

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวเฉาโดยใช้แผนที่ละเอียด ระดับโมเลกุล

1. พันธุ์มะเขือเทศสำหรับการทดลอง

1.1 พันธุ์ต้านทานโรคที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อ

- L285 (*L. esculentum* var *cerasiforme*) ใช้สำหรับถ่ายทอดยีนต้านทานโรคเหี่ยวเฉา 3 ตำแหน่ง คือ โครโมโซม 2 (QTL2) โครโมโซม 6 (QTL6.1) และ โครโมโซม 10 (QTL10) โดยมะเขือเทศพันธุ์นี้มีลักษณะการเจริญเติบโตเป็นแบบทอดยอด (indeterminate) ผลมีลักษณะเป็น (oblate) มีน้ำหนักต่อผลประมาณ 30 กรัม ผลสีส้มออกแดง

1.2 พันธุ์อ่อนแอที่ใช้เป็นพันธุ์แม่

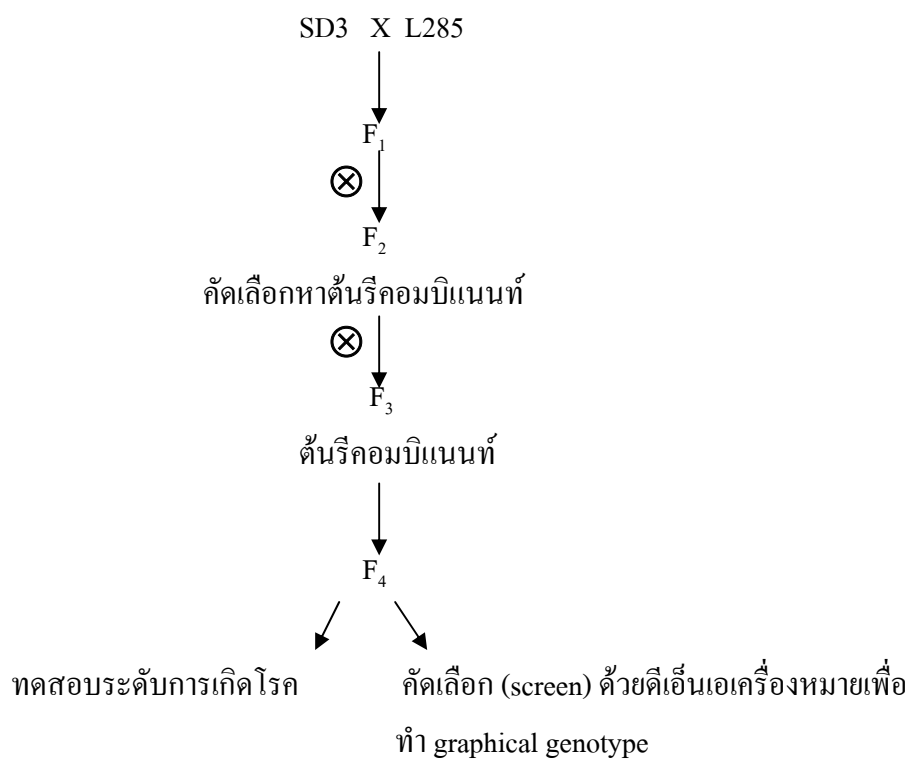
- พันธุ์สีดาทิพย์ 3 ซึ่งเป็นมะเขือเทศชนิดรับประทานสดเป็นพันธุ์ทางการค้า อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเฉา โดยมีลักษณะประจำพันธุ์ของลักษณะผลเป็นรูปไข่ (ovate) ผลสีชมพู และมีลักษณะของการเจริญเติบโตแบบกึ่งทอดยอด (semi-indeterminate) ได้รับการปรับปรุงให้ทนต่อสภาพอากาศร้อนจึงสามารถเพาะปลูกได้ดีในพื้นที่ภาคกลาง

