่อความเครียดต่อสภาวะแวดล้อม ความเครียดดังกล่าว ได้แก่ การทนความแล้ง ความเค็ม อุณหภูมิต่ำ ความเป็นพิษที่เกิดจากอนุมูลนิยม ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเกิดความเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาและพันธุกรรมในระดับเซลล์ที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ การคัดเลือกความต้านทานทำได้โดยการคัดเลือกเซลล์ในสภาพที่มีเกลือ มีอนุมูลนิยม มีอุณหภูมิต่ำคัดเลือกในสาร PEG ที่เป็นการกระตุ้นให้เกิดความเครียดของน้ำ

ตัวอย่าง การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์อ้อย ให้สามารถทนเค็มโดยการคัดเลือก somaclone ที่เพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัสก่อนที่จะพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ Prammane (2004) รายงานว่าการใช้ส่วนของยอดของอ้อยพันธุ์ต่างๆ 8 พันธุ์เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม 2, 4 - D (3 มก./ลิตร), glycine (2 มก./ลิตร), myo inositol (2 มก./ลิตร) น้ำมะพร้าว (15% ปริมาตร/ปริมาตร), น้ำตาล (20 กรัม/ลิตร) และวุ้น (7 กรัม/ลิตร) สามารถชักนำให้ทุกพันธุ์เกิดแคลลัส และทำการย้ายเนื้อเยื่อหลายครั้งก่อนนำแคลลัสมาคัดเลือกในอาหารเค็มเกลือ (1 % NaCl) พัฒนาเป็นยอดและคัดเลือกในอาหารที่เค็มเกลือ (2 % NaCl) พบว่า อ้อยพันธุ์ F 36- 819 สามารถทนและเจริญได้ในอาหารที่เค็มเกลือ (2 % NaCl) และเมื่อประเมินความหลากหลายของ somaclone ที่คัดเลือกได้เทียบกับต้นแม่ (donor plant) ด้วยวิธี RAPD พบขึ้น ดีเอ็นเอขนาด 995 bp. ในพันธุ์ที่เป็นโซมาโคลนที่คัดเลือกได้แต่ไม่พบในต้นแม่พันธุ์

การคัดเลือกพืชต้านทานอนุมูลนิยมจากรายงานของ Van Sint Jan และ Bouharmon (1989) คัดเลือก somaclone ของข้าวเพื่อปรับปรุงให้ต้านทานอนุมูลนิยม โดยใช้พืช 2 ชนิด ที่อ่อนแอ โดยคัดเลือกในอาหารเพาะเลี้ยง ทำในระยะที่เป็นแคลลัส และในช่วงที่พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ พบว่าทั้ง 2 ช่วง สามารถปรับปรุงให้พืชมีความสามารถต้านทานอนุมูลนิยม โดยเปรียบเทียบกับต้นแม่ที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง การศึกษาทดสอบต้นกล้าอายุ 80 วัน ในอาหารเหลวที่มี unchelated ion ,

pH 3.85 ฟอสฟอรัส และแคลเซียมความเข้มข้นต่ำ ($1500 \text{ micro - dtg l}^{-1}$) ของอลูมิเนียมซึ่งความเข้มข้นของอลูมิเนียมนี้เป็นพืชต่อพืชที่มีความอ่อนแอ เห็นได้ชัดว่ามีพืชบางส่วนต้านทานต่ออลูมิเนียม และเมื่อตรวจสอบการสะสมอลูมิเนียมในใบพบว่าพืชต้านทานจะมีการสะสมอลูมิเนียมจำนวนน้อยกว่าพืชที่ไม่ได้ทำการคัดเลือก

การทดลองของ สิริภัทร์และภัทรวดี (2543) ใช้เทคนิคเครื่องหมาย RAPD ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างโคลนพันธุ์อ้อยปกติ และโคลนพันธุ์อ้อยทนเค็มที่คัดเลือกได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า มีจีนดีเอ็นเอจำนวนหนึ่งที่พบในโคลนพันธุ์ทนเค็ม แต่ไม่พบในโคลนปกติ และให้ความเห็นสนับสนุนการพัฒนาโคลนพันธุ์อ้อยให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและมีประสิทธิภาพด้วยการเพาะเลี้ยงแคลลัสภายในห้องทดลอง

การทดลองของ Toyoda และคณะ (1989) ได้ทำการคัดเลือกยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow) ต้านทานโรคไวรัส TMV (Tobacco mosaic virus) โดยใช้เทคนิค Somaclonal variation จากการทดลองนำตาข้างของยาสูบที่เป็นโรคไวรัส TMV มาชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาให้เกิดยอด ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า มียอดยาสูบที่ปลอดจากเชื้อไวรัส TMV ซึ่งแสดงว่าสามารถคัดเลือกพืชต้านทานโรคโดยใช้เทคนิค Somaclonal variation ได้สำเร็จ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้เซลล์พืชสามารถเปลี่ยนพันธุกรรมได้ โดยเกิดการสร้างความผันแปรทางพันธุกรรม หรือ Somaclonal variation ในสภาพการเพาะเลี้ยง และถ้าความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับเซลล์นี้เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก การกลายพันธุ์ก็จะเกิดขึ้นในช่วงกว้างจากการศึกษาของ กิ่งกาญจน์ (2545) ได้นำประโยชน์ของ Somaclonal variation มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ด้วยการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 บนอาหารสังเคราะห์ เซลล์ของข้าวหอมมะลิ 105 ที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นนี้ จะเกิดความแปรผันทางพันธุกรรมตามธรรมชาติ ในขณะที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ลักษณะความไม่ไวต่อช่วงแสงปรากฏขึ้นในลูกรุ่นที่ 1 และถ่ายทอดไปยังลูกรุ่นที่ 2 จนถึง 4 ในลูกรุ่นที่ 4 จำนวน 106 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสงได้ 5 สายพันธุ์ และมีลักษณะต้นเตี้ย แตกกอดี เมล็ดข้าวมีรูปเรียวยาว ข้าวเปลือกสีฟางข้าว กล้องสีขาว ท้องไข่น้อย ปริมาณอะไมโลสต่ำ มีกลิ่นหอม โดยเฉพาะสายพันธุ์ TC-7-3-1-3231 มีความหอมระดับ 3 การทดสอบความไม่ไวต่อช่วงแสงจะดำเนินการต่อเนื่องไปไปอีกจนถึงรุ่นที่ 6 เพื่อให้ลักษณะความไม่ไวต่อช่วงแสงเป็นลักษณะเสถียรซึ่งจะเห็นได้ว่าการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมตามธรรมชาติขณะเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือ Somaclonal variation นั้น บางครั้งอาจไม่ต้องใช้

สิ่งกลายพันธุ์ร่วมในการคัดเลือกก็ได้ อย่างไรก็ตามลักษณะที่ผันแปรไปจะเป็นประโยชน์ก็ต่อเมื่อมีการแสดงออกเมื่อถูกชักนำให้เป็นต้น และสามารถถ่ายทอดให้รุ่นลูกได้

ลักษณะที่เกิดจาก somaclonal variation พบได้ในพืชมากมายและมีรายงานในพืชหลายชนิด (ตารางที่ 4)



ตารางที่ 4 พันธุ์พืชที่รายงานจากการพัฒนาด้วยวิธี somaclonal variation

งานวิจัย	เอกสารอ้างอิง
1. Banana, Fusarium wilt resistance, commercial cultivar	Hwang, 1990
2. Wheat, High yield, released as new cv 'He Zu No.8	Gao <i>et al.</i> , 1991
3. <i>Lathyrus sativus</i> , reduced neurotoxin in feed grain, high yield,early maturing, new cultivar released as P-24	Mehta <i>et al.</i> , 1994 Chakrabarti <i>et al.</i> , 1999
4. Potato, non-browning, released cv 'White Baron'	Arihara <i>et al.</i> , 1995
5. Maize, variant for grain and forage use, cultivar 'Yidan No.6	Gu <i>et al.</i> , 1991
6. Blackberry, thornless, released in NZ as cv Lincoln Logan	Hall <i>et al.</i> , 1986
7. Flax, salt & heat tolerance in the same somaclone, released as cv ANDRO	O'Connor <i>et al.</i> , 1991
8. Celery, <i>Fusarium</i> R, released cv UC-TC	Heath-Pagliuso & Rappaport, 1990
9. Celery, <i>Fusarium</i> yellows resistance (<i>F. oxysporum</i>) line MSU-SHK5	Lacy <i>et al.</i> , 1996
10. Celery, insect resistance (<i>Spodoptera exigua</i>), <i>Fusarium</i> yellow R somaclones K-26, K-108, & K-128 were also insect resistant,being integrated in breeding	Diawara <i>et al.</i> , 1996
11. Tomato, <i>Fusarium</i> R, variety DNAP-17	Evans, 1989
12. Tomato, Tomato high solid contents, var DNAP9	Evans, 1989
13. <i>Brassica juncea</i> , high yield, shattering resistant, cv releasedPusa Jai Kisan	Katiyar & Chopra, 1995
14. <i>Paulownia tomentosa</i> , cultivar Snowstorm	Marcotrigiano & Jaganathan, 1988
15. Cymbopogon (aromatic grass, 50–60% increased oil yieldreleased cv CIMAP/Bio-13	Mathur <i>et al.</i> , 1988
16. Capsicum, yellow fruit, cv Bell sweet	Morrison & Evans, 1988 Morrison <i>et al.</i> , 1989
17. Capsicum, early maturing and high yielding, cv A-D4'	Xu & Chen, 1995

ตารางที่ 4 (ต่อ)

งานวิจัย	เอกสารอ้างอิง
18. Sweet potato, cultivar Scarlet	Moyer & Collins, 1983
19. Rice, <i>Picularia</i> resistance, improved cooking quality, released cultivar DAMA	Heszky & Kiss, 1992
20. Rice, submergence tolerance, excellent tol, line FR13A	Adkins <i>et al.</i> , 1990
21. Rice, <i>Rhizoctonia</i> resistance, germplasm released LSBR- 33 LSBR-5	Xie <i>et al.</i> , 1992
22. <i>Cyanodon dactylon</i> , fall armyworm (<i>Spodoptera</i>) resistance P1572566 = Brazos-R3	Croughan <i>et al.</i> , 1994
23. <i>Haemerocallis</i> spp., Dwarf, short flowers, male sterile, released cv Yellow Tinkerbelle	Griesbach, 1989
24. <i>Torenia founieri</i> , white flowers, compact plant released cv Uconn White	Brand & Bridgen, 1989

(ตารางนี้รวบรวมโดย Phil Larkin, Australia on internet plant tissue culture news group)

ที่มา: Jain, 2001.

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของโซมาโคลนในพืชที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ลักษณะต่างๆ ที่เกิด somaclonal variation และพบได้ในพืชหลายๆ ชนิด จะระบุว่าเกิดการแปรผันสังเกตได้ค่อนข้างง่าย ถ้าพบว่าฟีโนไทป์เปลี่ยนไป และลักษณะที่เกิดจาก somaclonal variation นั้นจะตรวจพบได้อย่างไรว่าเกิดความแปรผันขึ้นถ้าฟีโนไทป์ไม่เปลี่ยนแปลง โดยทั่วไปการศึกษาทาง ไซโตเจเนติก และลักษณะภายนอกที่แสดงออก เป็นวิธีการที่ใช้กันทั่วไป แต่ปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทในการประเมินความหลากหลายและเพิ่มความแม่นยำรวดเร็วมากขึ้น

1. การประเมินความหลากหลายโดยดูลักษณะภายนอกที่แสดงออก

จากการทดลองของ Patnaik และคณะ (1999) โซมาโคลนจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวของ palmarosa grass ที่ปลูกในโรงเรือน อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 150 ต้น ต่อหนึ่งชุด ย้ายมาปลูกในกระถางใหญ่ เป็นเวลาประมาณ 4 เดือน สิ่งที่น่าสนใจคือ นับจำนวนการแตกกอ (tiller) ความสูง เป็นเซนติเมตร ชั่งน้ำหนักโดยการตัดพืชให้เหนือดินประมาณ 20 เซนติเมตร วัดปริมาณน้ำมัน (oil content) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักสด โดยมีต้นแม่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (donor plants) ที่มีอายุเท่ากันเป็นตัวแทนควบคุม จากการวัดและเปรียบเทียบผลข้างต้น แบ่งพืชเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 โคลนที่มีผลผลิตสูง ให้ปริมาณน้ำมันและสาร geraniol สูง, กลุ่มที่ 2 โคลนที่มีผลผลิตสูงและมีปริมาณน้ำมันสูง, กลุ่มที่ 3 โคลนที่ให้ผลผลิตต่ำ แต่ให้ปริมาณน้ำมันและ สาร geraniol สูงและ กลุ่มที่ 4 โคลนที่ให้ผลผลิตปานกลาง มีปริมาณน้ำมันและสาร geraniol สูงพืชที่ถูกคัดเลือก วางแผนการทดลองโดยปลูกแบบ randomized block design จากการบันทึกผล หาค่าเฉลี่ยของการทดลองเป็นค่า C.D. ที่ 0.05 % และ 0.01 % probability levels เปรียบเทียบค่าคงที่ของความแปรปรวน และผลจากการสังเกตกับพืชเริ่มต้น (donor plant) จากผลการบันทึก 120 โคลน พบว่า 8 โคลน ต้นเตี้ยประมาณ 85–95 ซม. เปรียบเทียบกับ donor plant ที่มีความสูง 127 ซม. 15 โคลน มีความสูงประมาณ 177 ซม. จาก 120 โคลน เห็นความแตกต่างของลักษณะอื่น ได้แก่ จำนวนต้นต่อปริมาณน้ำมัน น้ำหนัก เป็นต้น จากการทดลองพบว่าได้ต้นที่มีปริมาณน้ำมันสูงกว่า donor plant อย่างชัดเจน

2. การประเมินความหลากหลายโดยใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์ของเซลล์

ตรวจสอบความแปรผันในระดับโครโมโซม โดยทำแคโรไทป์ใช้วิธีการเตรียมสไลด์เพื่อศึกษารูปร่างของโครโมโซมพืช และจำนวนโครโมโซมจากส่วนของรากหรือใบอ่อนโดยใช้เทคนิค squash เลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะ prometaphase หรือ metaphase มีโครโมโซมกระจายตัวดีและไม่ทับซ้อน ถ้าโครโมโซมมีขนาดเล็ก ขยายโครโมโซมในภาพให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและเห็นรูปร่างโครโมโซมชัดเจน คัดโครโมโซมแต่ละโครโมโซมมาเรียงตามขนาดและชนิดของโครโมโซม ได้เป็นรูปแบบ แคโรไทป์ซึ่งใช้ตรวจสอบโครโมโซมว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ทั้งจำนวนและโครงสร้าง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโครโมโซมอาจเกิดจากการเรียงตัวใหม่ การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครมาทิดและ/หรือการแทรกของสารพันธุกรรมที่เคลื่อนย้ายได้ (พันธุกรรมสัจจร) (นิคยศรี, 2551)

3. การประเมินความหลากหลายโดยใช้วิธีที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความแปรผันที่เกิดขึ้นในระดับดีเอ็นเอหรือนิวคลีโอไทด์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับดังกล่าว อาจไม่ทำให้ฟีโนไทป์เปลี่ยนแปลงไปจะใช้วิธีทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ตรวจสอบความแปรผันที่เกิดขึ้นในระดับโครโมโซมแต่ไม่สามารถบ่งชี้ได้ เพราะไม่พบความแตกต่างของโครโมโซม ดังนั้นจึงต้องใช้การตรวจสอบที่ละเอียดขึ้นโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตามที่กล่าวมาข้างต้นว่าการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดจากพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจเกิดจากความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม หรืออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงชั่วคราว ดังนั้นการศึกษาถึงความเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากพันธุกรรมจึงเป็นเรื่องจำเป็น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เป็นวิธีการหนึ่งที่ให้ผลและมีประสิทธิภาพสูงมีหลายวิธีได้แก่

3.1 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นวิธีการแรกที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของโซมาโคลนเป็นวิธีที่ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ร่วมกับการใช้ตัวตรวจที่มีความเฉพาะ โดยตรวจด้วยเทคนิคการ hybridization แต่วิธีการนี้จะต้องทราบลำดับเบสของตัวอย่างที่ใช้และต้องเตรียมตัวตรวจโดยการโคลนซึ่งยุ่งยากเกินกว่าจะใช้ตรวจทั่วไป

ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาจาก

บางส่วนของดีเอ็นเอขนาดยาวที่ใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่างๆ เลียนแบบการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*in vivo* DNA replication) จุดเด่นของเทคนิค พีซีอาร์ คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนในการทำงานและการใช้เวลาน้อย ต่อมาได้พัฒนาและปรับปรุงในหลายๆ ด้านเพื่อให้วิธีการในการปฏิบัติงานง่ายขึ้น (เพชรรัตน์, 2545) วิธีดังกล่าวได้แก่ วิธีRAPD, AFLP, SSR เป็นต้น

3.2 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (William และคณะ, 1990) เป็นวิธีการที่ไม่ต้องทราบข้อมูลของลำดับเบสของตัวอย่างที่ใช้ศึกษา โดยออกแบบและใช้ primer เพียงเส้นเดียว primer นี้จะมีขนาดลำดับเบส 8 – 10 เบส เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอ และใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจะถูกวิเคราะห์โดยเครื่อง electrophoresis และดูรูปแบบของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับ

3.3 Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Vos และคณะ, 1995) AFLP เป็นวิธีการศึกษา DNA fingerprinting โดยการใช้ PCR เทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นดีเอ็นเอ จากการตัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ใช้ศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ขั้นตอนก็คือ ตัดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 เอนไซม์ เอนไซม์ตัวหนึ่งจะตัดดีกว่าเอนไซม์อีกตัว นำชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดแล้วมาเชื่อมต่อกับadapter ที่เป็นเส้นคู่ที่ประกอบด้วยลำดับเบสที่เป็นลำดับเบสที่เฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ที่ใช้ตัดข้างต้นทั้ง 2 ตัว เตรียมคัดเลือกรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (pre-selective amplified) ด้วยเทคนิค PCR ใช้ primer ที่ออกแบบให้มีลำดับเบสที่เฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์และมีเบสเดียวที่ใช้ในการต่อลำดับดีเอ็นเอ (extension) ที่ปลาย 3' ต่อไป เลือกรับเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ใช้ชิ้นส่วนของ Pre – selective amplified เป็นต้นแบบ (template) และใช้ primer เดียวกับข้างต้นที่ใช้กับ Pre – selective amplified แต่ที่ปลาย 3' จะต้องเพิ่ม nucleotide อีก 2 nucleotide และ primer จะต้องติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี หรือฟลูออเรสเซนต์ เฉพาะชิ้นที่สามารถจับคู่กับ nucleotide ที่ปลายทั้ง 2 และตรงกลางเท่านั้นจึงจะสามารถเพิ่มปริมาณได้ การวิเคราะห์ผลตรวจด้วยเครื่อง electrophoresis เพื่อแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ รูปแบบของดีเอ็นเอจะวิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

3.4 Microsatellites หรือ SSR เป็นลำดับเบสสั้นๆ ขนาด <100 bp ที่เป็นลำดับเบสซ้ำสองหรือซ้ำสามนิวคลีโอไทด์ (di or tri nucleotide repeats) ลำดับเบสนี้จะมีขนาดแตกต่างกัน ทำให้เกิด polymorphic สูงใช้เป็นไพรเมอร์ ในการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอนี้จะใช้เป็น marker ในการวินิจฉัยความแตกต่างของพันธุ์

ตัวอย่าง ได้แก่ การประเมินความหลากหลายของโซมาโคลนของกล้วย (*Musa SPP.*) ที่คัดเลือกโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อหาพันธุ์ต้านทานโรค yellow Sigatoka โดยใช้ต้นแม่ (donor plants) ที่อ่อนแอต่อโรคเป็น triploid จากโคลนของกลุ่ม Cavendish ใช้ส่วนของตาข้าง โดยการเพิ่มจำนวนตาข้างด้วยการใช้ 6- Belcylaminopurine ความเข้มข้นสูง ประเมินความหลากหลายด้วยวิธี RAPD พบว่าใน 12 primer มี 4 primer ที่ให้ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอในพันธุ์ต้นแม่ (donor plant) พันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทาน ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนและยังให้ข้อสังเกตว่า primer ที่มีจำนวน G และ C สูงและความยาวของ primer มีส่วนอย่างมากต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และที่สำคัญความแตกต่างนี้ยังพบจากการสังเกตลักษณะภายนอก ทั้งทางโครงสร้างภายนอกและภายใน ที่มา: <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/00000723/0000072349.html>

การใช้วิธี RAPD ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพีช (*Prunus persica* (L.) Batsch) ที่เพาะเลี้ยงจาก embryo callus cultures ซึ่งเป็นตัวอย่างหนึ่งของการใช้เทคนิคนี้ในการปรับปรุงพันธุ์ที่ได้ผลและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับไม้ผลอื่นได้ ที่มา: <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/00000723/0000072349.html>

การประเมินด้วยวิธี AFLP มีรายงานในมันสำปะหลังที่พัฒนาจาก friable embryogenic callus (FEC) โดย Schreuder และคณะ (2003) FEC เป็นวิธีที่เลี้ยงได้รวดเร็วเพียงเริ่มจากเซลล์ไม่กี่เซลล์ พบความแตกต่างในสายพันธุ์ คือ TMS 6044 ที่อายุ 28 เดือน มีมากกว่า 85 % ที่มีรูปร่างปกติ Adira 4 ที่อายุ 11 เดือน ต้นที่พัฒนาได้ผิดปกติหมด และ R60 ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้น โดยเปรียบเทียบกับการพัฒนาเป็นต้นโดยไม่ผ่าน FEC พีชเหล่านี้ ปลูกลงในโรงเรือนและประเมินความหลากหลายของโซมาโคลนเหล่านี้ด้วยวิธี AFLP

มีการรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในพืชต่างๆ เช่น Isabel และคณะ (1993) ใช้ RAPD เป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบต้นกล้าไม้ป่า (*Picea maraina*) ที่ได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโอ และ Brown และคณะ (1991) ใช้ RFLP เป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบข้าวโพดที่ชักนำจากแคลัส Muller และคณะ (1990) ใช้ RFLP เป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบโซมาโคลนของข้าว ทั้ง 3 กรณี รายงานว่ายังตรวจสอบไม่พบความแตกต่างที่เกิดจาก somaclonal variation ในรุ่นลูกและพ่อแม่ได้ ต่อมา Brown และคณะ (1993) ใช้ RAPD เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบต้นอ่อนข้าวสาลี (*Triticum Tauschii*) ที่ได้จากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีฟิโนไทป์ปกติ พบว่ามีแถบ RAPD บางแถบที่แตกต่างไป ซึ่งได้ผลในการทำงานเดียวกับที่ Godwin และคณะ (1997) ใช้ RAPD เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบข้าวที่เป็น non-variant จากสมาชิกของครอบครัวที่มี somaclonal

variation ออกจากพ่อแม่ได้ ซึ่งพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในรุ่น R_1 (เป็นพืชที่ได้จากการผสมตัวเองของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพบ somaclonal variation, R_0) ได้เป็นโฮโมโลกัสของยีนข่มหรือยีนแฝง แต่การเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอไม่สามารถตรวจสอบได้ทางฟีโนไทป์ ซึ่งมีคำอธิบายที่เป็นไปได้ดังนี้