2. การสร้างประชากร

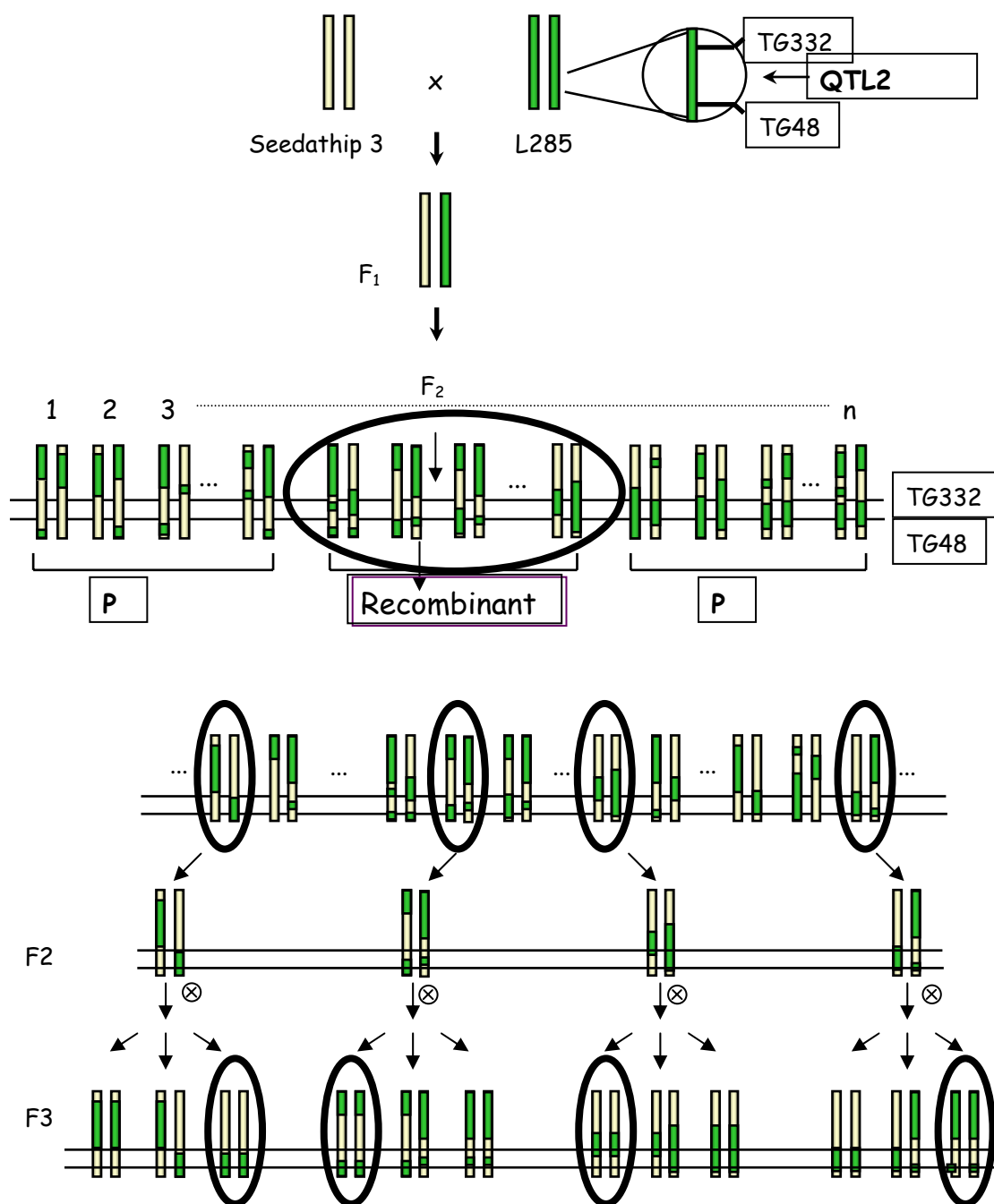
สร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเฉาและมีรูปร่างผลเป็นรูปไข่เป็นต้นแม่ กับพันธุ์ L285 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเฉาและมีรูปร่างผลเป็นผลแบนเป็นต้นพ่อ ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของ F_1 โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 และ TG332 จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อให้ได้เมล็ดรุ่น F_2 นำเมล็ด F_2 ออกปลูกได้จำนวนต้น 1,200 ต้น คัดต้นที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 กับ TG332 (เรียกว่าต้นรีคอมบิแนนท์) เก็บเมล็ดต้นรีคอมบิแนนท์จากประชากรในรุ่น F_2 นำไปเพาะเมล็ดคัดเลือกต้นมะเขือเทศรุ่น F_3 ต้นรีคอมบิแนนท์ที่เป็นโฮโมไซโกตสำหรับ

ดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้ง 2 (homozygous recombinant, ต้นรีคอมบิแนนท์ที่เป็นโฮโมไซโกต) ดังภาพที่ 1, 2

แผนผังการสร้างประชากร



ภาพที่ 1 แผนผังการสร้างประชากรต้นรีคอมบิแนนท์



ภาพที่ 2 ภาพจำลองโครโมโซม 2 แสดงการคัดเลือกหาต้นรีคอมบิแนนท์

3. แผนที่จะเยี่ยระดับโมเลกุล

นำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่วางตัวอยู่ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 และ TG332 จำนวน 16 ตำแหน่งนำไปตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างต้นพ่อและต้นแม่ พบว่ามีตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างและสามารถนำมาใช้สำหรับคัดเลือกลักษณะที่ได้อีก 5 ตำแหน่ง โดยแบ่งเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซเทลไลท์ (microsatellite) 3 ตำแหน่ง และ SSCP (single strand conformational polymorphism) 2 ตำแหน่งโดยแสดงรายละเอียดใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประเภทของดีเอ็นเอเครื่องหมายและเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และชนิดของเจลที่ให้ความแตกต่างทางจีโนไทป์ในประชากรรุ่น F₁ F₂ F₃ และ F₄

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	ประเภทของดีเอ็นเอเครื่องหมาย	เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	Gel matrix*
TG48	CAPS	<i>HindIII</i>	A
TG332	CAPS	<i>HeaIII</i>	A
TG462	SSCP	<i>AluI</i>	B
TG373	SSCP	<i>AluI</i>	B
SSR26	SSR	NA	C
SSR32	SSR	NA	C
SSR598	SSR	NA	C

* A = agarose 1%, 1 X TAE (tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer)

B = acrylamide 6 %, (nondenaturing polyacrylamide gels), 1 X TBE (tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)

C = acrylamide 4.5 % (denaturing polyacrylamide gels), 1 X TBE (tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)

NA= Not Applicable

ปลูกมะเขือเทศรุ่น F₄ ต้นรีคอมบิแนนท์ที่เป็นโฮโมไซโกตที่ได้ เพื่อสกัดดีเอ็นเอจากใบมะเขือเทศตามวิธีของ Fulton *et al.* (1995) จากนั้นนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ระหว่าง TG48 และ TG332 ที่มีความแตกต่างในพ่อแม่ คือ TG462 SSR32 SSR598 SSR26 และ TG373 นำมาคัดเลือกลักษณะที่มียีนที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม หลังจากนั้นนำข้อมูลทางจีโนไทป์ที่ได้ไปเข้า

โปรแกรม GGT32 (Ralph van Berloo, 1999) เพื่อแสดงตำแหน่งแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 และ TG332

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Fulton *et al.* (1995) มีขั้นตอนดังนี้ เก็บใบจากส่วนยอดของต้นกล้าที่มีอายุ 5-7 วันหลังจากเพาะกล้าเก็บใบจำนวน 1 ใบใส่ในหลอด microtube 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (0.35M sucrose, 0.1 M tris-base, 5mM EDTA pH8.0), nuclei lysis buffer (0.2 M tris-base, 0.05 M EDTA pH8.0, 2M NaCl, 2 เปอร์เซ็นต์ cetlyrtiammonium bromide) และ 5 เปอร์เซ็นต์ sarkosyl ในอัตราส่วน 2.5:2.5:1 แล้วเติม 1 เปอร์เซ็นต์ sodium meta bisulfite (NaHSO_4) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม buffer ลงในตัวอย่างใบแต่ละหลอดจำนวน 200 ไมโครลิตร บดด้วยสว่านไฟฟ้าที่ติดด้วยหัวพลาสติกจนละเอียดแล้วเติม buffer อีก 550 ไมโครลิตร พลิกกลับไปกลับมาเบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นนำมาสกัดด้วย chloroform:isoamyl (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปกลับมาประมาณ 200 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ปริมาตรเท่าตัว พลิกกลับไปกลับมาเบา ๆ จนเห็นสายดีเอ็นเอตกตะกอนออกมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เท isopropanol ที่ง้วนแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเท 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทิ้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10mM tris; pH8, 1mM EDTA; pH 8) 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสจนดีเอ็นเอละลายหรือประมาณ 2 ชั่วโมง เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ขั้นตอนต่อไป

3.2 การตรวจสอบด้วยวิธี CAPS

3.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม, 10xPCR buffer, 1 มิลลิโมล dNTPs, 1.5 มิลลิโมล MgCl_2 , primer 1.0 ไมโครโมล (ประกอบด้วย forward 0.5 ไมโครโมล และ reverse 0.5 ไมโครโมล) และ Taq DNA polymerase 0.4 ยูนิต ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ดังต่อไปนี้ คือที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิให้ลดลงเป็น 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

(จิ้งกับคู่ไพรเมอร์) แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-2.30 นาที (จิ้งกับคู่ไพรเมอร์) จำนวน 35 รอบ

3.2.2 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะตามชนิดของดีเอ็นเอ เครื่องหมาย ดังตารางที่ 1 ตรวจสอบผลการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน 1 เปอร์เซ็นต์ วุ้นอะกาโรสย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ หรือ 4.5 เปอร์เซ็นต์อะกิลาไมด์ ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต จิ้งอยู่กับขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ

3.3 การตรวจสอบด้วยวิธี SSCP

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เช่นเดียวกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค CAPS จากนั้นนำมาตรวจสอบผลโดยดูการเคลื่อนที่บน 6 เปอร์เซ็นต์ nondenaturing polyacrylamide gel ซึ่งประกอบด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ acrylamide (acrylamide:bis-acrylamide = 19:1) และ 1XTBE buffer (0.045 โมล tris-borate, 0.001 โมล EDTA; pH8.0) ให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ใน 1XTBE buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กำลังไฟฟ้า 8 -10 วัตต์ เป็นเวลา 6 -8 ชั่วโมง แล้วจึงย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining โดยนำแผ่นเจลซึ่งติดอยู่บนกระจกแซ่และเขย่าเบา ๆ ใน 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก เป็นเวลา 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (0.1 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรต และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ฟอर्मาลดีไฮด์) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปผ่านน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว แล้วทำให้ปรากฏแถบสีด้วย developer solution (3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต, 0.05 เปอร์เซ็นต์ ฟอर्मาลดีไฮด์ และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮโอซัลเฟต) ที่แช่เย็นจัดเขย่าจนกว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 2 นาที ปล่อยให้แห้ง ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