- พืชที่เติบโตภายใต้สภาพเรือนกระจกและมีการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์หลักในสภาพที่ขาดน้ำ พืชที่เติบโตในแปลงทดลอง จะวัดความผันแปรที่เกี่ยวกับผลผลิตหรือองค์ประกอบของผลผลิต ซึ่งพืชที่อยู่ในแปลงทดลองจะพบสภาพเครียดต่างๆ ในช่วงกว้าง สายพันธุ์ ที่เป็น non-variant พบว่ามีความผันแปรได้ตั้งแต่หนึ่งไปจนถึงหลายลักษณะ

- สัดส่วนของแถบที่ตำแหน่งต่างๆ ของ RAPD ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จะมีความแปรผันในบริเวณที่มีการเรียงลำดับเบสที่ซ้ำกันมาก (highly repeated sequence DNA) ซึ่งไม่ได้มีผลต่อฟีโนไทป์ จากปฏิกิริยาของ PCR การเกิดแถบ RAPD เป็นบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำกันมาก และไม่มีการลอกรหัสในบริเวณนี้ พบได้ในข้าวสาลี จากการรายงานของ Devos และ Gale (1992) ดังนั้นความแปรผันที่พบในข้าว อาจไม่ได้เป็นตัวแทนของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับเบสช่วงที่มีการแสดงออก โดยเฉพาะ 50 เปอร์เซ็นต์ของจีโนมข้าว เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเพียง 1 ชุด (single copy DNA) (McCouch และคณะ, 1988)

มิวเตชันของยีนในสภาพโฮโมโลกัส ในอดีตได้ตรวจพบในโซมาโคลนของข้าวโดยดูจากฟีโนไทป์มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1981-1985 จากการทดลองของ Godwin และคณะ (1997) ได้ยืนยันว่ามิวเตชันแบบได้เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวอินดิกา สายพันธุ์ FR 13 A แถบ RAPD ที่เป็นทั้งโฮโมโลกัสของยีนข่มและยีนแฝง เกิดการเปลี่ยนแปลง เข้าสู่ภาวะ polymorphism เกิดขึ้นในบริเวณที่มีลำดับเบสเป็น non-coding หรือ อาจเปลี่ยนแปลงจีโนมไมโทคอนเดรีย หรือ คลอโรพลาสต์ สมมติฐานนี้จะยืนยันได้เมื่อมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นซึ่งได้จากการศึกษาของ Kunanuvachaidach (1994) รายงานว่าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวอินดิกา สายพันธุ์ FR 13 A มีการเกิด somaclonal variation น้อยที่สุดเมื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐาน แต่จากการยืนยันโดยใช้ RAPD วิเคราะห์ในรุ่นลูกที่เกิด somaclonal variation ของสายพันธุ์ FR 13 A โดย Godwin และคณะ (1997) พบว่ามีความแปรผันสูงกว่าที่พบในรุ่นลูกของข้าวสายพันธุ์อื่นๆ

การใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ เพื่อการตรวจสอบโรคของเสาวรสที่เกิดจากเชื้อไวรัส

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านอนุชีวโมเลกุลเข้ามามีบทบาทในการศึกษาทางด้านโรคพืชมากขึ้น โดยพบว่าเทคนิคพีซีอาร์ถูกนำมาตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การศึกษารูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) แบบต่างๆ ของเชื้อสาเหตุโรค เพื่อให้ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรม ใช้ประโยชน์ทั้งด้านการจัดการจำแนกอนุกรมวิธาน และศึกษาวิวัฒนาการ ซึ่งนำไปสู่การวิเคราะห์ศึกษา ด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นต้น (เพชรรัตน์, 2545)

เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งสามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการจากอาร์เอ็นเอต้นแบบ ทำให้มีการพัฒนาวิธีการดังกล่าวเพื่อตรวจสอบหาไวรัสที่มีกรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอ ทั้งในเนื้อเยื่อพืชและแมลงพาหะ (ปรียพรรณ, 2543) การตรวจสอบไวรัสด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูง สามารถตรวจไวรัสที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่าวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ถึง 10,000 เท่า ในไวรัสบางชนิด เช่น Potato leaf roll virus (PLRV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Nepovirus* (Van den Hruvel and Peters, 1989; Rowhani *et al.*, 1995) พัฒนาเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบไวรัสของไม้เนื้อแข็งในกลุ่ม *Nepovirus* เช่น Cherry leaf roll virus (CLR) และในกลุ่ม *Ilarvirus* เช่น Apple mosaic virus (ApMV) เป็นต้น สามารถตรวจพบไวรัสได้ในระดับเฟมโตกรัมและมีความไวกว่าวิธี ELISA 10-100 เท่า สำหรับ *Potyvirus* พบว่า Nagata *et al.* (2001) ใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ในการตรวจสอบ Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) ในมันเทศ

นอกเหนือจากการผลิตต้นที่ต้านทานโรคแล้ว การตรวจหาไวรัสในพืชก็มีความสำคัญ สุดาพร (2548) ได้ทำการพัฒนาเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ เพื่อการตรวจสอบโรคของเสาวรสที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยนำเสาวรสที่มีอาการใบด่าง ใบบิดเบี้ยว ผลเล็กและผิดปกติ ในพื้นที่ปลูกเสาวรสในสถานีเกษตรหลวงปางดะ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ผลผลิตเสียหายอย่างรุนแรง มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* คือ Passion fruit woodiness virus (PWV) นำเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ มาตรวจหาไวรัสสาเหตุโรคพืช เมื่อนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบยืนยันผลการทดลองโดยการนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PWV สายพันธุ์ที่รายงานจากประเทศไต้หวันและญี่ปุ่นร้อยละ 81 ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าวิธีการตรวจสอบ PWV ด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช

Mekuria และคณะ (2003) รายงานว่าวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ น่าเชื่อถือ มีความไวสูงและมีความจำเพาะเจาะจงนั้น พบว่า อาร์ที-พีซีอาร์ มีความไวสูงในการ ตรวจสอบ Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) และ Prune dwarf virus (PDV) ในแอลมอนด์ ประเทศออสเตรเลีย เมื่อเปรียบเทียบกับตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ซึ่งทั้ง PNRSV และ PDV จัด อยู่ในกลุ่มเดียวกันคือ *Ilarvirus* ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อ แอลมอนด์สายพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศออสเตรเลีย โดยพบว่าไม่สามารถตรวจพบ PDV ในแอลมอนด์ที่ปลูกในออสเตรเลียด้วยวิธี ELISA ได้เนื่องจากเกิด graft compatibility ในการ ทดลองเมื่อใช้การตรวจสอบ PDV ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR พบว่า ให้ผลลบ แต่เมื่อใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับ nested PCR แล้วสามารถตรวจพบ PDV ได้ถึงร้อยละ 96 จากตัวอย่างแอลมอนด์ ทั้งหมด 175 ตัวอย่าง จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่าการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในพืชด้วย การใช้วิธี nested RT-PCR มีความไวสูงกว่าวิธี ELISA โดยสามารถตรวจพบไวรัสพืชได้อย่าง แม่นยำ

Dovas and Katis (2003) ทำการพัฒนาเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ ในการตรวจสอบ *Vitivirus* และ *Foveavirus* ในองุ่นเพื่อให้มีความไวและรวดเร็วในการตรวจสอบมากขึ้น ซึ่งในการทดลองใช้ วิธี อาร์ที-พีซีอาร์แบบขั้นตอนเดียว (One-step RT-PCR) โดยใช้ degenerate deoxyinosine-substituted primers เพื่อเพิ่มปริมาณในตำแหน่ง RNA depended RNA polymerase (RdRp) region ของเชื้อสาเหตุไวรัสทั้งสองกลุ่ม จากนั้นจึงนำผลผลิตของ RT-PCR มาทำปฏิกิริยา nested PCR เพื่อให้ได้ผลผลิตที่จำเพาะและมีความไวในการตรวจสอบมากขึ้น วิธีนี้ให้ผลที่เชื่อถือได้ในการ ตรวจสอบไวรัสทั้งสองชนิดในองุ่นและยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ประหยัด เหมาะกับการ นำไปใช้ในการวิเคราะห์ที่มีจำนวนตัวอย่างปริมาณมาก

Jawdah (2002) ได้ทำการพัฒนาเทคนิคที่ให้ผลเชื่อถือได้และรวดเร็วในการตรวจสอบ Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Crinivirus* วงศ์ *Closteroviridae* มี รายงานว่าพบไวรัสชนิดนี้ในยุโรป (Celix และคณะ, 1996) ต่อมา Rubio และคณะ (2001) ทำการศึกษาไวรัสชนิดนี้จำนวน 71 ไอโซเลท จากตัวอย่างพืชจากประเทศจอร์แดน เลบานอน ซาอุดีอาระเบีย สเปน ตุรกี และอเมริกาเหนือ พบว่าเชื้อไวรัสไอโซเลทเหล่านี้ แบ่งได้เป็นสองกลุ่ม โดยลักษณะอาการเริ่มจากเส้นใบด่างบริเวณส่วนกลางของใบ และอาการที่เป็นลักษณะใบเหลือง และมีอาการของโรครุนแรงมากขึ้น ในส่วนของผลมีลักษณะเหมือนปกติ แต่พบว่าสูญเสียมูลค่า ของผลผลิตลดลงถึงร้อยละ 50 ในการทดลองทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบพืชตระกูลแตง คือ แตงกวา น้ำเต้า และแตงไทย ที่แสดงอาการของโรคแล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งผลจาก

การทดลองพบว่าเทคนิค RT-PCR สามารถตรวจสอบ CYSDV ในพืชทดสอบที่แสดงอาการใบเหลืองได้ และเป็นวิธีที่ให้ผลเร็ว เชื่อถือได้ และง่ายต่อการตรวจสอบ

สำหรับการศึกษาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus มีรายงานว่าการศึกษาของ Nagata และคณะ (2001) ได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจหาเชื้อ SPFMV สาเหตุของโรค Russet crack ในมันเทศ โดยเปรียบเทียบการสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัส 3 วิธี คือ ใช้ Guanidine thiocyanate-phenol (ISOGEN™), SDS-phenol หรือ CF-11 cellulose column พบว่าวิธีแรกให้ปริมาณของอาร์เอ็นเอทั้งหมดสูงสุด (39.0 ไมโครกรัม จากตัวอย่างพืช 0.1 กรัม) และใช้เวลาในการสกัดน้อยที่สุด ซึ่งทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์ cDNA จากปฏิกิริยา reverse transcriptase จากนั้นทำพีซีอาร์ ด้วยการใช้นิเอร์ม rTaq DNA polymerase เป็นวิธีที่ให้ความไวสูง และสามารถตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอได้ ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจสอบไวรัสในตัวอย่างพืชได้ แม้จะมีปริมาณเพียง 0.2 พิโคกรัม จากอาร์เอ็นเอทั้งหมด

ในการตรวจสอบเชื้อ Plum pox potyvirus (PPV) สาเหตุของโรค Sharka ในพืชกลุ่ม *Prunus* spp. (เช่น ท้อ พลัม และบ๊วย) จากด่านกักกันพืช Australian Quarantine and Inspection Service (AQIS) ที่สนามบินนานาชาติซิดนีย์ ประเทศออสเตรเลีย โดย Davis และคณะ (2002) สามารถตรวจสอบ PPV ในตัวอย่างพืชจากส่วนใบ (leaf tissue) เปลือกไม้ (bark tissue) และผล (fruit peduncle) โดยเทคนิค ELISA, RT-PCR และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ให้ผลบวก เฉพาะตัวอย่างที่ได้จากส่วนใบและเปลือกไม้ส่วนตัวอย่างที่ได้จากผลให้ผลเป็นลบ

สำหรับการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR ในส่วนของ reverse transcription ใช้ Superscript Reverse Transcriptase (Gibco BRL) จากนั้นใช้ cDNA เป็นแม่แบบ สำหรับการทำพีซีอาร์เมื่อได้ผลผลิตของพีซีอาร์แล้ว นำไปตรวจสอบโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) พบแถบของดีเอ็นเอขนาด 243 คู่เบส (bp) โดยผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบ PPV ในตัวอย่างพืชจากส่วนของผลด้วยวิธี RT-PCR แต่ไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธี ELISA จากตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งวิธี RT-PCR เป็นการตรวจสอบยืนยันผลการตรวจหา PPV ของ AQIS ณ สนามบินนานาชาติซิดนีย์ ดังนั้นการตรวจหา PPV ในตัวอย่างพืชที่ได้จากส่วนของผล ด้วยวิธี RT-PCR น่าจะเหมาะสมกว่าวิธีอื่น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการวิจัย

ใช้เสาวรสพันธุ์ส้มวงที่ปลอดโรคไวรัส จากผลงานวิจัยของ Prammanee *et al* (2011) โดย
ใช้ใบจากต้นเสาวรสที่อยู่ในห้องปฏิบัติการ

2. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรส

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 ตู้ Laminar Air Flow (Clean Dwyer MARK II)

2.1.2 pH meter (EUTECH pH 510)

2.1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.1.4 มีดผ่าตัด และคีมปากคีบขนาดต่างๆ

2.1.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (SANYO Labo Autoclave)

2.1.6 เครื่องชั่งสารเคมี (Precisa 100A-300M)

2.1.7 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดต่างๆ

2.2 สารเคมี

2.2.1 stock I (NH_4NO_3 และ KNO_3)

2.2.2 stock II ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

2.2.3 stock III ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KI และ CoCl_2)

2.2.4 stock IV (KH_2PO_4 , H_3BO_3 และ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

2.2.5 stock Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ Na_2EDTA)

2.2.6 vitamin (Thiamine HCl, Nicotinic acid และ Pyridoxine HCl)

2.2.7 plant growth regulator (2,4 Dichlorophenxyacetic acid, Benzyladenine และ Indole-3-butyric acid)

2.2.8 Glycine

2.2.9 Myo-inositol

2.2.10 Coconut juice

2.2.11 Sucrose

2.2.12 Agar

3. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของโคมะโคนในระดับ DNA

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 Horizontal electrophoresis GNA-200 (Pharmacia Biotech)

3.1.2 Power supply PowerPac 300 (Bio-Rad)

3.1.3 Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer)

3.1.4 Water bath

3.1.5 High speed centrifuge GS-15R (Beckman)

3.1.6 Vortex

3.1.7 UV-visible spectrophotometer ultrospec 30000 (Pharmacia Biotech)

3.1.8 Gel document (Flour-sTM MultiImager, Bio-Rad)

3.1.9 โกร้งบดตัวอย่าง

3.2 สารเคมี

3.2.1 Tris-Hydrochloride (USBiologica)

3.2.2 Ethylenediaminetetra acetic acid (Bio basic INC.)

3.2.3 Sodium chloride

3.2.4 β -mercaptoethanol (Merck)

3.2.5 SDS

- 3.2.6 Potassium acetate
- 3.2.7 Sodium acetate (Ajax Finechem)
- 3.2.8 Iso-propanol (Merck)
- 3.2.9 RNase (Promega)
- 3.2.10 Absolute ethanol (Merck)
- 3.2.11 Magnesium chloride
- 3.2.12 สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder และ lambda DNA/*Hind*III digest)
- 3.2.13 dNTPs (Invitrogen)
- 3.2.14 *Taq* DNA polymerase (Invitrogen)
- 3.2.15 Agarose(Vivantis)
- 3.2.16 Ethidium bromide 0.5 $\mu\text{g/ml}$
- 3.2.17 Tris Base (Vivantis)
- 3.2.18 Primer (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Sequence name	Sequence (5'-3')	T _A (°C)
1. Universal primer1	GTTTCGCTCC	32.00
2. Universal primer3	GTAGACCCGT	32.00
3. Universal primer6	CCCGTCAGCA	34.00
4. OPA-02	TGCCGAGCTG	34.00
5. OPA-04	AATCGGGCTG	32.00
6. OPA-08	GTGACGTAGG	32.00
7. OPA-01	CAGGCCCTTC	34.00
8. OPA-10	GTGATCGCAG	32.00
9. OPA-16	AGCCAGCGAA	32.00
10. OPA-18	AGGTGACCGT	32.00

4. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีในการคัดเลือกโซมาโคลนที่มีความสามารถต้านทานโรคไวรัสโดย การปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกล

4.1 ตัวอย่างพืชและอุปกรณ์

4.1.1 ใบเสาวรศที่เป็นโรคไวรัส PWV จากแปลงปลูกเสาวรศ สถานีเกษตรหลวงปาง
ดะ มูลนิธิโครงการหลวง อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่

4.1.2 โกร่งบดตัวอย่าง

4.2 สารเคมี

4.2.1 KH_2PO_4

4.2.2 Na_2HPO_4

4.2.3 ผงคาร์โบรันนัม

5. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจหาไวรัส PWV โดยใช้เทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

5.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

- 5.1.1 Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer)
- 5.1.2 High speed centrifuge GS-15R (Beckman)
- 5.1.3 Horizontal electrophoresis GNA-200 (Pharmacia Biotech)
- 5.1.4 Power supply PowerPac 300 (Bio-Rad)
- 5.1.5 Gel document (Flour-sTM MultiImager, Bio-Rad)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)
- 5.2.2 Agarose
- 5.2.3 1xTAE buffer (tris base 4.84 กรัม, glacial acetic acid 11.42 มิลลิลิตร, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 20 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร)
- 5.2.4 6x loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)
- 5.2.5 สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder)
- 5.2.6 Ethidium bromide 0.5 µg/ml
- 5.2.7 Primer (ดังตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 Degenerate primers ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Potyvirus* ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

ไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับเบส	ความยาว(bp)	กำหนดการ สังเคราะห์กรดอะมิโน	ขนาดของ ผลผลิต PCR (bp)
Pt1	upstream	5'- GTBTGGTGCATHGANAA YGGMAC-3'	23	VWIC(E/D)NG	327
Pt2	downstream	5'- ARDGCDGCDGYTTCAT YTG-3'	20	QMK(A/T)AAL	

หมายเหตุ: B คือ C, G หรือ T; D คือ A, G หรือ T; H คือ A, T หรือ C; M คือ A หรือ C; N คือ A, G, C หรือ T; R คือ A หรือ G และ Y คือ C หรือ T

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงโซมาโคลนของเสาวรสปันธุ์สีม่วง

1.1 การเตรียมอาหาร

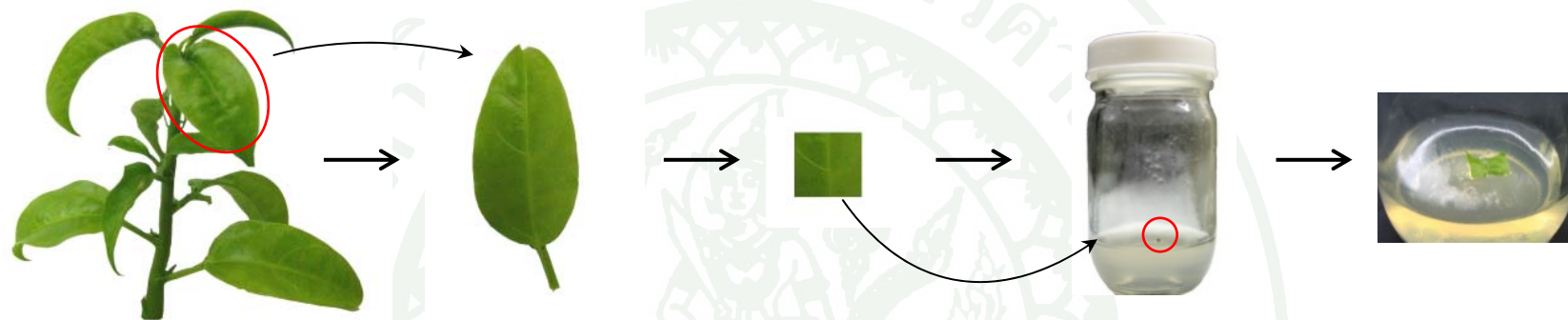
ซังสารเคมี เตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง (Stock Solution) สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (1962) ดังตารางภาคผนวก ก. เพื่อใช้เตรียมอาหารสูตรต่างๆ เติมน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำ จากนั้นจึงปรับ pH ของอาหารให้ได้ 5.8 ด้วย HCL และ KOH เติมน้ำให้ครบปริมาตร เติมน้ำ และนำไปต้มจนวุ้นละลาย บรรจุใส่ขวดปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเพาะเลี้ยงแคลลัสของเสาวรส

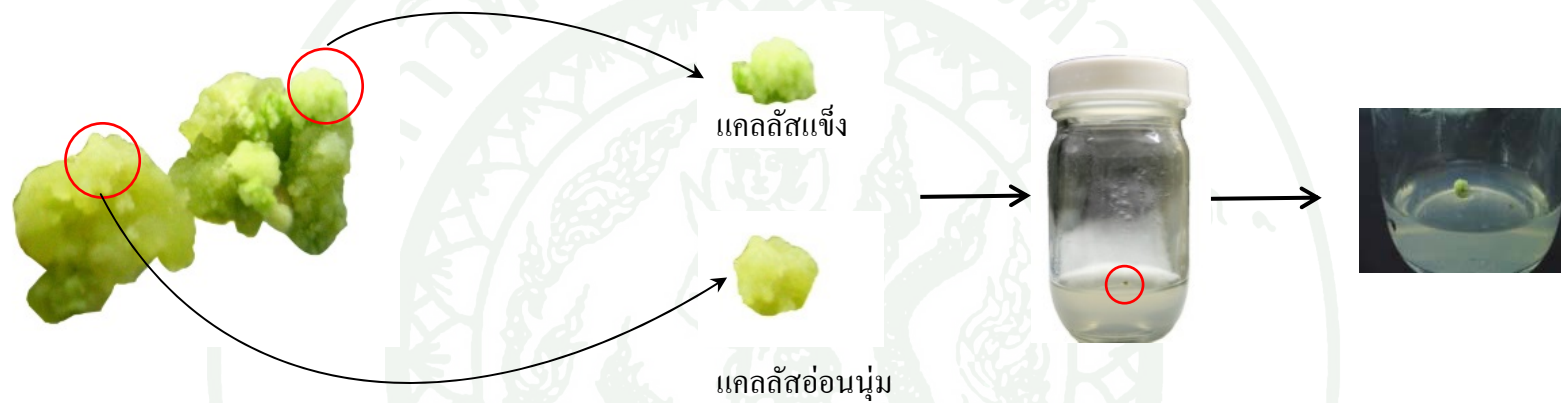
ใช้มีดผ่าตัดตัดส่วนใบอ่อนของยอดเสาวรสปันธุ์สีม่วงที่ปลอดโรคไวรัส (Prammanee *et al*, 2011) จากนั้นตัดบริเวณแกนกลางของใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ให้มีขนาดประมาณ 1X1 เซนติเมตร วางบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและวุ้น 7 กรัมต่อลิตร (Prammanee, 2004) ทำการย้ายเนื้อเยื่อทุกๆ 3 สัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 9 สัปดาห์ดังภาพที่ 5