3.4 การตรวจสอบด้วยวิธี RFLP

3.4.1 ตัดดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะตามชนิดของดีเอ็นเอ เครื่องหมายที่ต้องการตรวจสอบ ดังตารางที่ 2

3.4.2 การย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอมายังแผ่นเมมเบรน แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบนวุ้นอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5XTBE (10X stock solution =

0.89 โมลาร์ tris base, 0.89 โมลาร์ boric acid, 0.5 โมลาร์ EDTA, pH 8.0) โดยผ่านสนามไฟฟ้า ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 20 โวลต์ เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วยเอทิดีเอ็มโบรไมด์ 20 นาที ถ่ายภาพเพื่อเก็บข้อมูล นำแผ่นวุ้นแช่ใน 0.25 โมลาร์ HCl เพื่อ depurinate ดีเอ็นเอ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแช่ใน 0.4 โมลาร์ NaOH เป็นเวลา 20 นาที เพื่อ denature ดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาเคลื่อนย้าย ดีเอ็นเอจากเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน ด้วยแรง capillary เป็นเวลา 16 - 24 ชั่วโมง จึงนำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.4.3 การติดฉลากตัวตามแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ให้เป็นสายเดี่ยวโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วจึงเติม 10Xhexanucleotide mix, 10XdNTP mix และ klenow enzyme 0.4 unit นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นเติม 40 มิลลิโมล EDTA, 40 นาโนกรัม Glycogen, 0.1 โมล LiCl และ 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทเอทานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทเอทานอลทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 10 นาที แล้วจึงละลายตะกอนด้วย TE buffer ทำการตรวจสอบความเข้มข้นและประสิทธิภาพของการติดฉลากโดยการทำ dot blot ตามวิธีของ Boehringer Mannheim

3.4.4 การ Hybridization ทำ prehybridization โดยการนำแผ่นเมมเบรนใส่ในถุงพลาสติก แล้วจึงใส่ hybridization solution บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่นเมมเบรนมา Hybridize กับตัวตรวจสอบที่ติดฉลากด้วย dig-dUTP บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างและตรวจสอบโดยใช้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Boehringer Mannheim) ตรวจสอบผลโดยการนำแผ่นเมมเบรนที่ได้ไปใส่ไว้บนฟิล์มเอกซเรย์ ประมาณ 2-3 ชั่วโมง ล้างแผ่นฟิล์มตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

3.5 การตรวจสอบด้วยวิธีไมโครแซทเทลไลท์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR เช่นเดียวกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค CAPS หลังจากเสร็จปฏิกิริยา PCR นำ product ที่ได้มาเติม sequence dye (98 เปอร์เซ็นต์ formamide, 0.025 เปอร์เซ็นต์ bromphenol blue, 0.025 เปอร์เซ็นต์ xylene cyanol FF, 10mM EDTA; pH 8.0) จากนั้นนำมาตรวจผลโดยการเคลื่อนที่บน 4.5 เปอร์เซ็นต์ denaturing polyacrylamide gel ซึ่งประกอบด้วย 4.5 เปอร์เซ็นต์ acrylamide (acrylamide:bis-acrylamide = 19:1), 7.5M urea, 1Xbuffer (0.045M tris-borate, 0.001M EDTA; pH 8.0) ทำการแยกแถบดีเอ็นเอใน 1XTBE buffer ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กำลังไฟ 40 วัตต์ เป็นเวลาประมาณ 90 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีซิลเวอร์ไนเตรดเหมือนกับวิธีการย้อมดีเอ็นเอของเทคนิค SSCP

4. วิธีการผสมเกสร

4.1 การเตรียมต้นแม่ เลือกดอกที่จะบานในวันรุ่งขึ้น สังเกตจากกลีบดอกมีสีเขียวอ่อนและยังงอกลุมอยู่ ใช้ปากคีบปลายแหลมกรีดโคนก้านดอกเบา ๆ เพื่อดึงอับเกสรด้านในหลุดออกแล้วใช้สำลีหุ้มเพื่อป้องกันการถ่ายละอองเกสรจากดอกอื่น

4.2 การถ่ายละอองเกสร ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผสมคือ 6.00-11.00 นาฬิกา โดยการใช้คีมปากแหลมแตะละอองเกสรจากต้นพ่อป้ายเบา ๆ บนยอดเกสรตัวเมียแล้วใช้สำลีหุ้มไว้ตามเดิม

4.3 การเก็บเมล็ด เก็บผลมะเขือเทศที่สุกแดงเต็มที่มาผ่าแล้วแกะเมล็ดออกจากช่องภายในผล หมักเมล็ดด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 5 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นล้างกรดออกให้หมดโดยน้ำสะอาด จากนั้นนำเมล็ดมาฟุ้งไว้ในเมล็ดแห้งสนิทแล้วเก็บเมล็ดใส่ถุงเพื่อนำไปใช้เพาะต่อไป

5. การศึกษารูปร่างผล

ปลูกต้นรีคอมบีแนนท์ที่เป็นโฮโมไซโกตทั้ง 70 สายพันธุ์ ที่โรงเรือนควบคุมอุณหภูมิและความชื้นโดยให้น้ำด้วยระบบน้ำหยด 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ต่อวัน ทำการวัดความกว้างยาวของผลที่สุกแดงจำนวน 5 ผลต่อต้น

6. การปลูกเชื้อโรคเหี่ยวเหี่ยว

นำมะเขือเทศต้นรีคอมบีแนนท์ที่เป็นโฮโมไซโกต จำนวน 47 สายพันธุ์เพาะเมล็ดในกระบะเพาะเมล็ดขนาด 72 หลุม โดยใช้วัสดุเพาะคือ พีทมอส เมื่อต้นกล้าอายุได้ 4-5 สัปดาห์ ย้ายปลูกลงในกระบะขนาด 40-60 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุด้วยดินผสม (แกลบเผา : ขุยมะพร้าว : ปุ๋ยคอก 1:1:1) ที่อบฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปวางในโรงเรือนที่ภาควิชาโรคพืช เป็นเวลา 1 อาทิตย์เพื่อรอทำการปลูกเชื้อ

เชื้อ *R. solanacearum* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ RS160 จากจังหวัดนครปฐม นำเข้ามาเลี้ยงในจานแก้วขนาด 9 เซนติเมตร เพื่อคัดแยกโคโลนีเดี่ยวโดยนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งเลือกจำเพาะ (semi-selective media) ที่มี 2, 3, 5 triphenyl chloride TZC (Kelman, 1954) ซึ่งคุณลักษณะของเมือกและผิวของโคโลนี เชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรง (virulent type) มีรูปแบบของโคโลนีเป็นแบบเยิ้มมัน รูปร่างไม่แน่นอนมีขอบโคโลนีสีขาวตรงกลางมีสีชมพู ขณะที่โคโลนีของเชื้อที่ไม่สามารถทำให้เกิดโรครุนแรง (avirulent type) มีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบโคโลนีสีขาวตรงกลางจะมีสีแดงเข้มและบวมที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 วัน นำน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วมาละลายเชื้อ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นให้ได้ค่า OD₅₉₀ เท่ากับ 0.2 ซึ่งเทียบเท่ากับเชื้อ 10⁸ cfu/ml ทำการปลูกเชื้อโดยวิธี scalpel leaf-clip คือ ใช้มีดโกนจุ่มสารละลายเชื้อ ตัดใบจริง 2 ใบแรกที่อยู่เหนือใบเลี้ยง โดยแบ่งการทดสอบโรคเป็น 2 ชุด โดยทดลองชุดแรกจำนวน 27 สายพันธุ์ ในเดือน พฤศจิกายน 2547 ถึงเดือน มกราคม 2548 และชุดที่ 2 จำนวน 20 สายพันธุ์ในเดือน ธันวาคม 2547 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2548

ทำการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมีต้นรีคอมบีแนนท์ที่เป็นโฮโมไซโกต แต่ละสายพันธุ์ จัดเป็นทรีทเมนต์ เปรียบเทียบระดับการเกิดโรคของมะเขือเทศต้นรีคอมบีแนนท์แต่ละต้นกับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 โดยให้แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ โดยใน 1 ซ้ำมี 15 ต้น ทำการวิเคราะห์

ค่าทางสถิติแบบ nonparametric โดยวิธี wilcoxon rank test โดยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SAS (SAS Institute, 1989)

การบันทึกผลให้คะแนนการเกิดโรคหลังปลูกถ่ายเชื้อที่ 7, 11, 14, 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อ โดยการนับจำนวนใบที่แสดงอาการเหี่ยวเพื่อกำหนดระดับอาการเกิดโรคจัดเป็น 5 ระดับดังนี้ (Kelman, 1954)

- 1 = ไม่เกิดโรค
- 2 = ใบเหี่ยว 1 ใบ
- 3 = ใบเหี่ยว 2 ใบ
- 4 = ใบเหี่ยว 3 ใบ หรือมากกว่า
- 5 = ต้นมะเขือเทศตาย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