1.3 การพัฒนาให้เกิดยอด

พัฒนาแคลลัสที่ได้จากข้อ 1.2 ให้เกิดยอด โดยเปรียบเทียบระหว่างแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ (friable callus) กับแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus) นำแคลลัสทั้งสองลักษณะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 100 มิลลิตรต่อลิตรและวุ้น 6 กรัมต่อลิตรระดับความเข้มข้นละ 5 ข้ว ขนาดของแคลลัสประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร ย้ายเนื้อเยื่อทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 5 ขั้นตอนในการตัดส่วนใบอ่อนของเสาวรส และเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D



ภาพที่ 6 ขั้นตอนในการตัดแคลลัสของเสาวรส และเลื่อยในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างๆ กัน

1.4 การขยายจำนวนยอด

ตัดยอดเสาวรสที่เจริญจากแคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่เหมาะสมจากข้อ 1.3 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ดังภาพที่ 7

1.5 การพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

เพาะเลี้ยงยอดจาก ข้อ 1.4 เลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรและวัน 7 กรัมต่อลิตรตามการทดลอง ของ Prammanee และคณะ (2011) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นเสาวรสที่สมบูรณ์ลงปลูกในกระถาง ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอดโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการพัฒนาให้เกิดต้นที่สมบูรณ์และนำลงปลูก

2. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโซมาโคลนด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

2.1 สกัดดีเอ็นเอของโซมาโคลน

โดยการสุ่มตัวอย่างจำนวน 40 ตัวอย่าง (ตารางที่ 7) มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Dellaporta และคณะ (1983) ใช้ใบอ่อนของเสาวรสน้ำหนัก 1.0 กรัมบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผงและใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่เติม Extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 50 มิลลิโมลาร์, NaCl 500 มิลลิโมลาร์ และ β -Mercaptoethanol 10 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 750 ไมโครลิตรจากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

เติม 20% Sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 30 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสกลับหลอดไปมา 5-6 ครั้งทุกๆ 5 นาทีเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิเป็นปกติ

เติม Potassium acetate 5 โมลาร์ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทำการผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 5-6 ครั้ง บ่มทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม Iso-propanol เท่ากับส่วนใสที่ดูดขึ้นมา ผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 8-10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้งจนหมดล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 2 ครั้ง เทส่วนใสทิ้งแล้วหลอดที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนบริเวณก้นหลอดแห้ง

ละลายตะกอนโดยเติม TE buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 10 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เมื่อตะกอนละลายจนหมด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอนที่ไม่ละลายน้ำออก

ดูดส่วนใสให้หลอดทดลองใหม่ปริมาตร 440 ไมโครลิตรเติม Sodium acetate 3 โมลาร์ ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ เติม Absolute ethanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตรกลับหลอดไปมาเบาๆ 8-10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้งล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง เทน้ำใสทิ้งแล้วหลอดที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนบริเวณก้นหลอดแห้งละลายตะกอนใน TE buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม RNase (1 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ถ้าดีเอ็นเอไม่สะอาดให้นำดีเอ็นเอมาสกัดอีกครั้งขั้นตอนหนึ่งคือการสกัดฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (1:1) โดยนำตะกอนดีเอ็นเอมาละลายให้ได้ 700 ไมโครลิตร เติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนสารละลายดีเอ็นเอ (ส่วนบน) ใส่หลอดใหม่ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และเติมฟีนอล/คลอโรฟอร์ม อย่างขั้นตอนข้างต้นเช่นเดิมอีกครั้งดูดเอาเฉพาะสารละลายดีเอ็นเอมาตกตะกอนปริมาตร 120 ไมโครลิตร โดยเติม Sodium acetate 3 โมลาร์ และเติม Absolute ethanol (ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายตะกอน) กลับหลอดไปมาเบาๆ 8-10 ครั้งบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำตะกอนมาตากแห้งแล้วละลายด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ 7 ตารางการสุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโซมาโคลนด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

ตัวอย่าง	Somaclone No.	ตัวอย่าง	Somaclone No.
1	1	21	68
2	2	22	69
3	3	23	70
4	4	24	71
5	7	25	72
6	8	26	73
7	9	27	75
8	18	28	79
9	25	29	93
10	41	30	98
11	47	31	99
12	48	32	100
13	49	33	129
14	54	34	133
15	56	35	145
16	57	36	162
17	62	37	163
18	63	38	167
19	65	39	203
20	67	40	235

2.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

2.2.1 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้ Spectrophotometer

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD₂₆₀ เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอจะวัดที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร (OD₂₈₀) เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าค่า OD₂₆₀/OD₂₈₀ อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนมากกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน

2.2.2 การแยกขนาดและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ผสม 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ lambda DNA/HindIII digest เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้ agarose 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE (Tris-boric acid-EDTA) และใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที เพื่อให้แถบของดีเอ็นเอแยกขนาดกันอย่างชัดเจน ตรวจดูแถบดีเอ็นเอจากการย้อมเจลด้วย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10 นาที ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminator และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.3 ทำปฏิกิริยา RAPD

โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 10 ไพรเมอร์ Universal Primer 1, Universal Primer 3, Universal Primer 6, OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPA-10, OPA-16 และ OPA-18 (ตารางที่ 6) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายความเข้มข้นสุดท้าย คือ DNA template 50 นาโนกรัม, PCR buffer 1X, magnesium chloride 2.3 มิลลิโมล, deoxynucleotide triphosphate 0.2 มิลลิโมล, primer 25 พิกโตโมล, *Tag* DNA polymerase 1.25 ยูนิต เติมน้ำให้ได้ 25 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer) ตั้งโปรแกรมโดยใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำจนครบ 30 รอบ หลังจากนั้นตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel) 1.5%W/V โดยชั่ง agarose เติมน้ำกลั่นให้ความร้อนจนกระทั่งผง agarose ละลายหมด คนให้สารเข้ากันหมด ทั้งให้อุณหภูมิของสารละลายลดลงก่อนที่จะเทลงบนภาชนะรองรับที่เข้ากับชุด electrophoresis รอให้เจลแข็งตัว เติม 1X TBE buffer (Tris-boric acid-EDTA) ผสมผลผลิตพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตร กับ 6xloading dye 5 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละช่องของแผ่นเจลและหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp Ladder) ในช่องแรกและช่องสุดท้ายของแผ่นเจล เปิดกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที นำเจลออกแช่ใน Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำมาถ่ายภาพ

2.4 การวิเคราะห์ผล

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้นำมาแยกความแตกต่างระหว่างโซมาโคลนของเสาวรสแต่ละตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ ให้สัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น “0” นำผลมาวิเคราะห์หาค่า similarity index ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical

Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc) รุ่น 2.2 ซึ่งผลในส่วนนี้จะใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างระหว่างโซมาโคลนของเสาวรศ ผลของการคำนวณจะเป็นตัวเลขที่อยู่ระหว่างเลข “0.0000” ถึงเลข “1.0000” โดยตัวอย่างในแต่ละโซมาโคลนใดที่แตกต่างกันมากจะมีค่าดังกล่าวเข้าใกล้ค่า 0.0000 และที่มีความคล้ายคลึงกันมากค่าดังกล่าวจะเข้าใกล้ค่า 1.0000 โดยค่าทั้งหมดจะแสดงในรูปแบบของตารางดัชนีความคล้ายคลึง (similarity matrix) เพื่อง่ายต่อการตรวจสอบข้อมูลระหว่างพันธุกรรม

หลังจากนั้นนำค่า similarity index มาคำนวณหาความเหมือน ในรูปแบบการจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic mean (UPGMA) แสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree เพื่อแบ่งกลุ่มโซมาโคลนของเสาวรศ ค่าที่ได้จะเป็นค่า similarity coefficient หรือค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน โดยเป็นค่าที่ใช้บ่งบอกความคล้ายกันระหว่างกลุ่ม หรือบ่งบอกช่วงความคล้ายคลึงกันของตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมด

3. การคัดเลือกโซมาโคลนที่ต้านทานโรคไวรัส (PWV) ของเสาวรศพันธุ์สีม่วง

3.1 ถ่ายเชืบนโซมาโคลนด้วยวิธีกล

นำต้นเสาวรศพันธุ์สีม่วงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 300 โซมาโคลนและต้นเสาวรศพันธุ์สีม่วงเบอร์ 2 ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เป็นชุดควบคุม 1 ต้น ปลูกลงในกระถางขนาด 4 นิ้ว ให้มีความสูงประมาณ 15 เซนติเมตร ถ่ายเชื้อด้วยวิธีกล โดยนำใบเสาวรศที่มีอาการของโรคไวรัส PWV น้ำหนัก 1 กรัม บดกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.01 M Phosphate buffer, pH 7.0) ที่แช่เย็นปริมาตร 2 มล. ในโกร่ง จากนั้นผสมผงคาร์บอนคัมลงในน้ำคั้นแล้วทาลงบนใบเสาวรศตรวจดูอาการทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 9 ลักษณะของใบเสาวรศที่เป็นโรคไวรัส PWV

3.2 เปรียบเทียบความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นบนพืช

ดูอาการให้สัญลักษณ์ โดยการบันทึกผล " - " คือ ไม่มีอาการของโรค และ " + " คือ มีอาการของโรค

4. การตรวจหาไวรัส PWV โดยใช้เทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

4.1 สกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ Plant RNA Isolation kit (UltraClean™, MO BIO Laboratories, Inc., USA) ทำการสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีที่แนะนำในคู่มือ ดังนั้นใบเสาวรศ 0.1 กรัม ในโถงที่มีสารละลาย PMR 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายของเหลวที่ได้ลงใน collection tube นำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน collection tube ใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย PMR 2

ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ PMR 3 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ย้ายของเหลวใส่ลงใน collection tube ใหม่ โดยขั้นตอนนี้ต้องระวังอย่าให้ตะกอนฟุ้ง จากนั้นเติมสารละลาย PMR 4 ลงในของเหลวปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงให้เข้ากัน แล้วใช้ปิเปตดูดของเหลวที่ผสมกันดีแล้วปริมาตร 650 ไมโครลิตร ถ่ายลงใน spin filter จากนั้นนำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนของ spin filterbasket ออกก่อน แล้วเทส่วนของเหลวใส่ทิ้งไป นำ spin filterbasket ใส่ไว้ที่เดิม จึงนำของเหลวที่เหลือเทลงใน spin filter อันเดิม นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำเช่นนี้ 3 รอบ เติมสารละลาย PMR 5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน spin filter นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด residual wash solution จากนั้นย้าย spin filterbasket ลงใน collection tube ใหม่ เติมสารละลาย PMR 6 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนของ spin filterbasket ทิ้งไป จะได้สารละลายที่มีอาร์เอ็นเออยู่ใน collection tube นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ทำการตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยการทำ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ (อุปกรณ์ที่ใช้ต้องเตรียมด้วย DEPT-treated H₂O) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเอนไซม์ Rnase

4.2 การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ โดยนำอาร์เอ็นเอของไซมาโคลนที่ต้องการตรวจสอบมาทำปฏิกิริยา โดยแบ่งเป็นสองขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการทำ reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA โดยปิเปตสารใส่หลอด microtube โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายความเข้มข้นสุดท้าย คือ 5X Reaction buffer, Ribolock™ RNase Inhibitor 20 ยูนิต, dNTP 10 มิลลิโมล, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 200 ยูนิต, Template RNA 500 นาโนกรัม, Primer (ดังตารางที่ 6) และเติม DEPC-H₂O จนครบปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน spin down นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วตามด้วย อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ได้เป็น first-stand cDNA เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 cDNA ที่ได้จากขั้นตอนแรก นำมาใช้เพิ่มปริมาณ cDNA สายที่สองด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยนำตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ Pt1 และ Pt2 (ดังตารางที่ 6) ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายความเข้มข้นสุดท้าย คือ DNA template 50 นาโนกรัม, PCR buffer 1X, magnesium chloride 2.3 มิลลิโมล, deoxynucleotide triphosphate 0.2 มิลลิโมล, primer Pt 1 25 พิกโตโมล, primer Pt 2 25 พิกโตโมล, Tag DNA polymerase 1.25 ยูนิต เติมน้ำให้ได้ 25 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer)

ตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้น Initial denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ, ขั้น Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที, ขั้น Annealing อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้น Extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้น Denaturation ถึง Extension ทั้งหมดจำนวน 40 รอบ จากนั้นขั้น Final Extension ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

นำมาแยกขนาดด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5% (W/V) ใน 1x TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ทำการวิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบจำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

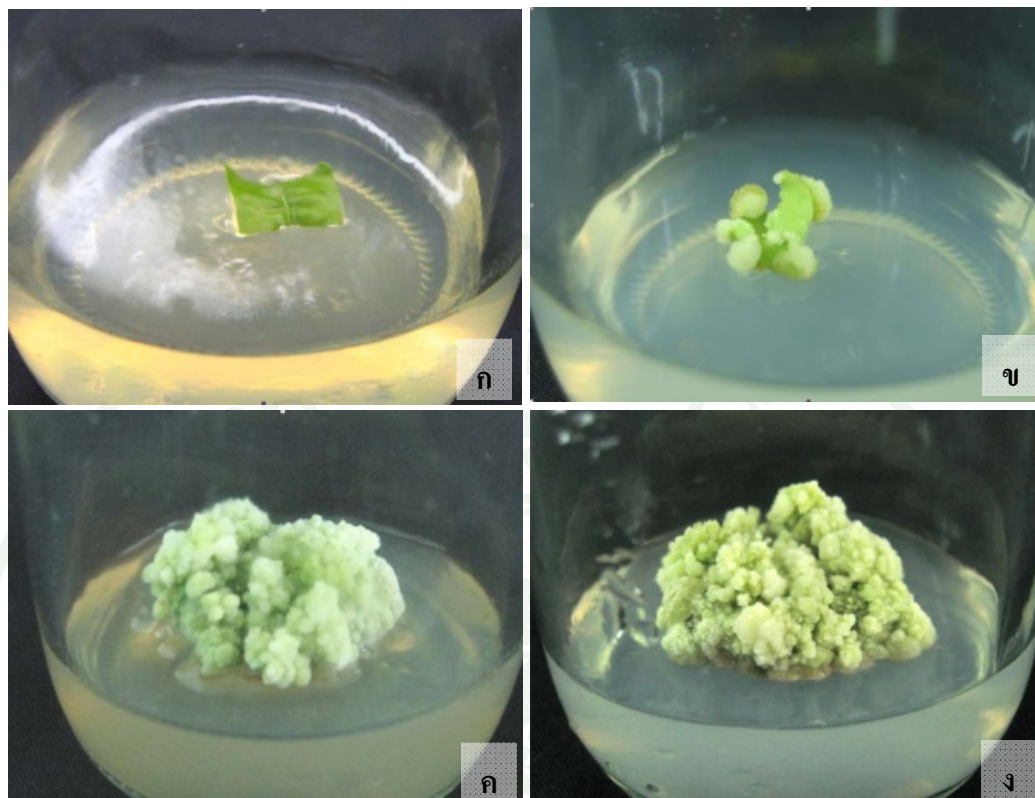
ผลและวิจารณ์ผล

ผล

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรศ

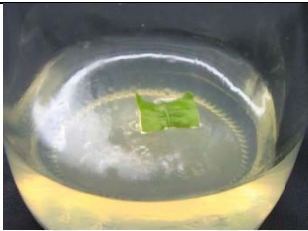
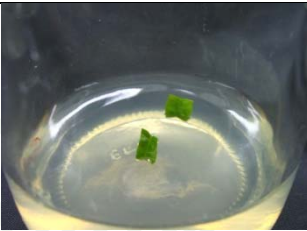
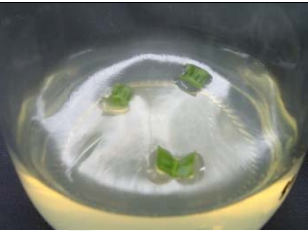
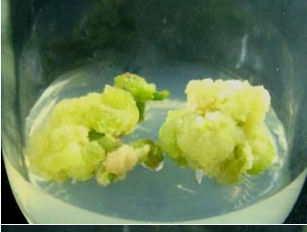
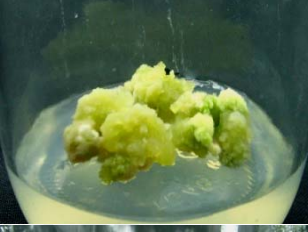
1.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของเสาวรศในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสัปดาห์ที่ 0-3 (ภาพที่ 10ข) เริ่มเกิดกลุ่มของแคลลัสบริเวณขอบใบที่เกิดรอยแผล และแคลลัสสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 4-6 (ภาพที่ 10ค) ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนลักษณะของแคลลัสมี 2 ลักษณะ คือ compact callus จะมีการจับตัวกันของแคลลัสเป็นกลุ่มแน่น และ friable callus จะมีการจับตัวกันของแคลลัสเป็นกลุ่มแบบหลวมซึ่งทั้งสองลักษณะสามารถพบได้ในแคลลัสก้อนเดียวกัน สีของแคลลัสมีสีเขียวอ่อนทั้งสองลักษณะ (ดังภาพที่ 10 และ ตารางที่ 8)



ภาพที่ 10 การเจริญเติบโตของแคลลัส ก. ใบอ่อนของเสาวรสขนาด 1x1 เซนติเมตร ข. แคลลัสในสัปดาห์ที่ 0-3, ค. แคลลัสในสัปดาห์ที่ 4-6 และ ง. แคลลัสในสัปดาห์ที่ 7-9

ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D

สัปดาห์ที่	การเจริญเติบโตของแคลลัส		
0			
0-3			
4-6			
7-9			

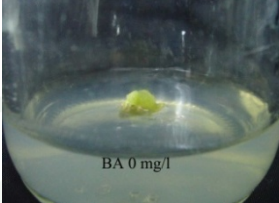
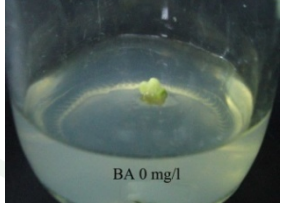
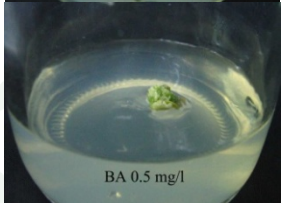
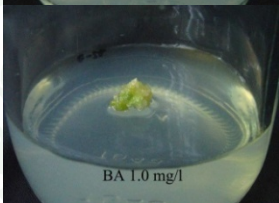
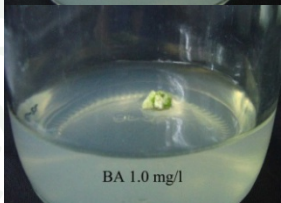
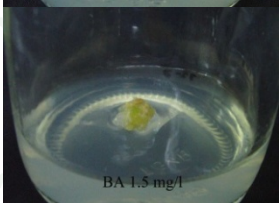
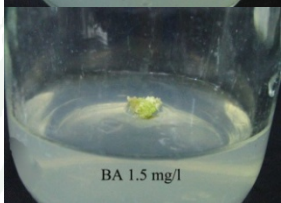
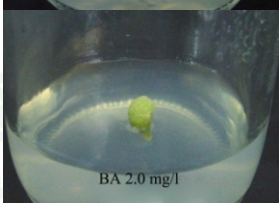
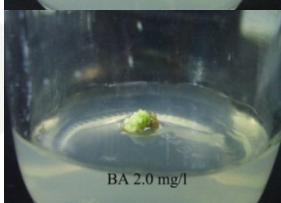
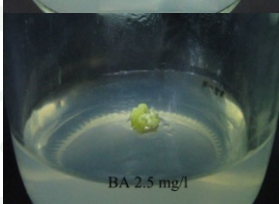
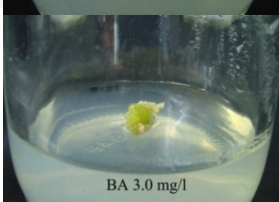
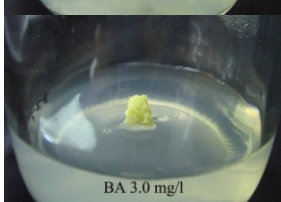
1.2 การพัฒนาให้เกิดยอด

การเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ ที่ระดับ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ขนาดของแคลลัสประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร จากนั้นทำการย้ายเนื้อเยื่อทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า friable callus มีการพัฒนาเป็นยอด ในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 40 ของแคลลัสทั้งหมดในสูตรนี้ โดยเริ่มมีการพัฒนาเป็นยอดในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ดังภาพที่ 11ก-ค) ส่วนในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ พบว่า แคลลัสมีความแข็งแรงมากขึ้น แต่ไม่พบว่ามีการพัฒนาเป็นยอด

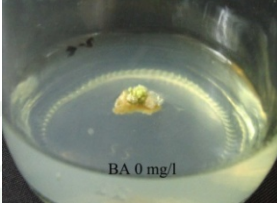
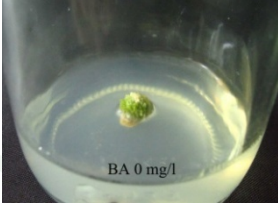
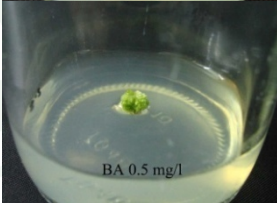
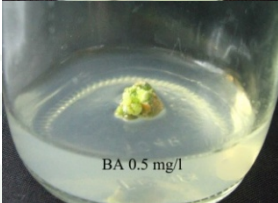
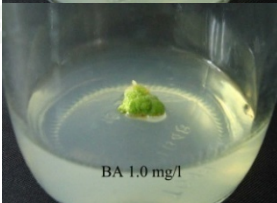
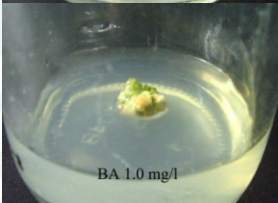
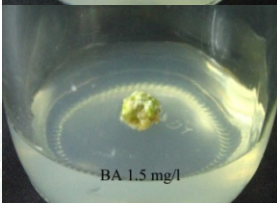
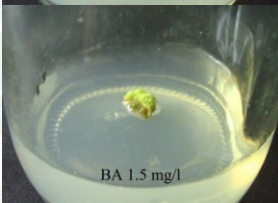
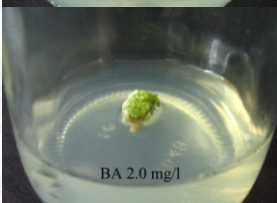
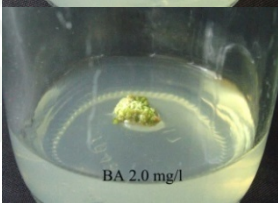
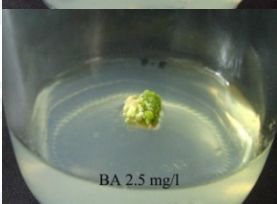
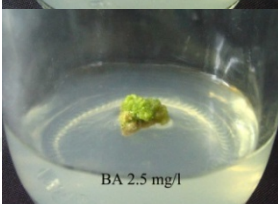
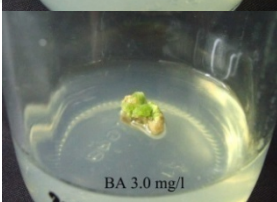
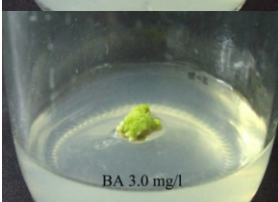
compact callus มีการพัฒนาเป็นยอดในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 80 ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรนี้ โดยเริ่มมีการพัฒนาเป็นยอดในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ดังภาพที่ 11ง-จ)

ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นยอดในสัปดาห์ที่ 6 ร้อยละของการพัฒนาเป็นยอดเท่ากับ 60 และสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการพัฒนาเป็นยอดในสัปดาห์ที่ 8 ร้อยละของการพัฒนาเป็นยอดเท่ากับ 20 ส่วนในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม BA แคลลัสมีความแข็งแรงมากขึ้น แต่ไม่พบว่ามีการพัฒนาเป็นยอด

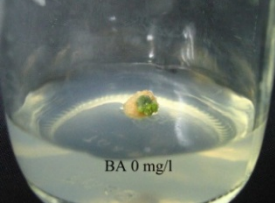
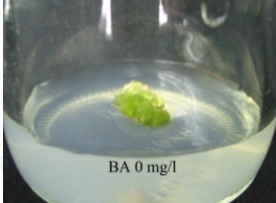
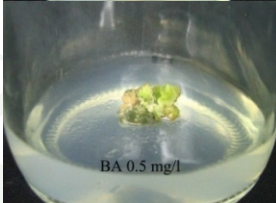
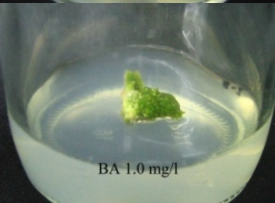
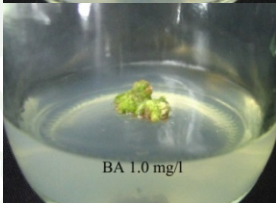
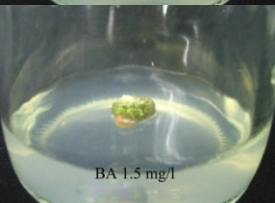
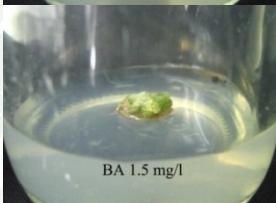
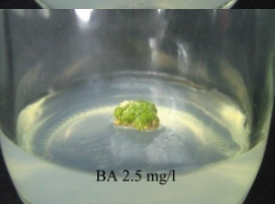
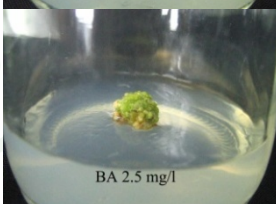
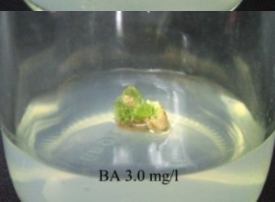
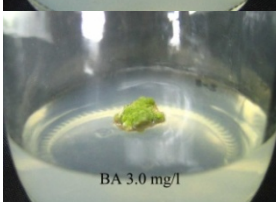
ตารางที่ 9 การเจริญเติบโตของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 0 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระดับความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	friable callus	compact callus
0		
0.5		
1.0		
1.5		
2.0		
2.5		
3.0		

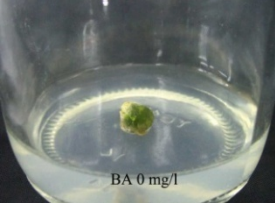
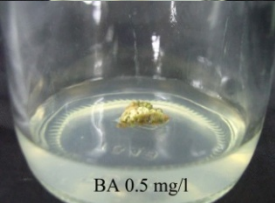
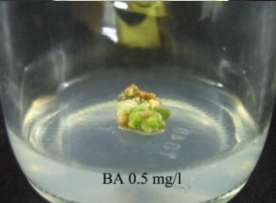
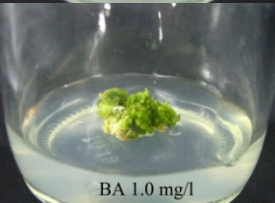
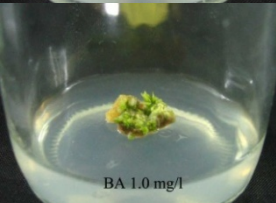
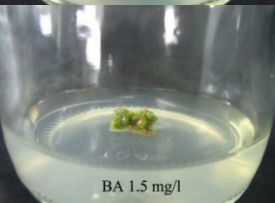
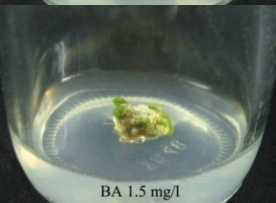
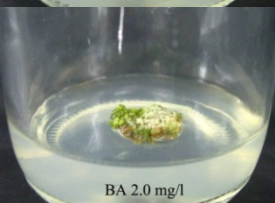
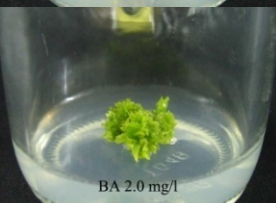
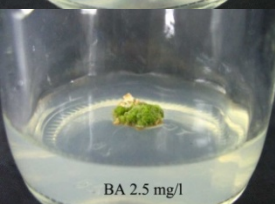
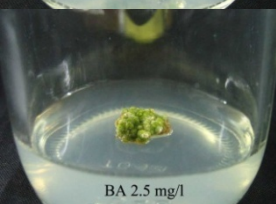
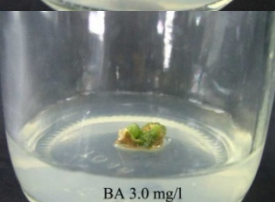
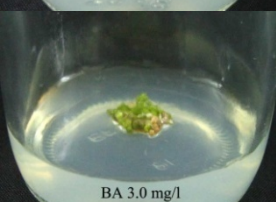
ตารางที่ 10 การเจริญเติบโตของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 0-2 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระดับความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	friable callus	compact callus
0		
0.5		
1.0		
1.5		
2.0		
2.5		
3.0		

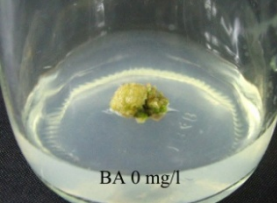
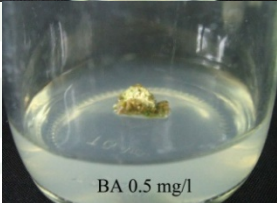
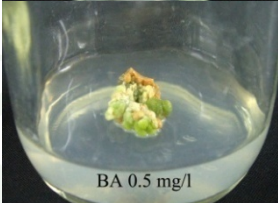
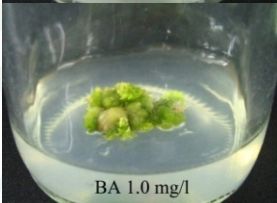
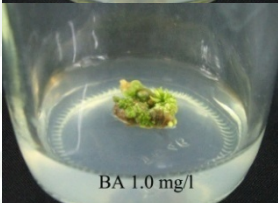
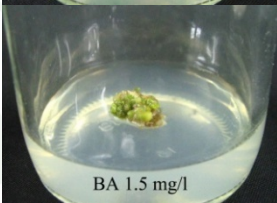
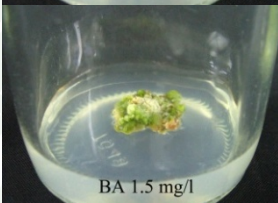
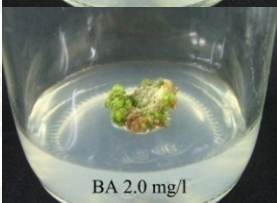
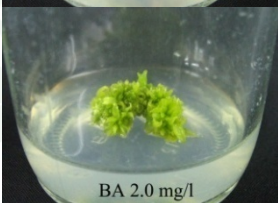
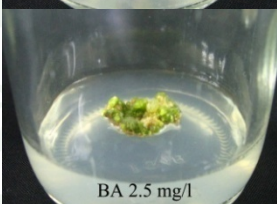
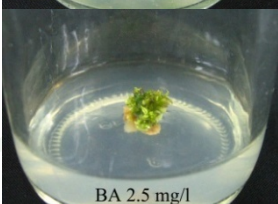
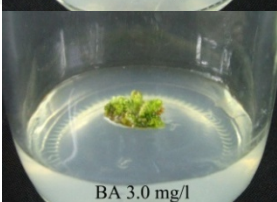
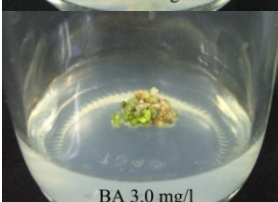
ตารางที่ 11 การเจริญเติบโตของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2-4 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

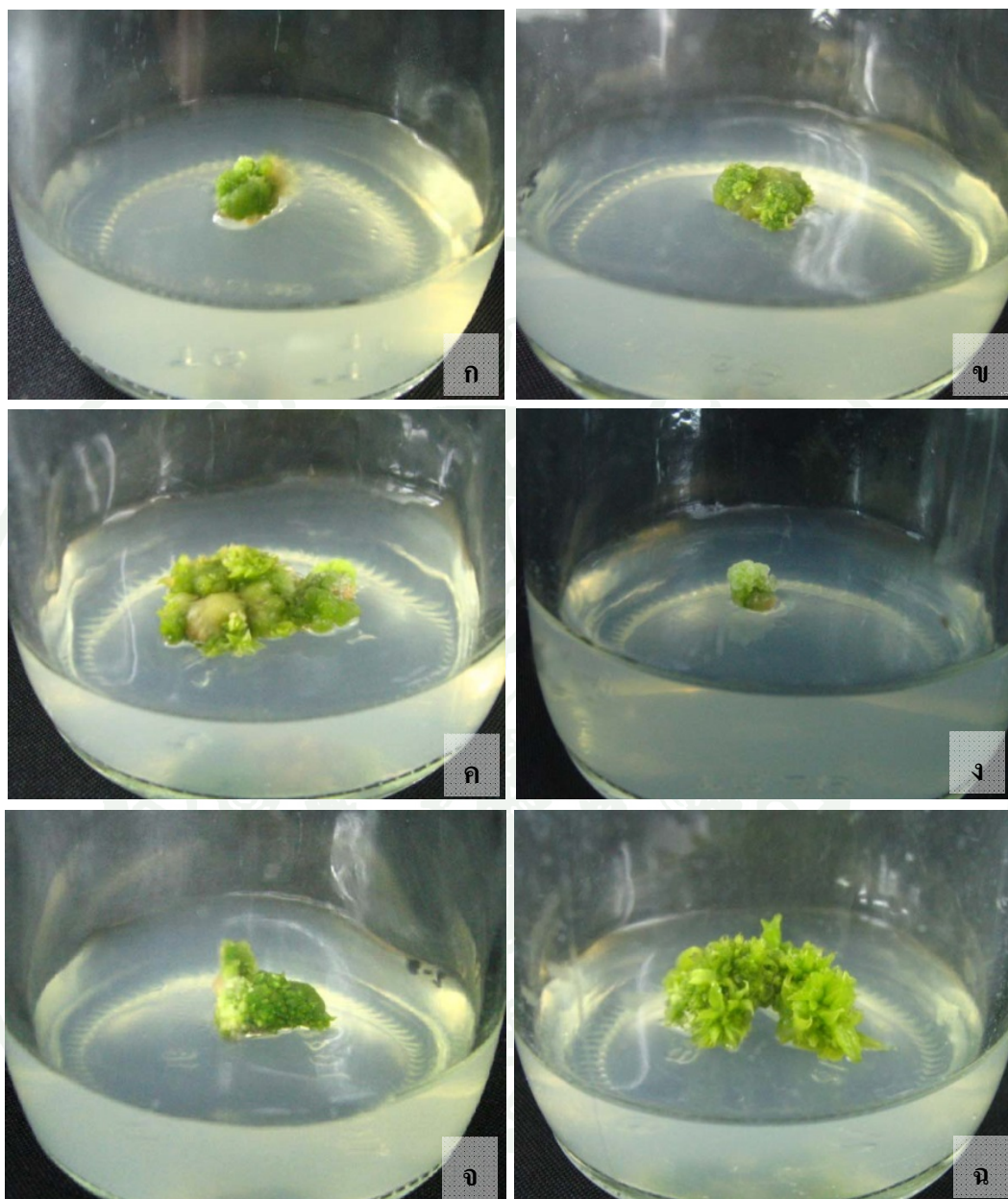
ระดับความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	friable callus	compact callus
0	 BA 0 mg/l	 BA 0 mg/l
0.5	 BA 0.5 mg/l	 BA 0.5 mg/l
1.0	 BA 1.0 mg/l	 BA 1.0 mg/l
1.5	 BA 1.5 mg/l	 BA 1.5 mg/l
2.0	 BA 2.0 mg/l	 BA 2.0 mg/l
2.5	 BA 2.5 mg/l	 BA 2.5 mg/l
3.0	 BA 3.0 mg/l	 BA 3.0 mg/l

ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 4-6 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระดับความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	friable callus	compact callus
0	 BA 0 mg/l	 BA 0 mg/l
0.5	 BA 0.5 mg/l	 BA 0.5 mg/l
1.0	 BA 1.0 mg/l	 BA 1.0 mg/l
1.5	 BA 1.5 mg/l	 BA 1.5 mg/l
2.0	 BA 2.0 mg/l	 BA 2.0 mg/l
2.5	 BA 2.5 mg/l	 BA 2.5 mg/l
3.0	 BA 3.0 mg/l	 BA 3.0 mg/l

ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตของแคลลัสในสัปดาห์ที่ 6-8 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

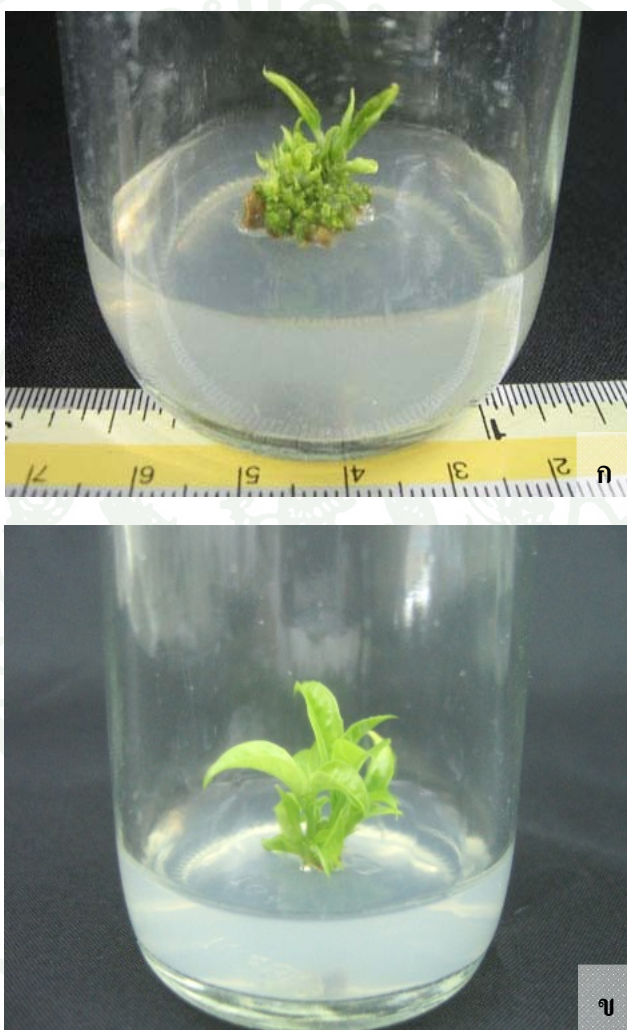
ระดับความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	friable callus	compact callus
0	 BA 0 mg/l	 BA 0 mg/l
0.5	 BA 0.5 mg/l	 BA 0.5 mg/l
1.0	 BA 1.0 mg/l	 BA 1.0 mg/l
1.5	 BA 1.5 mg/l	 BA 1.5 mg/l
2.0	 BA 2.0 mg/l	 BA 2.0 mg/l
2.5	 BA 2.5 mg/l	 BA 2.5 mg/l
3.0	 BA 3.0 mg/l	 BA 3.0 mg/l



ภาพที่ 11 การพัฒนาให้เกิดยอด ก-ค friable callus ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 ตามลำดับ ง-ฉ compact callus ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 ตามลำดับ

1.3 การขยายจำนวนยอด

ตัดยอดเสาวรสยอดเดี่ยวที่เจริญจาก compact callus ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการขยายจำนวนยอด 2-3 ยอด ในเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 12) และทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณ โชมาโคลนที่ใช้คัดเลือก (ภาพที่ 13)



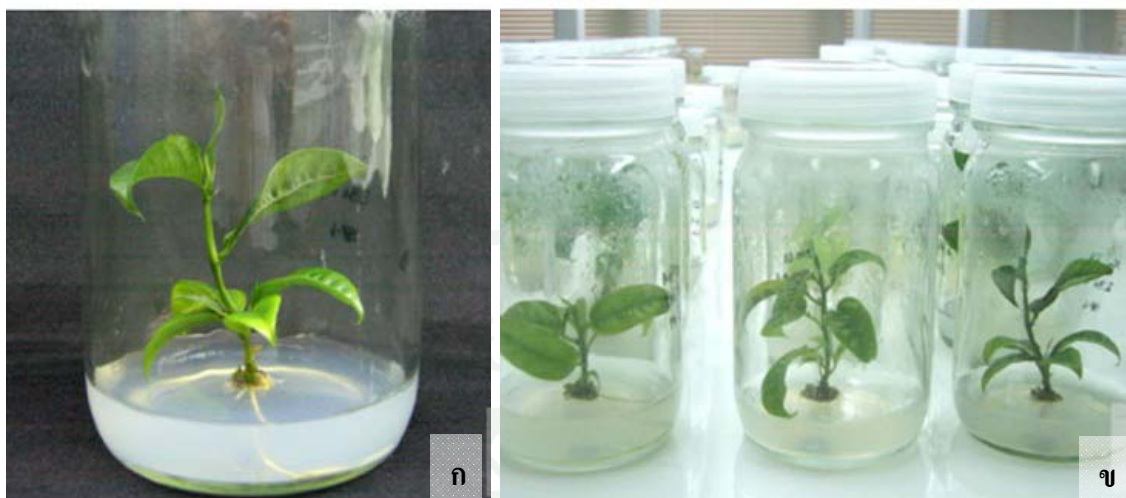
ภาพที่ 12 การเพิ่มปริมาณยอด ก. ชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์, ข. ชักนำให้แตกกอโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 13 การเพิ่มจำนวนยอดเสาวรสภาพในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

1.4 การพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

ตัดยอดเสาวรที่เป็นยอดเดี่ยว เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามการทดลองของ Prammanee *et al.* (2011) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ความสูงของต้นเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1 เซนติเมตร และเกิดรากประมาณ 1-2 ราก (ภาพที่ 14) เมื่อลงปลูกในกระถางต้นเสาวรทั้งหมดสามารถเจริญเป็นต้นเสาวรที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 การพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ ก. ชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ข. ขยายโซมาโคลนเสาวรจำนวนมากเพื่อนำไปปลูกเพื่อทำการคัดเลือกต่อไป