เปรียบเทียบระดับความต้านทาน ตามเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	ระดับความต้านทาน
80 - 100 เปอร์เซ็นต์	ต้านทาน (R)
60 - 79 เปอร์เซ็นต์	ค่อนข้างต้านทาน (MR)
30 - 59 เปอร์เซ็นต์	ค่อนข้างอ่อนแอ (MS)
0 - 29 เปอร์เซ็นต์	อ่อนแอ (S)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทาง จีโนไทป์ที่ทำ graphical genotype มาเทียบสัดส่วนความกว้างและความยาวของผล เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับรูปร่างผล และความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเฉียวสายพันธุ์ RS160 เปรียบเทียบสัดส่วนความกว้างและยาวของกลุ่มจีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่งของ ดีเอ็นเอเครื่องหมายโดยวิธี t-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยวิธี wilcoxon rank-sum test เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายในแต่ละตำแหน่งกับลักษณะของรูปร่างผลและความต้านทานโรค

การทดลองที่ 2 การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวเป็น 1, 2 และ 3 ตำแหน่ง

1. พันธุ์มะเขือเทศที่ใช้สำหรับการทดลอง

1.1 พันธุ์รับ (recurrent parent) ใช้มะเขือเทศพันธุ์การค้า คือ

พันธุ์สัปดาห์ที่ 3 ซึ่งเป็นมะเขือเทศชนิดรับประทานสด ที่เป็นพันธุ์การค้า ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว โดยมีผลเป็นรูปไข่ (ovate) ผลสีชมพู และมีลักษณะของการเจริญเติบโตแบบกึ่งทอดยอด (semi-indeterminate) ได้รับการปรับปรุงให้ทนต่อสภาพอากาศร้อนจึงสามารถเพาะปลูกได้ดีในพื้นที่ภาคกลาง

1.2 พันธุ์ให้ (donor parent) ใช้มะเขือเทศที่มียืนควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวที่แตกต่างกัน 2 พันธุ์ คือ

1.2.1 พันธุ์ L285 (*L. esculentum* var *cerasiforme*) ใช้สำหรับถ่ายทอดยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว 3 ตำแหน่ง คือ โครโมโซม 2 (QTL2) โครโมโซม 6 (QTL6.1) และ โครโมโซม 10 (QTL10) โดยมีมะเขือเทศพันธุ์นี้มีลักษณะการเจริญเติบโตเป็นแบบทอดยอด (indeterminate) ผลแป้น (oblate) มีน้ำหนักต่อผลประมาณ 30 กรัม โดยผลมีสีส้มออกแดง

1.2.2 พันธุ์ Hawaii7996 (*L. esculentum* var *Hawaii7996*) ใช้สำหรับถ่ายทอดยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวในตำแหน่งบนโครโมโซม 6 (QTL6.2) โดยมีมะเขือเทศพันธุ์นี้มีลักษณะการเจริญเติบโตเป็นแบบกึ่งทอดยอด (semi-indeterminate) รูปร่างผลเป็นแบบกลมแป้น (oblate) น้ำหนักต่อผลประมาณ 30-80 กรัม ผลมีสีส้มแดง

2. วิธีการคัดเลือก

คัดเลือกต้นลูกผสมที่มียืนควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ชิดติดกับยีน (link) ที่ควบคุมความต้านทานโรค 4 ตำแหน่ง ดังนี้

2.1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้

- 2.1.1 ตำแหน่ง QTL2 ได้แก่ TG48 และ TG332 โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรม 13.7 cM
- 2.1.2 ตำแหน่ง QTL6.1 ได้แก่ TG73 และ TG365 โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรม 4.1 cM
- 2.1.3 ตำแหน่ง QTL6.2 ได้แก่ CP18 และ TG118 โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรม 12.8 cM
- 2.1.4 ตำแหน่ง QTL10 ได้แก่ TG230, CT234 และ TG285 โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง TG230 กับ CT234 เป็น 20.8 cM และระหว่าง CT234 กับ TG285 เป็น 16.5 cM

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกร่วมออกเป็น 3 ประเภท โดยดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละประเภทให้ความแตกต่างระดับจีโนไทป์ ณ ตำแหน่งของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ประเภทของดีเอ็นเอเครื่องหมายและเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ความแตกต่างทางจีโนไทป์

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	ประเภทของดีเอ็นเอเครื่องหมาย	เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	Gel matrix*
TG48	CAPS	<i>HindIII</i>	A
TG332	CAPS	<i>HeaIII</i>	A
TG73	SSCP	<i>HeaIII</i>	B
TG365	RFLP	<i>EcoRV</i>	NA
TG118	CAPS	<i>BstNI</i>	B
CP18	CAPS	<i>HinfI</i>	B
TG230	CAPS	<i>Dra I</i>	C
CT234	CAPS	<i>Dra I</i>	C
TG285	CAPS	<i>BglIII</i>	A

*A = Agarose 1%, 1 X TAE (Tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer)

B = Acrylamide 6 %, (nondenaturing polyacrylamide gels), 1 X TBE (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)

C = Acrylamide 4.5 % (denaturing polyacrylamide gels), 1 X TBE (Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer)

NA= Not Applicable

3. การสร้างสายพันธุ์คู่แฝด (ภาพที่ 3)

3.1 การสร้างลูกผสม (F_1) โดยใช้มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นต้นแม่ ผสมเข้ากับต้นพ่อที่มียืนควบคุมความต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่งต่าง ๆ กัน ได้ลูกผสมเป็น 2 กลุ่ม คือ

3.1.1 สีดาทิพย์ 3 X L285

3.1.2 สีดาทิพย์ 3 X H7996

3.2 แยกลูกผสมที่สร้างจากต้นพ่อที่เป็นพันธุ์ L285 และ H7996 ออกเป็น 6 สายพันธุ์ เพื่อให้มียืนควบคุมความต้านทานโรคเป็น 1 ตำแหน่ง ที่แตกต่างกัน โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์อยู่กับยืนควบคุมความต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่งช่วยในการคัดเลือก ดังนี้

3.2.1 สีดาทิพย์ 3 X L285 (QTL2) (ณัญยา, 2547)

3.2.2 สีดาทิพย์ 3 X L285 (QTL6.1) (ณัญยา, 2547)

3.2.3 สีดาทิพย์ 3 X L285 (QTL10)

3.2.4 สีดาทิพย์ 3 X L285 (TG48) (ณัญยา, 2547)

3.2.5 สีดาทิพย์ 3 X L285 (TG285/CT234)

3.2.6 สีดาทิพย์ 3 X H7996 (QTL6.2) (ณัญยา, 2547)

3.3 นำลูกผสมที่คัดเลือกได้ว่ามียืนควบคุมความต้านทานโรคผสมกลับไปยังต้นแม่ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ คัดเลือกต้นลูกผสมและทำการผสมกลับไปยังพันธุ์รับเช่นนี้จนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 6 (BC_6) ทำให้ได้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนควบคุมความต้านทานเป็น 1 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 3

3.4 เมื่อได้สายพันธุ์คู่แฝดที่มีอินควมคุมความต้านทานโรคเป็น 1 ตำแหน่งในแต่ละสายพันธุ์แล้ว ทำการผสมต้นลูกผสมกลับชั่วที่ 6 ของสายพันธุ์คู่แฝดที่มีอินควมคุมความต้านทานโรคเป็น 1 ตำแหน่งที่แตกต่างกันเข้าด้วยกัน เพื่อให้ได้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มีอินควมคุมความต้านทานโรคเป็น 2 และ 3 ตำแหน่ง ตามลำดับ จำนวน 5 สายพันธุ์ดังนี้

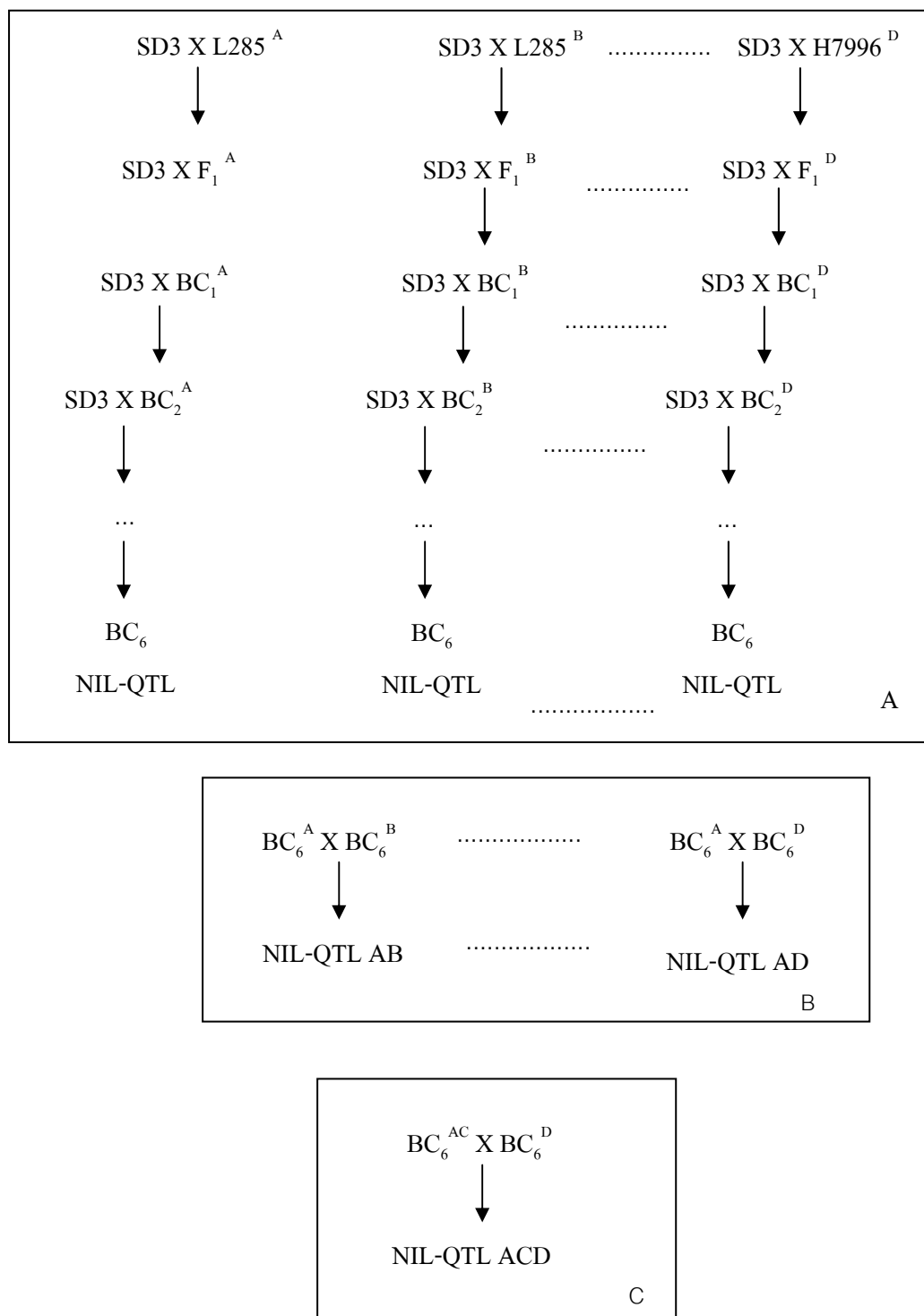
3.4.1 สีดาทิพย์ 3 X L285 (QTL2/10)