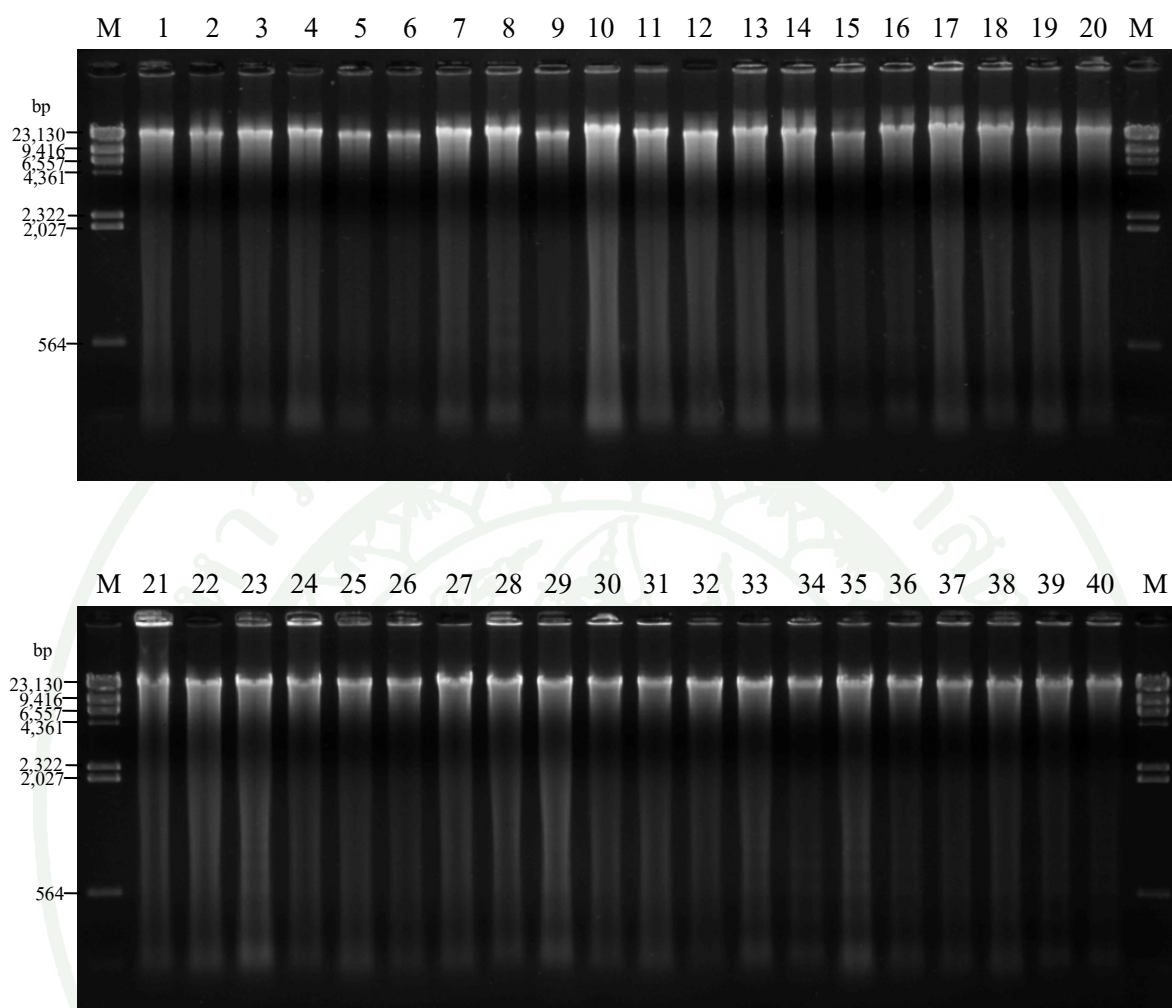


ภาพที่ 15 โซมาโคลนของเสาวรสที่ลงปลูกในกระถางภายในโรงเรือนเพาะชำ

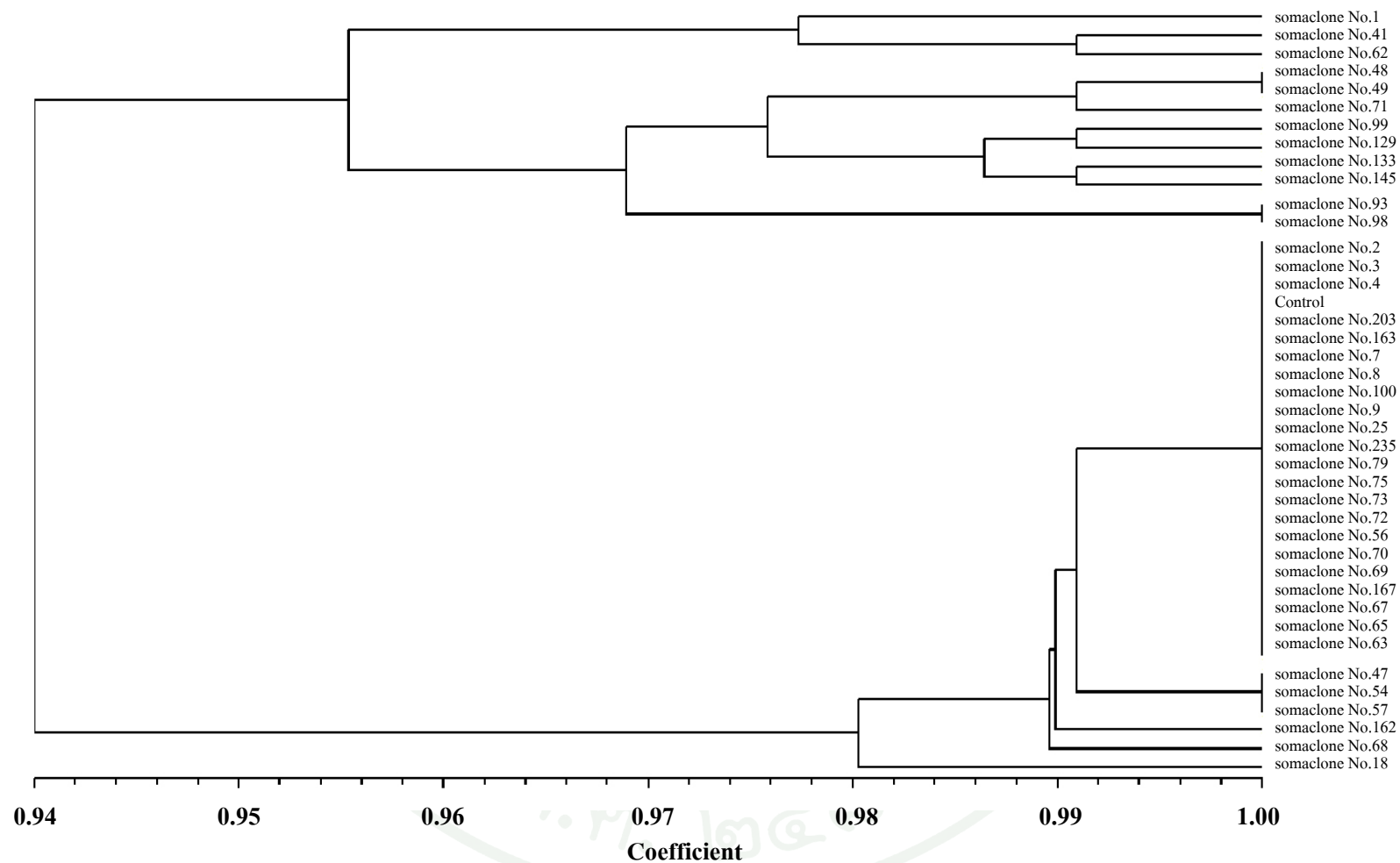
2. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโซมาโคลนด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

2.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเสาวรสจำนวน 41 ตัวอย่าง ผลของดีเอ็นเอที่ได้สามารถตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล (ภาพที่ 16) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ทุกตัวอย่างปรับค่าความเข้มข้นให้เท่ากันที่ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ จำนวน 10 สาย มีขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 5)

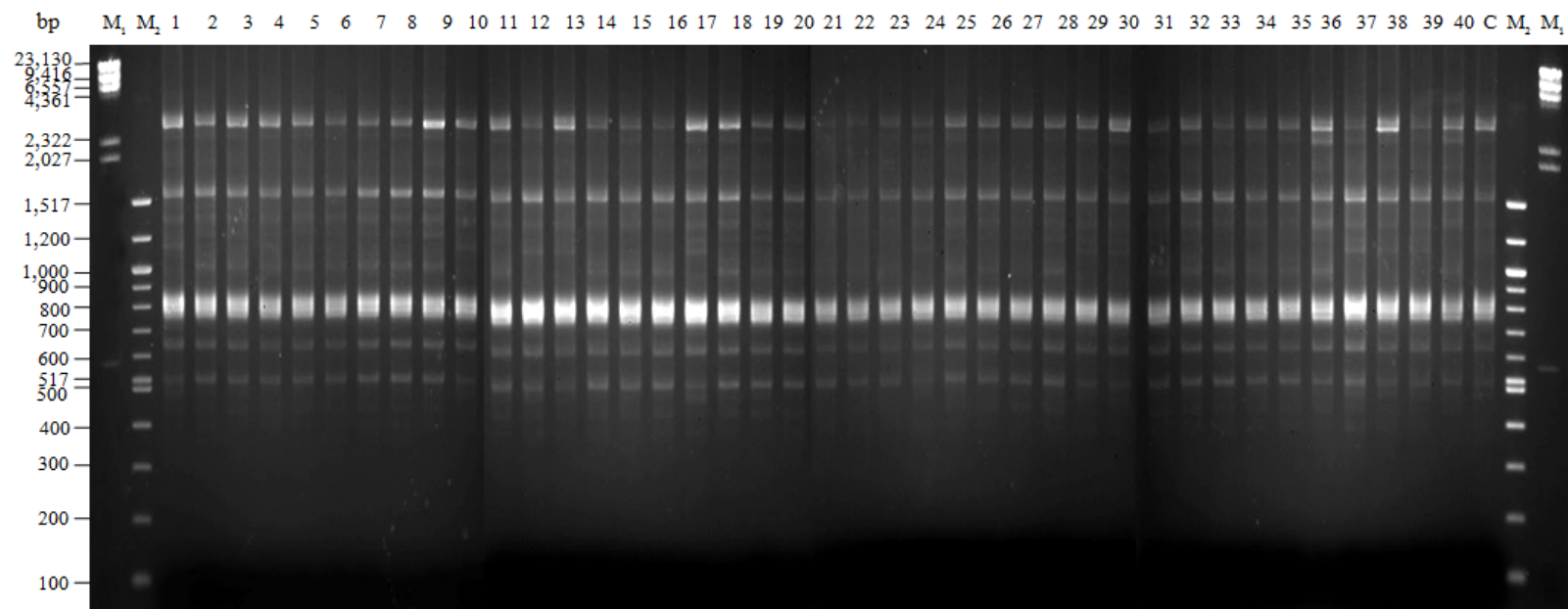
จากการใช้เทคนิค RAPD ในการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ โดยมี 7 ไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยอาร์เอพีดีไพรเมอร์ แสดงดังภาพที่ 18-27



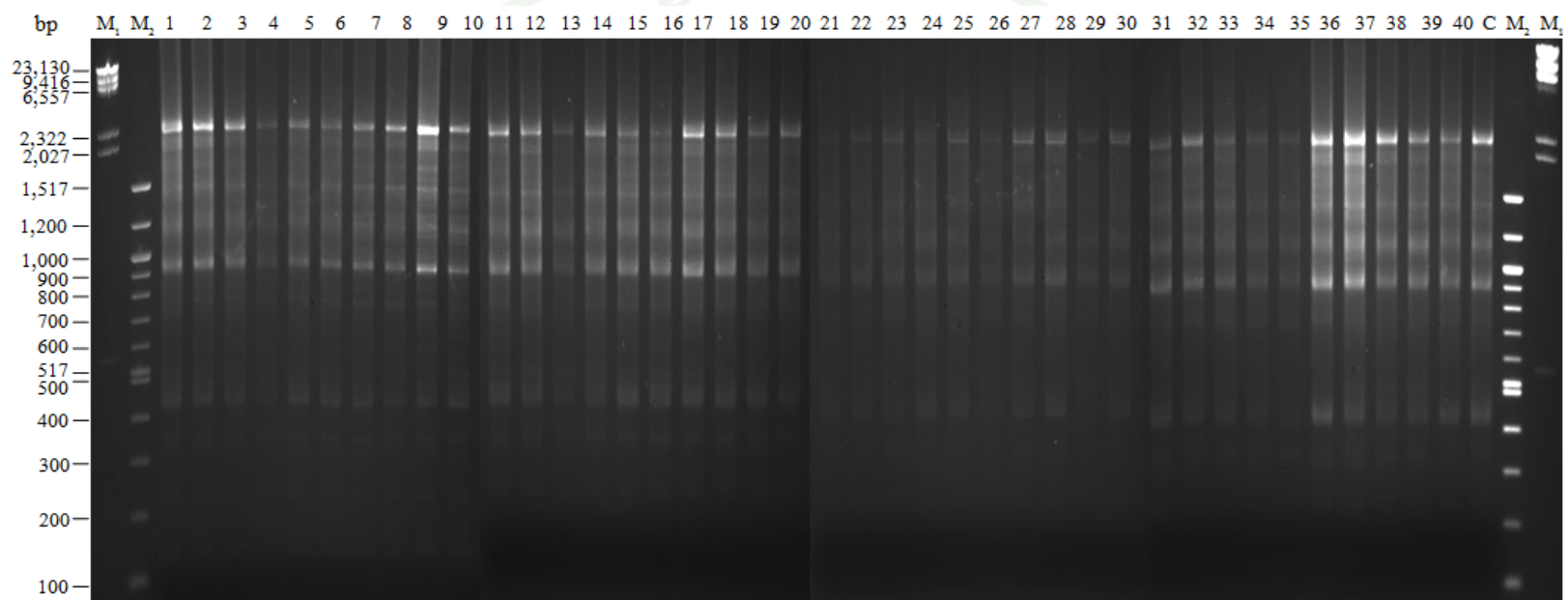
ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอของ SomacloneM= ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA/*Hind*III digest) 1-40= Somaclone ที่ทำการสุ่มมาจำนวน 40 ตัวอย่าง



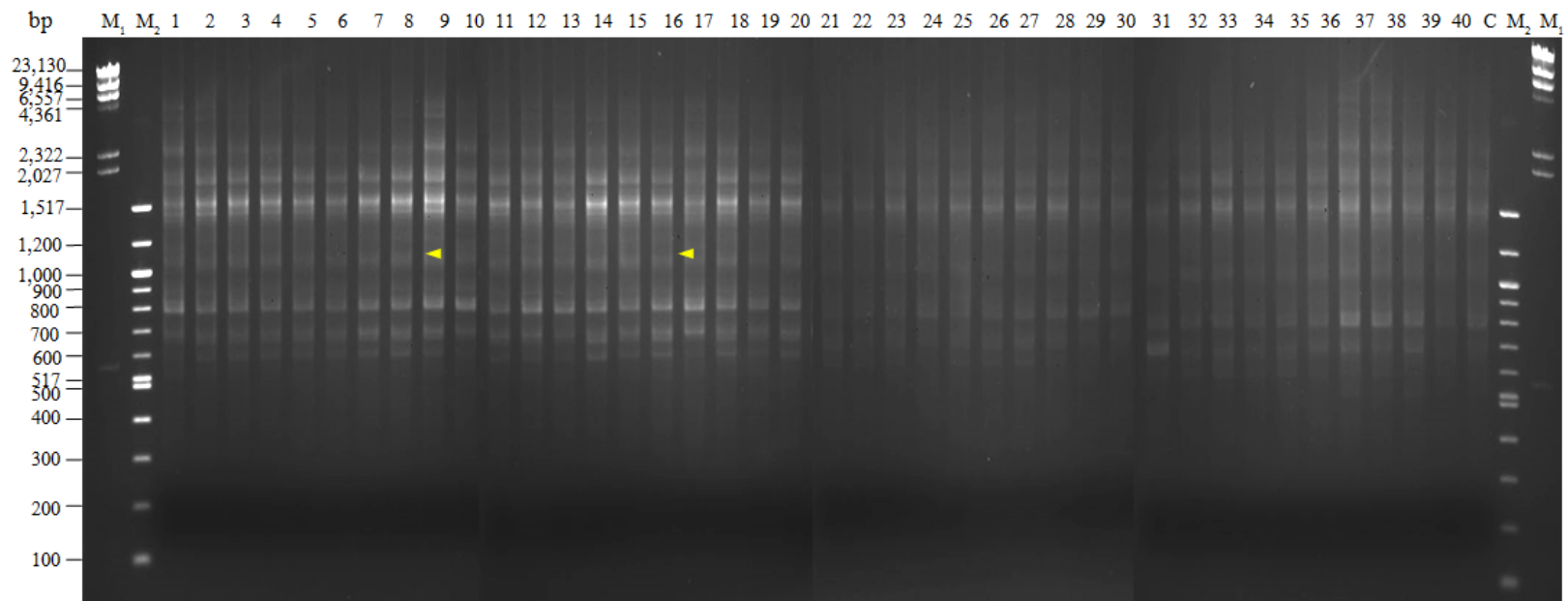
ภาพที่ 17 Phylogenetic tree ของ Somaclone ที่ผ่านเทคนิค RAPD-PCR จำนวน 41 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.2 โดยอาศัยข้อมูลความเหมือนที่คำนวณจากเทคนิค RAPD ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง มีค่าระหว่าง 0.94-1.00



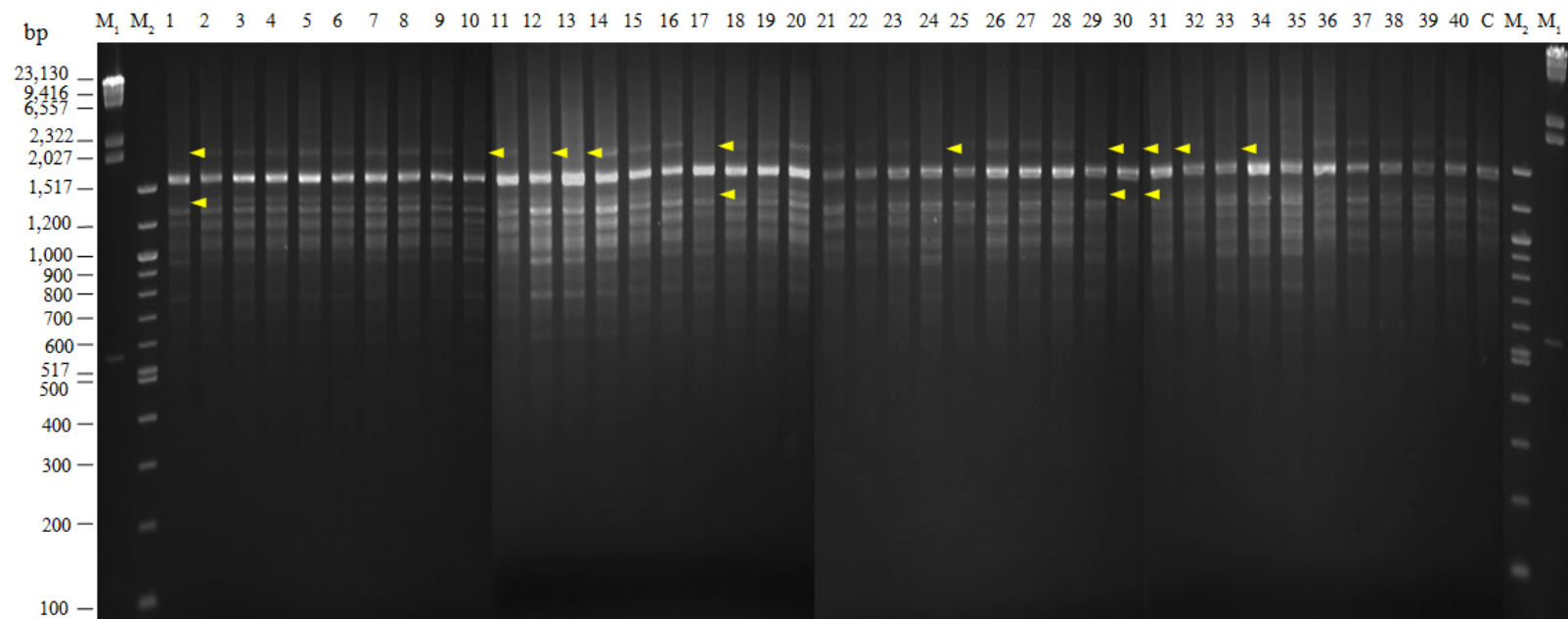
ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ Universal primer1 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M_1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/*Hind*III digest, M_2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)



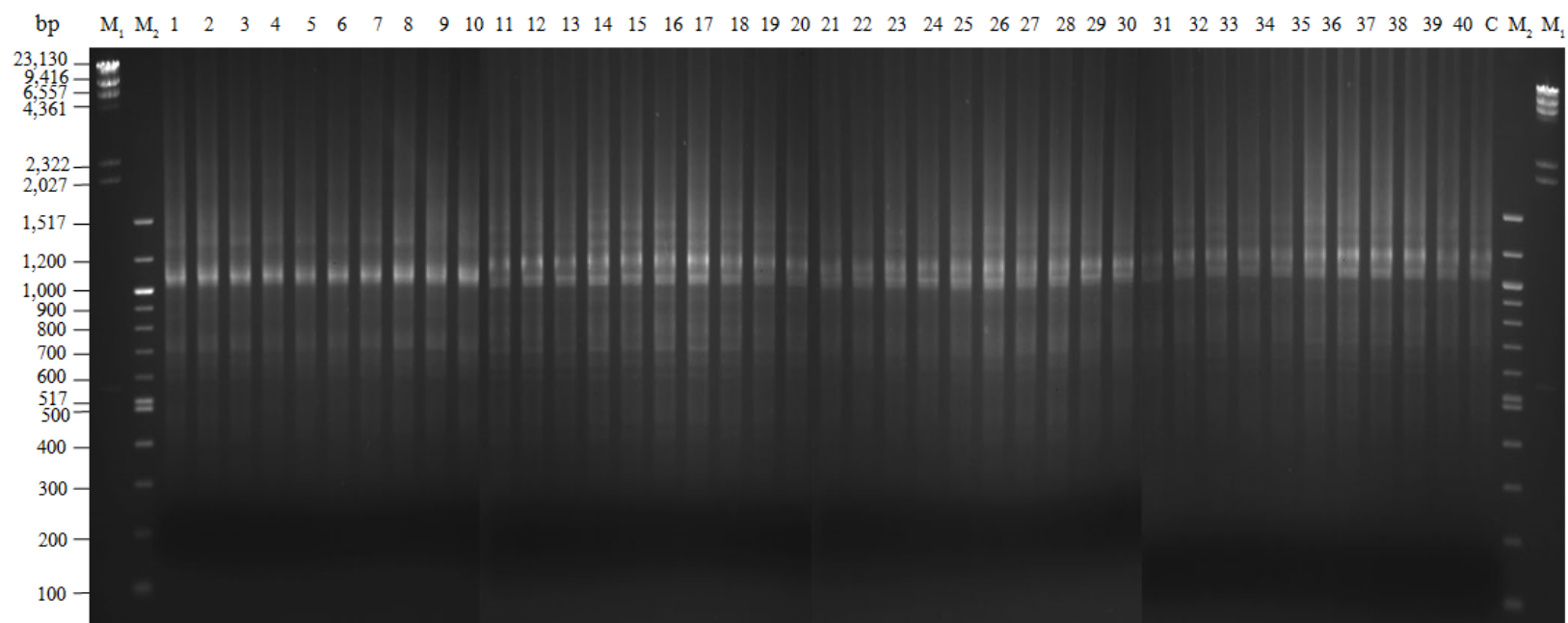
ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ Universal primer 3 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M_1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/*Hind*III digest, M_2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสาวรสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)



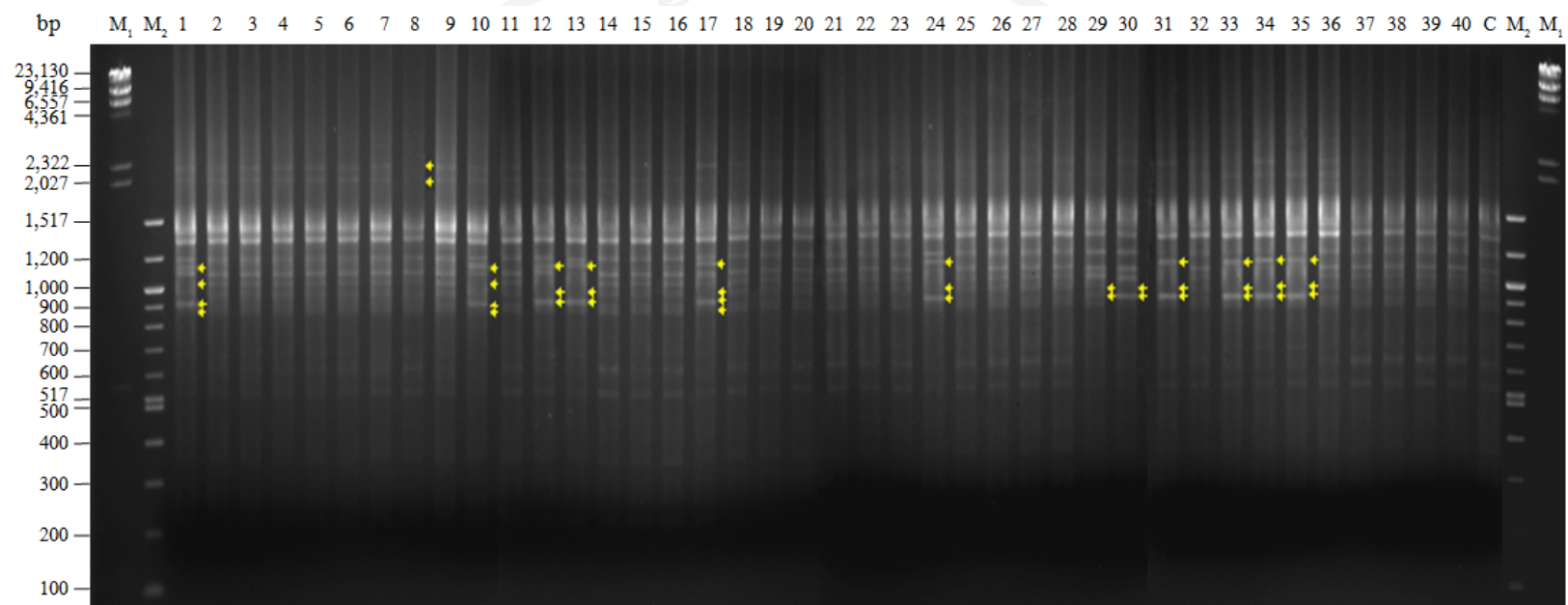
ภาพที่ 20 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ Universal primer 6 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M₁คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M₂คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)



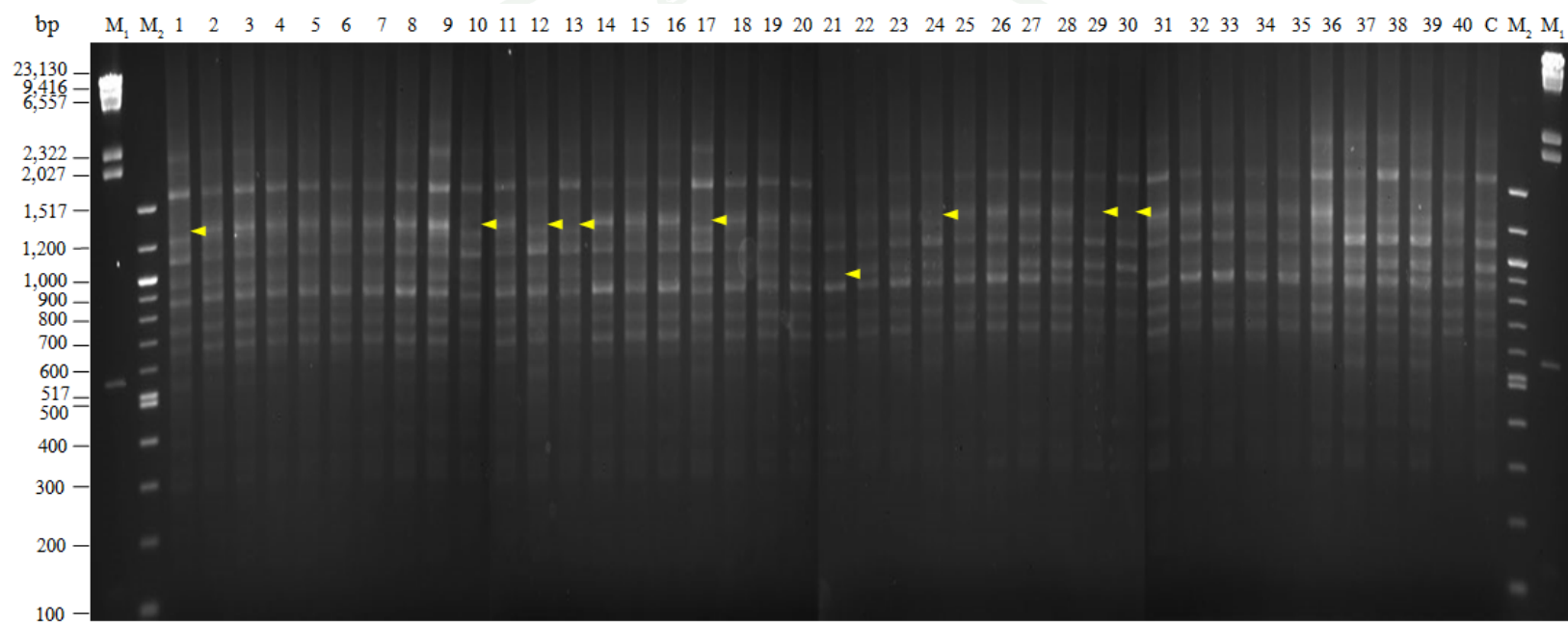
ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-01 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M_1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/*Hind*III digest, M_2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)



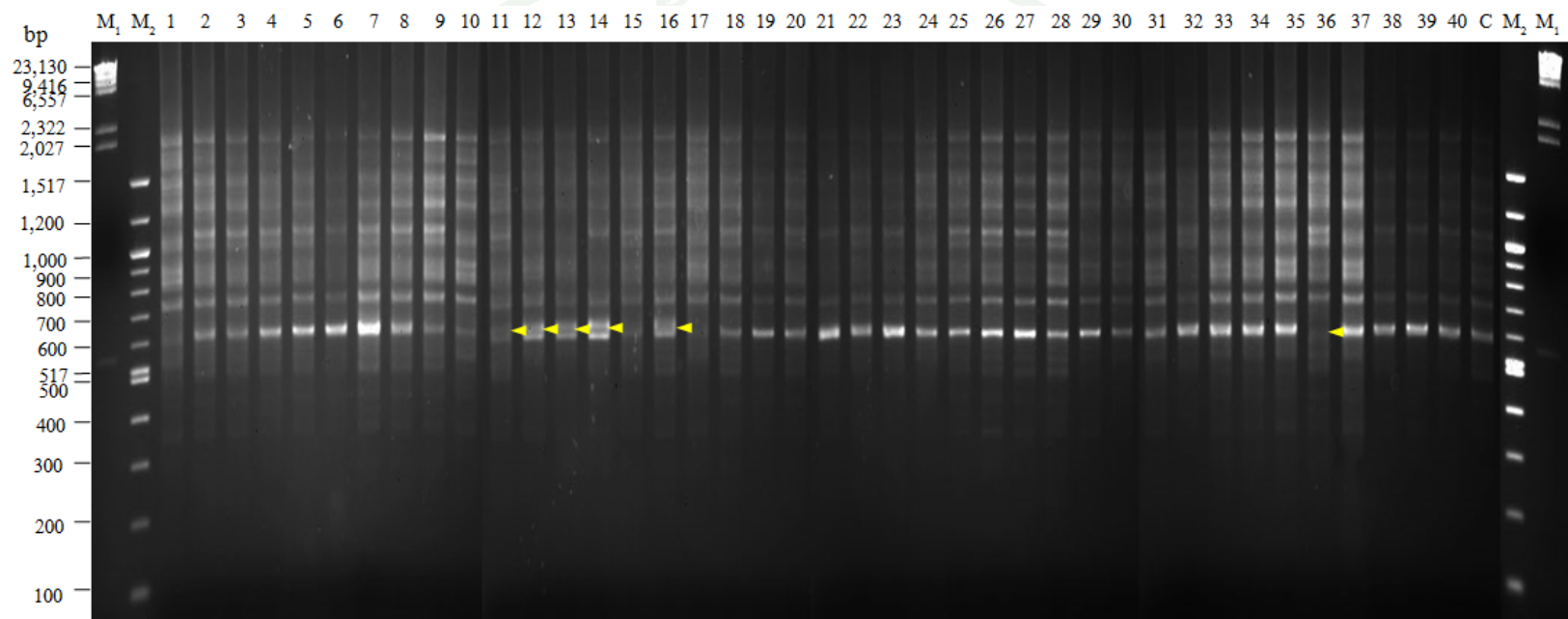
ภาพที่ 22 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M₁คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/*Hind*III digest, M₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaculture และ C คือ Control)



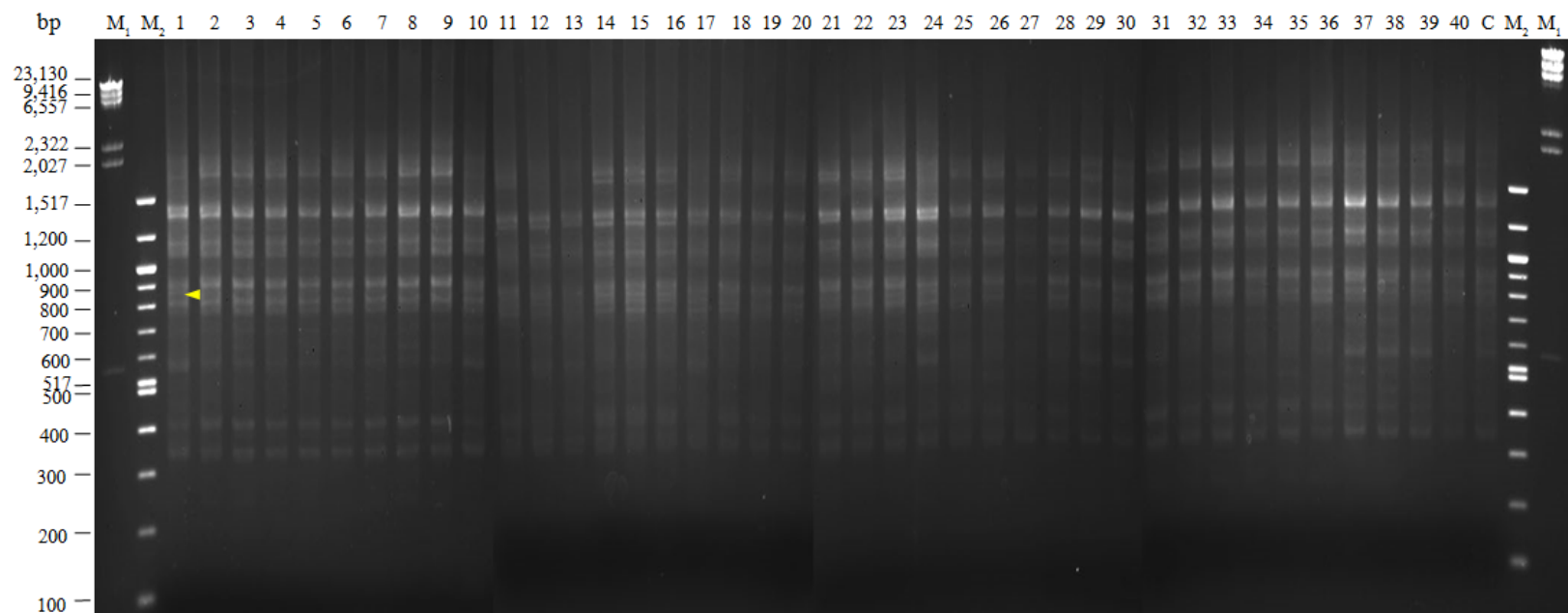
ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M₁คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/HindIII digest, M₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaculture และ C คือ Control)



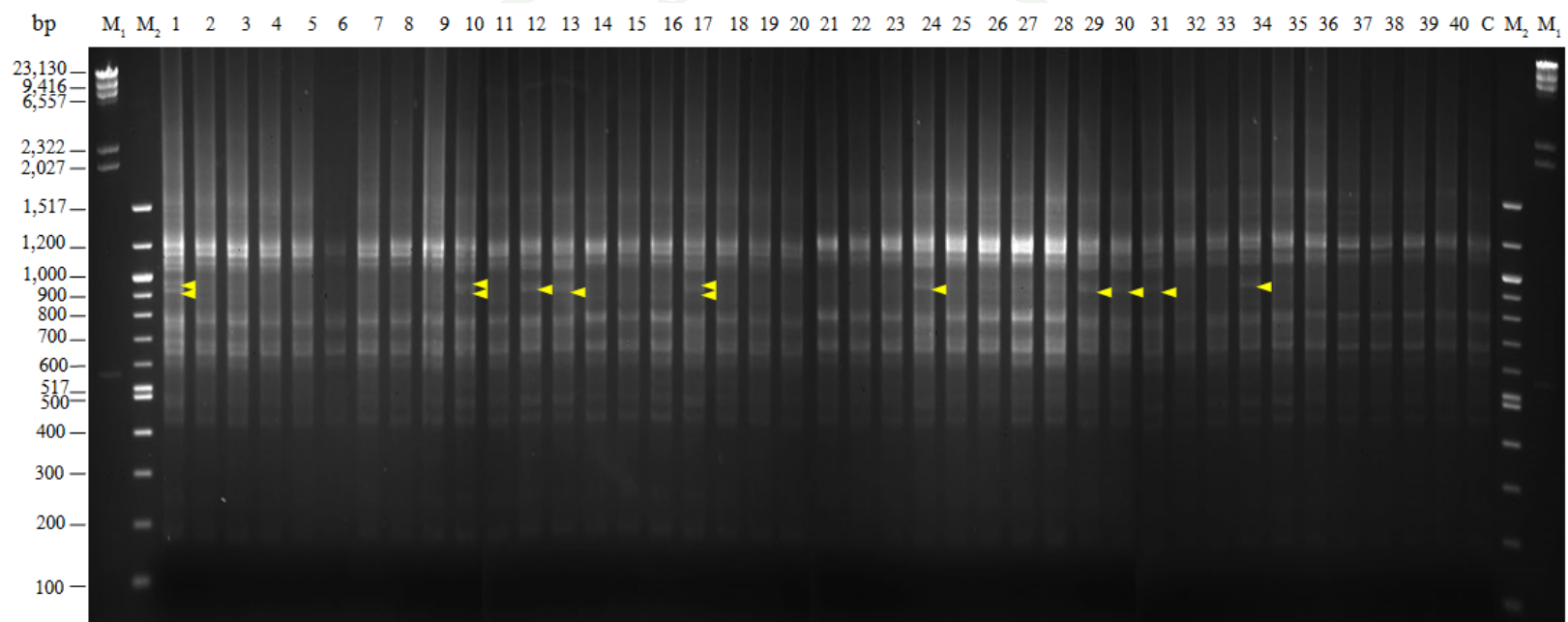
ภาพที่ 24 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-08 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M₁คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานλDNA/*Hind*III digest, M₂คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)



ภาพที่ 25 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M₁คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/*Hind*III digest, M₂ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)



ภาพที่ 26 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-16 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M_1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/*Hind*III digest, M_2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaculture และ C คือ Control)



ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18 ในการทำปฏิกิริยา PCR (M_1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA/*Hind*III digest, M_2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder, 1-40 คือ ตัวอย่างเสารสพันธุ์สีม่วงจำนวน 40 somaclone และ C คือ Control)

2.2 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

จากการนำผลของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) (ภาพที่18-27) มาลงคะแนน โดยใช้เลข “1” เกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ (ตารางภาคผนวก ค1-11) พบว่าได้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 107 แถบ มีค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 10.7 แถบต่อไพรเมอร์

นำผลที่ได้ข้างต้นมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.2 คำนวณหาค่า similarity จากตัวอย่างโสมโคโลนของเสาวรสทั้ง 41 ตัวอย่าง ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่าง ค่าที่คำนวณจากแถบคะแนนดีเอ็นเอมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ความเหมือนกันจะมีมากขึ้นเมื่อค่าที่คำนวณได้มีค่าเข้าใกล้ 1 และต่างกันมากขึ้นเมื่อค่าดังกล่าวเข้าใกล้ 0 เปรียบเทียบข้อมูลทั้งหมดด้วยตารางค่า similarity matrix หลังจากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic mean (UPGMA) เพื่อสร้าง phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโสมโคโลนของเสาวรสทั้ง 41 ตัวอย่าง มีค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.94-1.00 (ตารางผนวกค12) และข้อมูลที่ได้จาก phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย โสมโคโลนที่ 1, 41, 48, 49, 62, 71, 93, 98, 99, 129, 133 และ

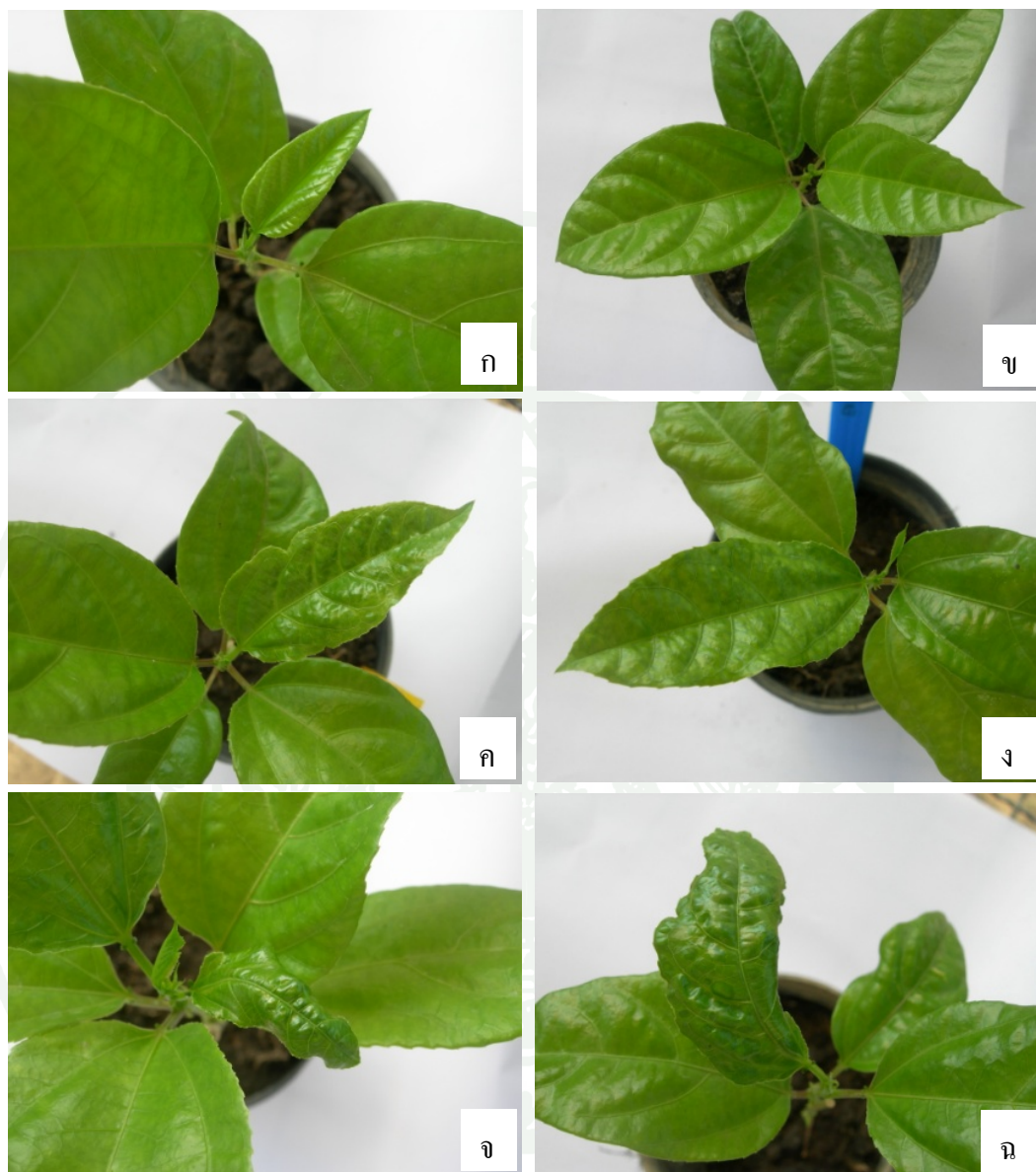
145

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย โสมโคโลนที่ 2, 3, 4, 7, 8, 9, 18, 25, 47, 54, 56, 57, 63, 65, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 79, 100, 162, 163, 167, 203, 235 และ Control

3. การคัดเลือกต้นต้านทานไวรัส

จากการทดลองพบว่าการปลูกถ่ายเชื้อไวรัสโดยวิธีกล สามารถทำให้ต้นของเสาวรสติดเชื้อไวรัส PWV ได้หลังจากทำการปลูกถ่ายเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยจะแสดงอาการของโรคในใบอ่อนที่เพิ่งแตกออกใหม่ ใบอ่อนจะมีอาการหงิกงอในช่วงแรกและมีอาการค่างเขียวอ่อนสลับเขียวแก่เมื่อใบมีขนาดใหญ่ขึ้น

จากการบันทึกผลการปลูกเชื้อไวรัส PWV จำนวนตัวอย่าง 300 โชมาโคลนและชุดควบคุม ซึ่งเป็นต้นเสาวรสของ *Prammanee et al* (2011) รวมเป็น 301 ต้น ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 ต้นเสาวรสแสดงอาการของโรคจำนวน 293 ต้น ในสัปดาห์ที่ 4 ไม่พบต้นเสาวรสที่แสดงอาการของโรคเพิ่มจากเดิม ในสัปดาห์ที่ 6 พบต้นเสาวรสที่แสดงอาการของโรคเพิ่มอีกจำนวน 5 ต้น คือ somaculture ที่ 8, 25, 142, 194 และ 271 ซึ่งผลจากการปลูกเชื้อไวรัส PWV เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบต้นที่ไม่แสดงอาการของโรคจำนวน 2 ต้น คือ somaculture ที่ 18 และ 79 (ดังแสดงในตารางที่ 14)



ภาพที่ 28 อาการของต้นเสาวรหลังจากปลูกเชื้อไวรัส PWV เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ; ก คือ somaclone ที่ 18 , ข คือ somaclone ที่ 79, ค-จ คือ somaclone ที่แสดงอาการของโรค และ ญ คือ control

ตารางที่ 14 ผลการปลูกเชื้อไวรัส PWV โดยวิธีกลบนใบเสาวรศ

somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส			somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส		
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
Control	+	+	+	26	+	+	+
1	+	+	+	27	+	+	+
2	+	+	+	28	+	+	+
3	+	+	+	29	+	+	+
4	+	+	+	30	+	+	+
5	+	+	+	31	+	+	+
6	+	+	+	32	+	+	+
7	+	+	+	33	+	+	+
8	-	-	+	34	+	+	+
9	+	+	+	35	+	+	+
10	+	+	+	36	+	+	+
11	+	+	+	37	+	+	+
12	+	+	+	38	+	+	+
13	+	+	+	39	+	+	+
14	+	+	+	40	+	+	+
15	+	+	+	41	+	+	+
16	+	+	+	42	+	+	+
17	+	+	+	43	+	+	+
18	-	-	-	44	+	+	+
19	+	+	+	45	+	+	+
20	+	+	+	46	+	+	+
21	+	+	+	47	+	+	+
22	+	+	+	48	+	+	+
23	+	+	+	49	+	+	+
24	+	+	+	50	+	+	+
25	-	-	+				

หมายเหตุ: บันทึกรูปผลการทดลอง + คือ มีอาการ และ - คือ ไม่มีอาการ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส			somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส		
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
51	+	+	+	76	+	+	+
52	+	+	+	77	+	+	+
53	+	+	+	78	+	+	+
54	+	+	+	79	-	-	-
55	+	+	+	80	+	+	+
56	+	+	+	81	+	+	+
57	+	+	+	82	+	+	+
58	+	+	+	83	+	+	+
59	+	+	+	84	+	+	+
60	+	+	+	85	+	+	+
61	+	+	+	86	+	+	+
62	+	+	+	87	+	+	+
63	+	+	+	88	+	+	+
64	+	+	+	89	+	+	+
65	+	+	+	90	+	+	+
66	+	+	+	91	+	+	+
67	+	+	+	92	+	+	+
68	+	+	+	93	+	+	+
69	+	+	+	94	+	+	+
70	+	+	+	95	+	+	+
71	+	+	+	96	+	+	+
72	+	+	+	97	+	+	+
73	+	+	+	98	+	+	+
74	+	+	+	99	+	+	+
75	+	+	+	100	+	+	+

หมายเหตุ: บันทึกผลการทดลอง + คือ มีอาการ และ - คือ ไม่มีอาการ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส			somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส		
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
101	+	+	+	126	+	+	+
102	+	+	+	127	+	+	+
103	+	+	+	128	+	+	+
104	+	+	+	129	+	+	+
105	+	+	+	130	+	+	+
106	+	+	+	131	+	+	+
107	+	+	+	132	+	+	+
108	+	+	+	133	+	+	+
109	+	+	+	134	+	+	+
110	+	+	+	135	+	+	+
111	+	+	+	136	+	+	+
112	+	+	+	137	+	+	+
113	+	+	+	138	+	+	+
114	+	+	+	139	+	+	+
115	+	+	+	140	+	+	+
116	+	+	+	141	+	+	+
117	+	+	+	142	-	-	+
118	+	+	+	143	+	+	+
119	+	+	+	144	+	+	+
120	+	+	+	145	+	+	+
121	+	+	+	146	+	+	+
122	+	+	+	147	+	+	+
123	+	+	+	148	+	+	+
124	+	+	+	149	+	+	+
125	+	+	+	150	+	+	+

หมายเหตุ: บันทึกผลการทดลอง + คือ มีอาการ และ - คือ ไม่มีอาการ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส			somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส		
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
151	+	+	+	176	+	+	+
152	+	+	+	177	+	+	+
153	+	+	+	178	+	+	+
154	+	+	+	179	+	+	+
155	+	+	+	180	+	+	+
156	+	+	+	181	+	+	+
157	+	+	+	182	+	+	+
158	+	+	+	183	+	+	+
159	+	+	+	184	+	+	+
160	+	+	+	185	+	+	+
161	+	+	+	186	+	+	+
162	+	+	+	187	+	+	+
163	+	+	+	188	+	+	+
164	+	+	+	189	+	+	+
165	+	+	+	190	+	+	+
166	+	+	+	191	+	+	+
167	+	+	+	192	+	+	+
168	+	+	+	193	+	+	+
169	+	+	+	194	-	-	+
170	+	+	+	195	+	+	+
171	+	+	+	196	+	+	+
172	+	+	+	197	+	+	+
173	+	+	+	198	+	+	+
174	+	+	+	199	+	+	+
175	+	+	+	200	+	+	+

หมายเหตุ: บันทึกผลการทดลอง + คือ มีอาการ และ - คือ ไม่มีอาการ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส			somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส		
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
201	+	+	+	226	+	+	+
202	+	+	+	227	+	+	+
203	+	+	+	228	+	+	+
204	+	+	+	229	+	+	+
205	+	+	+	230	+	+	+
206	+	+	+	231	+	+	+
207	+	+	+	232	+	+	+
208	+	+	+	233	+	+	+
209	+	+	+	234	+	+	+
210	+	+	+	235	+	+	+
211	+	+	+	236	+	+	+
212	+	+	+	237	+	+	+
213	+	+	+	238	+	+	+
214	+	+	+	239	+	+	+
215	+	+	+	240	+	+	+
216	+	+	+	241	+	+	+
217	+	+	+	242	+	+	+
218	+	+	+	243	+	+	+
219	+	+	+	244	+	+	+
220	+	+	+	245	+	+	+
221	+	+	+	246	+	+	+
222	+	+	+	247	+	+	+
223	+	+	+	248	+	+	+
224	+	+	+	249	+	+	+
225	+	+	+	250	+	+	+

หมายเหตุ: บันทึกผลการทดลอง + คือ มีอาการ และ - คือ ไม่มีอาการ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

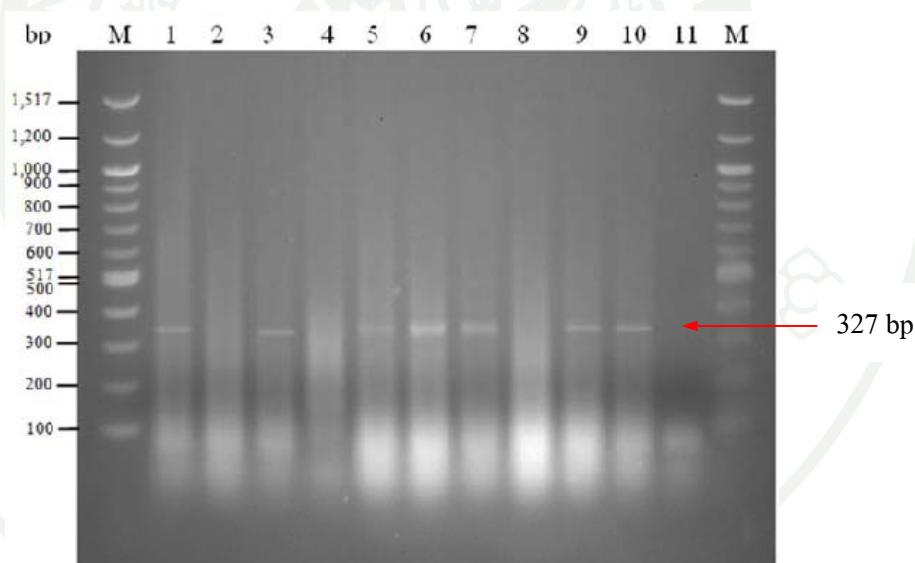
somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส			somaclone	อาการหลังจากปลูกเชื้อไวรัส		
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6		สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6
251	+	+	+	276	+	+	+
252	+	+	+	277	+	+	+
253	+	+	+	278	+	+	+
254	+	+	+	279	+	+	+
255	+	+	+	280	+	+	+
256	+	+	+	281	+	+	+
257	+	+	+	282	+	+	+
258	+	+	+	283	+	+	+
259	+	+	+	284	+	+	+
260	+	+	+	285	+	+	+
261	+	+	+	286	+	+	+
262	+	+	+	287	+	+	+
263	+	+	+	288	+	+	+
264	+	+	+	289	+	+	+
265	+	+	+	290	+	+	+
266	+	+	+	291	+	+	+
267	+	+	+	292	+	+	+
268	+	+	+	293	+	+	+
269	+	+	+	294	+	+	+
270	+	-	+	295	+	+	+
271	-	+	+	296	+	+	+
272	+	+	+	297	+	+	+
273	+	+	+	298	+	+	+
274	+	+	+	299	+	+	+
275	+	+	+	300	+	+	+

หมายเหตุ: บันทึกผลการทดลอง + คือ มีอาการ และ - คือ ไม่มีอาการ

4. การตรวจหาไวรัส PWV โดยใช้เทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR)

จากการคัดเลือกโซมาโคลนของเสาวรสที่มีความต้านทานต่อไวรัสโดยวิธีกล จาก 300 โซมาโคลน พบว่ามีจำนวน 2 โซมาโคลนที่ไม่แสดงอาการของโรคไวรัส จึงนำมาตรวจสอบเพื่อยืนยันอีกครั้งโดยการตรวจสอบไวรัสใช้เทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ ได้ทำการตรวจสอบโซมาโคลนดังต่อไปนี้ คือ โซมาโคลนที่ 8, 18, 25, 79, 142, 194 และ 271 โซมาโคลนที่ 18 และ 79 ไม่มีอาการของโรคไวรัส ส่วนที่เหลือมีอาการในสัปดาห์ที่ 6 ของการปลูกเชื้อไวรัส

จากการตรวจสอบ พบว่า ในช่องที่ 2 (โซมาโคลนที่ 18) และช่องที่ 4 (โซมาโคลนที่ 79) ไม่มีแถบของดีเอ็นเอขนาด 327 bp (แถบดีเอ็นเอของ PWV) ปรากฏ โดยเทียบกับแถบดีเอ็นเอในช่องที่ 8 และ 11 ซึ่งเป็นชุดควบคุมซึ่งปราศจากไวรัส (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 แสดงการตรวจสอบไวรัสโดยใช้เทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ PWV negative (Lane 2 :

somaclone No.18, Lane 4 : somaclone No.79, Lane 8 : healthy และ 11 : H₂O) และ positive (Lane 1 : somaclone No.8, Lane 3 : somaclone No.25, Lane 5 : somaclone No.142, Lane 6 : somaclone No.194, Lane 7 : somaclone No.271, 9 และ Lane 10 : disease. M: DNA size marker (λ DNA/HindIII digest))

วิจารณ์

เนื่องจากการผลิตเสาวรสหวานในประเทศไทยนั้นยังคงประสบกับปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสอย่างต่อเนื่องทำให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และคุณภาพของผลผลิตก็ไม่ดี การหาวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะนำไปสู่การมีต้นแม่พันธุ์เสาวรสถที่มีความต้านทานต่อโรคไวรัส จึงถือเป็นทางออกที่ยั่งยืน โดยในงานวิจัยนี้เลือก การใช้เทคนิค somaclonal variation ซึ่งประสบความสำเร็จต่อการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค เช่น ต้านทานต่อเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส (Jain, 2001) ซึ่งมีรายงานการต้านทานของโรคไวรัสพืช เช่น ต้านทานโรค eyespot disease ในอ้อย (Ramos *et al.*, 1996) และ ยาสูบต้านทานโรคใบด่าง (Toyoda *et al.*, 1989) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถือเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญต่องานวิจัยพืชเป็นอย่างมาก ปัญหาหลัก คือ ประชากรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิด somaclonal variation แต่นั่นก็นำไปสู่การคัดเลือกเพื่อให้ได้โซมาโคลอนที่ดีและมีลักษณะตรงตามความต้องการ ซึ่งในงานวิจัยเลือกใช้เทคนิค somaclonal variation ในการคัดเลือกลักษณะต้านทาน Passion Fruit Woodiness Virus ซึ่งเป็นโรคไวรัสที่เข้าทำลายผลผลิตของเสาวรสถ

การเพาะเลี้ยงแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบอ่อน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lombardi *et al.*, 2007 ชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของ *Passiflora cincinnata* Mast. และ Melo *et al.*, 2000 ชักนำแคลลัสจากใบอ่อนของ *P. edulis* f. *flavicapa* โดยใช้ 2,4-D ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชหลายชนิด เช่น อ้อย (Prammanee, 2004) , ถั่วเหลือง (Gesteira *et al.*, 2002), มันฝรั่ง (Omid, 2003), ข้าว (Islam, 2005) และ ฝ้าย (Jin *et al.*, 2008) เป็นต้น โดย 2,4-D ถูกนำมาใช้บ่อยครั้งเนื่องจาก 2,4-D มีผลต่อการสังเคราะห์ของคลอโรฟิลล์ (Ahmed *et al.*, 2004 และ Mohanty *et al.*, 2008) โดยแคลลัสที่ได้มีสองลักษณะคือ compact callus มีลักษณะแข็งและ friable callus มีลักษณะอ่อนนุ่ม สีของแคลลัสเป็นสีเขียวอ่อน compact callus ชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นพืชใหม่ได้โดยการเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีสารควบคุมการเจริญ BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดและชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prammanee *et al.* (2011) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของ *Passiflora edulis*. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนข้อปล้องของ *P. edulis* f. *flavicapa*. (Biasi

et al., 2000) และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ ของ *Passiflora suberosa* (Monterio *et al.*, 2000)

การใช้อาหารสูตร MS ที่เติม IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดรากพบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี และเมื่อนำลงปลูกในกระถางสามารถเจริญได้ดี (Prammanee *et al.*, 2011) ในการทดลองนี้ สามารถพัฒนาต้นเสาวรจากการเพาะเลี้ยงผ่านแคลลัส

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาโคลนด้วยเทคนิค RAPD โดย สุ่มตัวอย่างจำนวน 40 โซมาโคลน จากทั้งหมด 300 โซมาโคลน และชุดควบคุมคือเสาวรสปลอด โรคไวรัสพันธุ์สีม่วงเบอร์ 2 รวมเป็น 41 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้ เทคนิค RAPD โดยใช้ ไพรมเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 10 ไพรมเมอร์ พบว่าโซมาโคลนที่ทำการสุ่มมานั้นมี ความผันแปรของพันธุกรรม ความสัมพันธ์ระหว่างโซมาโคลนของเสาวรสทั้ง 41 ตัวอย่าง แสดง ความแตกต่างกันของแถบของดีเอ็นเอ มีค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.94-1.00 และข้อมูลที่ได้จาก phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าการใช้ เทคนิค somaclonal variation ทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรม แต่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน ซึ่งจาก รายงานพบว่า RAPD สามารถตรวจสอบ somaclonal variation ใน chili pepper (Hossain *et al.*, 2003), calamondin (Siragusa *et al.*, 2007), strawberry (Biswas *et al.*, 2009), sweet potato (Lee *et al.*, 2002) และ maize (Matheka *et al.*, 2008)

การคัดเลือกโซมาโคลนที่มีความต้านทานโรคไวรัส โดยปลูกถ่ายเชื้อไวรัสจากผลการ ทดลองพบว่า somaclone No.18 และ No.79 ไม่มีอาการของโรคหลังจากที่ทำการปลูกเชื้อ และเมื่อ ตรวจสอบด้วย RT-PCR ก็ไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงสันนิษฐานว่า ทั้งสองโซมาโคลนอาจเป็นพันธุ์ ใหม่ที่มีความเป็นไปได้ว่าจะมีความต้านทานต่อโรค passion fruit woodiness virus

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการศึกษาการพัฒนาต้นพันธุ์ใหม่เพื่อการปรับปรุงพันธุ์เสาวรสีม่วงโดยใช้เทคนิค Somaclonal Variation พบว่าประสบความสำเร็จ โดยอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่สามารถทำให้ใบอ่อนของเสาวรสีเกิด compact callus ที่เหมาะสมแก่การชักนำให้เกิดยอด ซึ่งได้ทั้งหมดจำนวน 300 โขมาโคลน อาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและขยายยอดพันธุ์ คือ สูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นพัฒนาให้เป็นต้นพันธุ์ที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อต้นพันธุ์มีระบบรากที่สมบูรณ์จึงนำลงปลูกลงดิน

2. จากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 40 โขมาโคลน จากทั้งหมด 300 โขมาโคลน และชุดควบคุม คือเสาวรสีพันธุ์สีม่วงเบอร์ 2 รวมเป็น 41 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 10 ไพรเมอร์ Universal Primer 1, Universal Primer 3, Universal Primer 6, OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPA-10, OPA-16 และ OPA-18 พบว่าโขมาโคลนที่ทำการสุ่มมานั้นมีความผันแปรของพันธุกรรม ความสัมพันธ์ระหว่างโขมาโคลนของเสาวรสีทั้ง 41 ตัวอย่าง มีค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.94-1.00และข้อมูลที่ได้จาก phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม

3. การคัดเลือกโขมาโคลนที่มีความต้านทานต่อโรคไวรัส PWV โดยวิธีกล สามารถคัดได้จำนวน 2 โขมาโคลน จากทั้งหมด 300 โขมาโคลน โดยทำการตรวจสอบโรคเพื่อยืนยันโดยใช้เทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์

ข้อเสนอแนะ

การใช้เทคนิค Somaclonal Variation เป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถประสบความสำเร็จในการพัฒนาพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์พืช ในงานวิจัยนี้เพียงแค่ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น เพื่อให้สามารถนำโซมาโคลอนนี้ไปใช้ได้จริงควรมีการปลูกทดสอบในแปลงปลูกเพื่อศึกษาถึงการต้านทานโรคของโซมาโคลอนที่ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์เสาวรสีม่วงต่อไปในอนาคต



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กึ่งกาญจน์ พิษณุกุล. 2545. Somaclonal variation กับความไม่ไวต่อช่วงแสงของข้าวขาวดอกมะลิ 105. เอกสารการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการ เกษตร. 26-29 มีนาคม 2545. โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 104 หน้า.

งานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง และโครงการสนับสนุนการถ่ายทอดเทคโนโลยีและการเรียนรู้การปลูกไม้ผล สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). 2555. การปลูกเสาวรสหวาน. 60 หน้า.

ดวงใจ ชูปัญญา, วรพรรณ ศักดิ์วงศ์, นวลจันทร์ ดีมา และอนงค์ จันทศรีกุล. 2529. โรคใบด่างของกระทกรกยักษ์ที่พบในประเทศไทย. หน้า 144-145. ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 24 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวงศ์. 2550. การผลิตไม้ผลเมืองหนาวขนาดเล็กในเขตร้อน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 176 หน้า.

นิศย์ศรี แสงเดือน. 2551. พันธุศาสตร์พืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 432 หน้า.

ปรียาพรรณ พงศาพิชณ์. 2543. การพัฒนากรดนิวคลีอิกตัวตรวจสำหรับวินิจฉัยทอสปอไวรัสในมะเขือเทศและพริก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 71 หน้า.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยี PCR ทางการเกษตร. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. โครงการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร วันที่ 13-15 พฤษภาคม 2545 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วันทนิย์ เขมะวัฒนา. 2545. การศึกษาโรคของเสาวรสในพื้นที่ปลูกสถานีเกษตรหลวงปางดะ.

ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
36 หน้า.

สรัสวดี เผือกสกนธ์. 2532. **กระทกรกฝรั่ง: PASSION FRUIT**. กลุ่มรักเกษตร. 63 หน้า.

สิริภัทร พราหมณ์ชัย และภัทรวดี พิทักษ์พลรัตน์. 2543. DNA Polymorphism ของอ้อยพันธุ์ทนเค็ม ที่คัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส. รายงานการประชุมอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติ ครั้งที่ 4 15-17 สิงหาคม 2543 ณ โรงแรมลีมาธานี จังหวัดนครราชสีมา. จัดทำโดยสมาคม นักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริม การเกษตร.

สุดาพร ปุกแก้ว. 2548. การพัฒนาเทคนิค อาร์ที-พีซีอาร์ เพื่อการตรวจสอบโรคของเสาวรสที่เกิด จากเชื้อไวรัส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 75 หน้า.

Ahmed, E. U., T. Hayashi and S. Yasawa. 2004. Auxin increase the occurrence of leaf-colour variants in *Cadadium* regenerate from leaf explants. **Sci. Hortic.** 100: 153-159.

Biasi, L. A., M. C. Falco, A. P. M. Rodrigues and B. M. J. Mendes. 2000. Organogenesis from internode segments of yellow passion fruit. **Sci. Agric.** 57: 240-249.

Biswas, M. K., M. Dutt, , U. K. Roy, R. Islam and M. Hossian. 2009. Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Sci Hortic.** 122: 409-416.

Brown, J.K., J. Bird and D.C. Fletcher. 1993. First report of passiflora leaf mottle disease caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. **Plant Disease.** 77: 1264.

Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, , A. J. Gibbs, , L. Watson and E. J. Zurcher. 1996.

“**Known susceptibilities of *Passifloraceae***” [Online]. Available

<http://www.fs.uidaho.edu/vide/family098.htm> (18 September 2010)

Celix, A., A. Lopez-Sese, N. Almarza, M. L. Gomes-Guillamon and E. Rodriguez Cerezo. 1996.

Characterization of cucurbit yellow stunting disorder virus, a *Bemisia tabaci*-transmitted closterovirus. **Phytopathology**. 86: 1370-1376.

Chagas, C. M., P. P. Joazeiro, M. Kudamatsu, and J. Vega. 1984. Mosaic of purple granadilla a new virus in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, 9: 241-247.

Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruitwoodiness virus. **Phytopathology**. 82: 1358-1363.

Chiemsombat, P., S. Prammanee, N. Pipattanawong. 2014. Occurrence of telosma mosaic virus causing passion fruit severe mosaic disease in Thailand and immunostrip test for rapid virus detection. **Crop protection**. 63:41-47.

Crestani, O. A., E. W. Kitajima, M. T. Lin and V. L. A. Marinho. 1986. Passionfruit Yellow Mosaic, a new *Tymovirus* Found in Brazil. **Phytopathology**. 76: 951-955.

Dassanayake, E. M. and R. G. T. Hicks. 1992. Sri Lanka passion fruit mottle virus, a Potyvirus infecting golden passion fruit in Sri Lanka. **Annals Applied Biology**. 120: 459-469.

- Davis, K., B. Rodoni, C. Knox and J. Moran. 2002. Detection of Plum pox potyvirus in illegally imported plum intercepted at Sydney International Airport. **Australian Plant Pathology**. 31: 313-314.
- De Wijs, J. J. 1974. Avirus causing ringspot of *Passiflora edulis* in the Ivory Coast. **Annals of Applied Biology**. 77: 33-40.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant miniprep: version II. **Plant Mol.** 1: 19-21.
- Devos, K. M. and M. D. Gales. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA marker in wheat. **Theor Appl Genet**. 84: 567-572.
- Dovas, C. I. and N. I. Katis. 2003. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the *Vitivirus* and *Foveavirus* genera in grapevine. **Journal of Virological Methods**. 170: 99-106.
- Evans, D.E., J.O.D. Coleman and A. Kearns. 2003. Plant cell culture. Bios Scientific publishers, London , 194 p.
- Gesteira, A. S., W. C.O. Toni, E. G. Barros and M. A. Moreira. 2002. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. **Plant Breed**. 121: 269-271.
- Heinz, D. and G. Mee. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop science**. 9: 346-348.

- Hossain, A. M., K. Konisho, M. Minami and K. Nemoto. 2003. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.). **Euphytica**. 130: 233-239.
- Islam, M. M., M. Ahmed and D. Mahalda.(2005). **Invitro callus induction and plant regeneration in seed explants of rice (Oryza Sativa L.)**. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1(1), 72-75.
- Iwai, H., T. Ohmori, Y. Kurokawa, T. Muta and K. Arai. 1996. New record of passionfruit woodiness virus in Japan. **Phytopathological Society Japan**. 62: 459-465.
- Jain, S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**. 118: 153-166.
- Jawdah, Y. H. 2002. Virus Detection: Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) by RT-PCR. Technical Sheet no.31 [Online]. Available: www.plantpath.wisc.edu/invirlab/docs/CYSDV-ELISA-31.pdf (10 October 2009).
- Jin, S., R. Mushke, H. Zhu, L. Tu, Z. Lin, Y. Zhang and X. Zhang. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*.) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell**. 27: 1303-1316.
- Kitajima, E. W. and O. A. Crestani. 1985. Association of a rhabdovirus with passionfruit vein clearing in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. 10: 681-688.
- Koenig, R. and C. E. Fribourg. 1986. Natural occurrence of Tomato Ringspot Virus in *Passiflora edulis* from Peru. **Plant Disease**. 70: 244-245.

- Koizumi, M. 2005. "Problem of insect-borne virus disease of fruit trees in asia. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan." [Online]. Available <http://www.ffa.agnet.org/library/article/eb417b.html> (11 January 2009).
- Knight, R. J. and J. W. Sauls. 1994. "The passion fruits" [Online]. Available <http://www.edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/MG/MG32800.pdf> (18 October 2008).
- Kunanuvatchaidach, R. 1994. The use of tissue culture techniques to widen the genetic base of rice (*Oryza sativa* L.) for improvement of drought tolerance. **Ph. D. Thesis, The university of Queensland**. P. 203.
- Larkin, P.J. and S.C. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theor. Appl. Genet.**, 60, 197-214.
- Lee, Y. I., I. S. Lee and Y.P. Lim. 2002. Variation in sweetpotato regenerates from gamma-ray irradiated embryogenic callus. **J Plant Biotechnol.** 4:163-170.
- Lombardi, S. P., I. R. S. Passos, M. C. S. Nogueira and B. Appezzato-da-Gloria. 2007. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 50: 239-247.
- Luiz, A. B., C. F. Maria and P.M. Adriana. 2000. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola.** 57(4): 661-665.
- Matheka, J. M., E. Magiri, A. O. Rasha, and J. Machuka. 2008. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology.** 7:641-650.

McCouch, S. R., G. Kochert, Z. H. Yu, Z. W. Wang, G. S. Khush, W. R. Coffman and S. D.

Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theor. Appl. Genes.** 76: 815-829.

Mekuria, G., S. A. Ramesh, E. Alberts, T. Bertozzi, M. Wirthensohn, G. Collins and M. Sedgley.

2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). **Journal of Virological Method.** 114: 65-69.

Melo, M. O., M. Melo and B. Appezzato-da-Gloria. 2000. *Bauhinia forficata* link shoot regeneration: histological analysis of organogenesis pathway. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 43: 431-436.

Mohanty, S., M. Panda, E. Subudhi and S. Nayak. 2008. Plant regeneration from callus culture of Curcuma aromatic and invitro detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. **Biol Plant.** 52: 783-786.

Monterio, A. C. B., G. T. Nakazawa, B. M. J. Mendes, and A. P. M. Rodriguez. 2000.

Regenerate in vitro de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Sci. Agric.** 57: 571-573.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** 15, 473-497.

Nagata, R., M. Mori, K. Hanada and M. Nishiguchi. 2001. An improved method of reverse transcription and Polymerase chain reaction (RT-PCR) to efficiently detect potyvirus,

- sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) RNA in sweet potato. **Journal of General Plant Pathology**. 67: 164-168.
- Niblett, C. L., A. C. Monllor, R. Provvidenti, P. E. Still, J. Escudero, J. Bird and K. Gough. 1991. A disease of passionfruit (*Passiflora edulis*) in Puerto Rico, possibly caused by an isolate of water-melon mosaic virus. **Phytopathology**. 81:698.
- Omidi, M. and A. Shahpiri. 2003. Callus induction and plant regeneration in vitro in potato. **Acta Hort (ISHS)**. 619: 315-322.
- Parry, J. N., R. I. Davis and J. E. Thomas. 2004. Passiflora virus Y, a novel virus infecting *Passiflora* spp. In Australia and the Indonesian Province of Papua. **Australasian Plant Pathology**. 33: 423-427.
- Patnaik, J., S. Sahoo and B.k. Debata. 1999. Somaclonal variation in cell suspension culture derived regenerants of *Cymbopogon Martini* (Roxb.) Wats. Var. motia. **Plant Breeding**. 118(4): 351–354.
- Prammanee, S. 2004. Cellular and molecular basis of salt tolerance in sugarcane. **Proc. Internl.Symp. and Sustainable Sugarcane and Sugar production Technol. Nanning, PR.China**: 327–330.
- Prammanee, S., S. Thumjamras, P. Chiemsombat and N. Pipattanawong. 2011. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Protection**. 30:1425-1429.
- Ramos Leal, R., R.H. Maribona, A. Ruiz, S. Konerva et al. 1996. Somaclonal variation as a source of resistance to eyespot disease of sugarcane. **Plant Breed**: 115: 37–42.

- Rowhani, A., M. A. Maningas, L. S. Lile, S. D. Daubert and D. A. Golino. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. **Journal of Phytopathology**: 85: 347-352.
- Schreuder, M.M., I.J. Pereira, C.J.J.M. Racmarkers, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 2003. Effects of somaclonal variation in cassava plants regenerated from friable embryogenic callus of increase age. **Plant Science**. 135: 87-101.
- Siragusa, M., A. Carra, L. Salvai, A. Puglia, F. De Pasquale and F. Carimi. 2007. Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenyl urea derivatives. **Plant Cell Rep.** 26: 1289-1296.
- Skirvin, R. M. and J. Janick. 1976. "Velvet Rose" Pelargonium, a scented geranium. **Hort Sci.** 11:61-62.
- Smith, K. M. 1972. **A textbook of plant virus disease**. Academic Press. New York. 212 p.
- Taylor, R. W. and R. S. Greber. 1973. Passionfruit woodiness virus. C.M.I./A.A.B. **Description of Plant Viruses**. No. 122.
- Taylor, R. H. and C. Kimble. 1964. Two unrelated viruses which cause woodiness of passionfruit. **Australian Journal of Agricultural Research**. 15: 560-570.
- Teakle, D. S. and G. B. Wildermuth. 1967. Host range and particle length of passionfruit woodiness virus. **Queensland Journal of Agricultural Science**. 24: 173-186.

- Toyoda, H., K. Chatani, Y. Matsuda and S. Ouchi. 1989. Multiplication tobacco mosaic virus in tobacco callus tissue and in vitro selection for viral disease resistance. **Plant Cell Reports**. 8: 433-436.
- Van Den Heuvel, J. F. J. M. and D. Peter. 1989. Improved detection of potato leaf roll virus in plant material and in aphids. **Phytopathology**. 79: 963-967.
- Van Sint Jan, V. and J. Bouharmont. 1989. Use of somaclonal variation to improve aluminium tolerance of rice and mineral characterization of the tolerance. **Euphytica**. 97: 303.
- Vos, P., R. Hogers, M. Blecker, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Releman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livok, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers as useful genetic markers. **Nucleic Acids. Res.** 18: 6231 – 6235.





ภาคผนวก ก

องค์ประกอบสูตรอาหารและการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อ

ตารางผนวก ก1 องค์ประกอบสูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS,1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ในสูตรอาหารมิลลิกรัมต่อลิตร
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.14
KI	0.83
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCL	0.5
Thiamine HCL	0.1
น้ำตาล	30,000
วุ้น	6,000

ตารางผนวก ก2 การเตรียม Stock อาหารปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (1 ลิตร)

MS Stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (กรัม)
MS Stock ที่ 1	NH_4NO_3	82.5
	KNO_3	95
MS Stock ที่ 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18.5
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.845
	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.43
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00125
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22
MS Stock ที่ 3	KI	0.042
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00125
	KH_2PO_4	8.5
MS Stock ที่ 4	H_3BO_3	0.31
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0125
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784
MS Stock ที่ 5	Na_2EDTA	3.724

การเตรียม MS Vitamine และสารควบคุมการเจริญเติบโต

การเตรียม Vitamine 1,000 เท่า ใช้

Thiamine HCL	0.010	กรัม
Nicotinic acid	0.050	กรัม
Pyridoxine HCL	0.050	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

การเตรียม 2,4-D (ความเข้มข้น 1,000 ppm)

ชั่ง 2,4-D	0.1	กรัม
ละลายในแอลกอฮอล์		
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

การเตรียม IBA (ความเข้มข้น 1,000 ppm)

ชั่ง IBA	0.1	กรัม
ละลายใน KOH		
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

การเตรียม BA (ความเข้มข้น 1,000 ppm)

ชั่ง BA	0.1	กรัม
ละลายใน KOH		
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร



ตารางผนวก ข1 ผลการชักนำให้แตกกอโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการ
เจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ซ้ำที่	จำนวนยอด	ความยาวต้น(ซม.)
1	4	2.0
2	2	1.5
3	2	1.3
4	2	1.4
5	2	1.4
6	4	2.0
7	5	1.0
8	3	1.4
9	2	1.8
10	5	1.5
11	4	1.4
12	5	2.0
13	3	1.7
14	1	0.8
15	3	1.0
16	3	1.9
17	4	0.8
18	4	1.8
19	2	2.1
20	4	1.5
21	2	1.6
22	6	1.5

ตารางผนวก ข1 (ต่อ)

ซ้ำที่	จำนวนยอด	ความยาวต้น(ชม.)
23	2	1.7
24	2	1.7
25	5	1.5
26	4	1.0
27	4	2.0
28	2	1.3
29	2	1.0
30	3	1.8
31	2	1.5
32	4	1.2
33	2	1.3
34	4	1.4
35	2	2.2
36	2	1.3
37	3	1.0
38	3	1.5
39	3	1.2
40	3	1.4
ค่าเฉลี่ย	3.1	1.5

ตารางผนวก ข2 ผลการชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการ
เจริญเติบโต IBA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชำที่	จำนวนยอด	จำนวนราก	ความยาวต้น(ซม.)	ความยาวราก(ซม.)
1	1	1	2.5	6.4
2	2	2	4.5	9.5
3	1	2	1.5	0.6
4	3	0	2	0
5	1	2	2.5	3.2
6	3	2	2.6	3.2
7	1	2	3	1.7
8	2	1	2.2	4.5
9	3	0	1.5	0
10	1	1	1.8	1.7
11	2	1	2.2	0.8
12	2	0	1.5	0
13	1	1	7.2	0.6
14	2	0	2.4	0
15	1	1	3	1.8
16	2	2	3.2	2.8
17	2	0	2.6	0
18	1	1	2	2.3
19	1	0	3.5	0
20	3	1	2	0.5
21	2	0	2	0
22	3	2	2.2	6.5

ตารางผนวก ข2 (ต่อ)

ซ้ำที่	จำนวนยอด	จำนวนราก	ความยาวต้น(ชม.)	ความยาวราก(ชม.)
23	3	3	4	6.5
24	2	1	3	0.5
25	2	2	2	7
26	1	1	3	2.2
27	1	1	2.3	0.5
28	2	3	2.5	2.5
29	3	1	2.8	12
30	2	3	2.5	4.5
31	2	1	2.5	0.5
32	2	2	2	1
33	2	2	2	14.5
34	2	1	2.5	11
35	1	1	2.7	10.6
36	1	2	2.3	1.5
37	2	1	2	5
38	1	0	2	0
39	2	2	3.5	6.5
40	1	2	2	0.6
ค่าเฉลี่ย	1.8	1.3	2.6	3.3



ภาคผนวก ค

ผลวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโซมาโคลนด้วยวิธี

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

ตารางผนวก ก1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ต่างๆ

ตัวอย่างที่	จำนวนแถบดีเอ็นเอ									
	Universal primer1	Universal primer3	Universal primer6	OPA-01 (12)	OPA-02 (11)	OPA-04 (13)	OPA-08 (15)	OPA-10 (9)	OPA-16 (11)	OPA-18 (11)
	(5)	(9)	(11)							
1	5	9	11	10	11	11	14	8	11	11
2	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
3	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
4	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
5	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
6	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
7	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
8	5	9	11	12	11	9	15	8	10	9
9	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
10	5	9	10	11	11	11	14	8	10	11
11	5	9	11	12	11	11	15	9	10	9
12	5	9	11	11	11	12	14	9	10	10
13	5	9	11	11	11	12	14	9	10	10
14	5	9	11	12	11	11	15	9	10	9

ตารางผนวก ค1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนแถบดีเอ็นเอ									
	Universal primer1	Universal primer3	Universal primer6	OPA-01 (12)	OPA-02 (11)	OPA-04 (13)	OPA-08 (15)	OPA-10 (9)	OPA-16 (11)	OPA-18 (11)
	(5)	(9)	(11)							
15	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
16	5	9	11	12	11	11	15	9	10	9
17	5	9	10	10	11	11	14	8	10	11
18	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
19	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
20	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
21	5	9	11	12	11	11	14	8	10	9
22	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
23	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
24	5	9	11	11	11	12	14	8	10	10
25	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
26	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
27	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
28	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9

ตารางผนวก ค1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนแถบดีเอ็นเอ									
	Universal primer1	Universal primer3	Universal primer6	OPA-01 (12)	OPA-02 (11)	OPA-04 (13)	OPA-08 (15)	OPA-10 (9)	OPA-16 (11)	OPA-18 (11)
	(5)	(9)	(11)							
29	5	9	11	10	11	11	14	8	10	10
30	5	9	11	10	11	11	14	8	10	10
31	5	9	11	11	11	12	15	8	10	10
32	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
33	5	9	11	11	11	12	15	8	10	9
34	5	9	11	12	11	12	15	8	10	10
35	5	9	11	12	11	12	15	8	10	9
36	5	9	11	12	11	11	15	7	10	9
37	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
38	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
39	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
40	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9
control	5	9	11	12	11	11	15	8	10	9

ตารางผนวก ค2 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Universal primer1 กับ โขมา
โคลนของเสาวรสปันธ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวรสปันธ์	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ Universal primer1				
	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค2 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรส	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ Universal primer1				
	1	2	3	4	5
25	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค3 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Universal primer 3 กับ โขมาโคลนของเสาวรสปันธ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวรสปันธ์	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ Universal primer 3								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค3 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรส	แถบสีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ Universal primer 3								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค4 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Universal primer 6 กับ โขมาโคลนของเสาวรสปันธ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวรสปันธ์	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ Universal primer 6										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค4 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรศ	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ Universal primer 6										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค5 ผลการสังเกตระหัสเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-01 กับโซมาโคลนของ
เสาวรสปันธ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวรสปันธ์	แถบสีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-01											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค5 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรส	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-01											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค6 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02 กับโซมาโคลนของ
เสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวร	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-02										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค6 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรศ	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-02										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค7 ผลการสังเคราะห์หัตถ์เอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04 กับโซมาโคลนของ
เสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวร	แถบสีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-04												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
3	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
4	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
5	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
6	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
7	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
8	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
11	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
15	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
16	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
18	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
19	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
20	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
21	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
22	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
23	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ก7 (ต่อ)

ตัวอย่างเสารส	แถบสีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-04												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
25	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
26	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
27	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
28	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
29	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
37	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
38	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
39	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
40	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1

ตารางผนวก ค8 ผลการสังเกตระหัสดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-08 กับโซมาโคลนของ
เสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวร	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-08														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค8 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรส	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-08														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค9 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 กับโซมาโคลนของ
เสาวรพันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวร	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-10								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2	1	1	1	1	1	1	1	0	1
3	1	1	1	1	1	1	1	0	1
4	1	1	1	1	1	1	1	0	1
5	1	1	1	1	1	1	1	0	1
6	1	1	1	1	1	1	1	0	1
7	1	1	1	1	1	1	1	0	1
8	1	1	1	1	1	1	1	0	1
9	1	1	1	1	1	1	1	0	1
10	1	1	1	1	1	1	1	0	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	0	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	0	1
18	1	1	1	1	1	1	1	0	1
19	1	1	1	1	1	1	1	0	1
20	1	1	1	1	1	1	1	0	1
21	1	1	1	1	1	1	1	0	1
22	1	1	1	1	1	1	1	0	1
23	1	1	1	1	1	1	1	0	1
24	1	1	1	1	1	1	1	0	1

ตารางผนวก ค9 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรศ	แถบสีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-10								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
25	1	1	1	1	1	1	1	0	1
26	1	1	1	1	1	1	1	0	1
27	1	1	1	1	1	1	1	0	1
28	1	1	1	1	1	1	1	0	1
29	1	1	1	1	1	1	1	0	1
30	1	1	1	1	1	1	1	0	1
31	1	1	1	1	1	1	1	0	1
32	1	1	1	1	1	1	1	0	1
33	1	1	1	1	1	1	1	0	1
34	1	1	1	1	1	1	1	0	1
35	1	1	1	1	1	1	1	0	1
36	1	1	1	1	1	1	1	0	0
37	1	1	1	1	1	1	1	0	1
38	1	1	1	1	1	1	1	0	1
39	1	1	1	1	1	1	1	0	1
40	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Control	1	1	1	1	1	1	1	0	1

ตารางผนวก ค10 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-16 กับโซมาโคลนของ
เสาวรสปันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวรสป	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-16										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค10 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรศ	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-16										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
25	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค11 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18 กับโซมาโคลนของ
เสาวรสปันธุ์สีม่วง 40 ตัวอย่างและ Control

ตัวอย่างเสาวรสปันธุ์สีม่วง	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-18										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค11 (ต่อ)

ตัวอย่างเสาวรศ	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-18										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
25	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Control	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวก ค12 ค่าความเหมือน (similarity matrix) ของโสมโคคลนเสาวรพันธุ์สีม่วงที่ทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค RAPD

Population*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	1.0000													
2	0.9065	1.0000												
3	0.9065	1.0000	1.0000											
4	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000										
5	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000									
6	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000								
7	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000							
8	0.8879	0.9813	0.9813	0.9813	0.9813	0.9813	0.9813	1.0000						
9	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000					
10	0.9720	0.9159	0.9159	0.9159	0.9159	0.9159	0.9159	0.8972	0.9159	1.0000				
11	0.8972	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9720	0.9907	0.9065	1.0000			
12	0.9533	0.9346	0.9346	0.9346	0.9346	0.9346	0.9346	0.9159	0.9346	0.9626	0.9439	1.0000		
13	0.9533	0.9346	0.9346	0.9346	0.9346	0.9346	0.9346	0.9159	0.9346	0.9626	0.9439	1.0000	1.0000	
14	0.8972	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9720	0.9907	0.9065	1.0000	0.9439	0.9439	1.0000

ตารางผนวก ค12 (ต่อ)

Population*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
15	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
16	0.8972	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9720	0.9907	0.9065	1.0000	0.9439	0.9439	1.0000
17	0.9813	0.9065	0.9065	0.9065	0.9065	0.9065	0.9065	0.8879	0.9065	0.9065	0.8972	0.9533	0.9533	0.8972
18	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
19	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
20	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
21	0.8972	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9720	0.9907	0.9065	0.9813	0.9252	0.9252	0.9813
22	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
23	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
24	0.9626	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9252	0.9439	0.9720	0.9346	0.9907	0.9907	0.9346
25	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
26	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
27	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
28	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907

ตารางผนวก ค12 (ต่อ)

Population*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
29	0.9626	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9252	0.9439	0.9533	0.9346	0.9720	0.9720	0.9346
30	0.9626	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439	0.9252	0.9439	0.9533	0.9346	0.9720	0.9720	0.9346
31	0.9533	0.9533	0.9533	0.9533	0.9533	0.9533	0.9533	0.9346	0.9533	0.9626	0.9439	0.9813	0.9813	0.9439
32	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
33	0.9439	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626	0.9439	0.9626	0.9533	0.9533	0.9720	0.9720	0.9533
34	0.9439	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626	0.9439	0.9626	0.9533	0.9533	0.9720	0.9720	0.9533
35	0.9346	0.9720	0.9720	0.9720	0.9720	0.9720	0.9720	0.9533	0.9720	0.9439	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626
36	0.8972	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907	0.9720	0.9907	0.9065	0.9813	0.9252	0.9252	0.9813
37	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
38	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
39	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
40	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907
41	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9813	1.0000	0.9159	0.9907	0.9346	0.9346	0.9907

ตารางผนวก ค12 (ต่อ)

Population*	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
15	1.0000													
16	0.9907	1.0000												
17	0.9065	0.8972	1.0000											
18	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000										
19	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000									
20	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000								
21	0.9907	0.9813	0.8972	0.9907	0.9907	0.9907	1.0000							
22	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000						
23	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000					
24	0.9439	0.9346	0.9626	0.9439	0.9439	0.9439	0.9346	0.9439	0.9439	1.0000				
25	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000			
26	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000		
27	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	
28	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

ตารางผนวก ค12 (ต่อ)

Population*	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
29	0.9439	0.9346	0.9626	0.9439	0.9439	0.9439	0.9346	0.9439	0.9439	0.9813	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439
30	0.9439	0.9346	0.9626	0.9439	0.9439	0.9439	0.9346	0.9439	0.9439	0.9813	0.9439	0.9439	0.9439	0.9439
31	0.9533	0.9439	0.9533	0.9533	0.9533	0.9533	0.9439	0.9533	0.9533	0.9907	0.9533	0.9533	0.9533	0.9533
32	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
33	0.9626	0.9533	0.9439	0.9626	0.9626	0.9626	0.9533	0.9626	0.9626	0.9813	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626
34	0.9626	0.9533	0.9439	0.9626	0.9626	0.9626	0.9533	0.9626	0.9626	0.9813	0.9626	0.9626	0.9626	0.9626
35	0.9720	0.9626	0.9346	0.9720	0.9720	0.9720	0.9626	0.9720	0.9720	0.9720	0.9720	0.9720	0.9720	0.9720
36	0.9907	0.9813	0.8972	0.9907	0.9907	0.9907	0.9813	0.9907	0.9907	0.9346	0.9907	0.9907	0.9907	0.9907
37	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
38	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
39	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
40	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
41	1.0000	0.9907	0.9065	1.0000	1.0000	1.0000	0.9907	1.0000	1.0000	0.9439	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

ตารางผนวก ค12 (ต่อ)

Population*	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
29	1.0000												
30	1.0000	1.0000											
31	0.9720	0.9720	1.0000										
32	0.9439	0.9439	0.9533	1.0000									
33	0.9626	0.9626	0.9907	0.9626	1.0000								
34	0.9626	0.9626	0.9907	0.9626	0.9813	1.0000							
35	0.9533	0.9533	0.9813	0.9720	0.9907	0.9907	1.0000						
36	0.9346	0.9346	0.9439	0.9907	0.9533	0.9533	0.9626	1.0000					
37	0.9439	0.9439	0.9533	1.0000	0.9626	0.9626	0.9720	0.9907	1.0000				
38	0.9439	0.9439	0.9533	1.0000	0.9626	0.9626	0.9720	0.9907	1.0000	1.0000			
39	0.9439	0.9439	0.9533	1.0000	0.9626	0.9626	0.9720	0.9907	1.0000	1.0000	1.0000		
40	0.9439	0.9439	0.9533	1.0000	0.9626	0.9626	0.9720	0.9907	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
41	0.9439	0.9439	0.9533	1.0000	0.9626	0.9626	0.9720	0.9907	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ

นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว

เกิดวันที่

17 มกราคม พ.ศ. 2527

สถานที่เกิด

โรงพยาบาลภูมิพล กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) ปี พ.ศ. 2548