3.4.2 สีดาทิพย์ 3 X L285 (QTL2/6.1)

3.4.3 สีดาทิพย์ 3 X L285 X H7996 (QTL6.2/10)

3.4.4 สีดาทิพย์ 3 X L285 X H7996 (QTL2/6.2)

3.4.5 สีดาทิพย์ 3 X L285 X H7996 (QTL2/6.2/10)



ภาพที่ 3 แผนผังการสร้างพันธุ์ A) สายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนควบคุมความต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่ง B) และ C) การรวมยีน 2 และ 3 ตำแหน่งที่แตกต่างเข้าด้วยกัน

4. การทดสอบระดับการเกิดโรค

มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่สร้างขึ้นแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะทาง graphical genotype ดังภาพที่ 4 และ 5 โดยจะพบว่าบนโครโมโซม 2 เกิดรีคอมบิเนชันระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 และ TG332 ที่ใช้ในการคัดเลือก แสดงให้เห็นภาพของสัดส่วนทางพันธุกรรมที่ได้รับมาจากพันธุ์ด้านทานอย่างเฉพาะเจาะจงในแต่ละสายพันธุ์ โดยมีพันธุกรรมเกือบทั้งหมดของจีโนม ที่เหมือนกับมะเขือเทศพันธุ์สัปดาห์ที่ 3 และได้ทำการทดสอบระดับการเกิดโรคของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้โดยทำการทดสอบ ทั้งหมด 4 ครั้ง ด้วยเชื้อ *R. solanacearum* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ RS27 RS140 RS145 และ RS160 การเตรียมเชื้อเหมือนกับการทดลองที่ 1 โดยทำการปลูกเชื้อ 2 แบบ คือ

4.1 การปลูกเชื้อแบบตัดใบ โดยใช้ใบมีดโกนจุ่มสารละลายเชื้อที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.2 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml ตัดใบจริง 2 ใบแรกที่อยู่เหนือใบเลี้ยง โดยแต่ละทริทเมนต์ใช้ต้นมะเขือเทศจำนวน 15 ต้น

โดยทดสอบโรคมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดจำนวน 11 สายพันธุ์ดังนี้ NIL-QTL2, NIL-QTLTG48, NIL-QTL6.1, NIL-QTL6.2, NIL-QTL10, NIL-QTLTG285/CT234, NIL-QTL6.2/10, NIL-QTL2/10, NIL-QTL2/6.2, NIL-QTL2/6.1, NIL-QTL2/6.2/10 ในปี 2547 จำนวน 2 ครั้ง คือ ทดสอบครั้งที่ 1 ในช่วงเดือนมิถุนายน ถึงเดือนสิงหาคม ทดสอบโรคครั้งที่ 2 ในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนกันยายน

4.2 การปลูกเชื้อแบบราดดิน โดยนำเมล็ดมะเขือเทศที่ต้องการทดสอบเพาะในวัสดุปลูก (peat moss) ในกระบะเพาะจนกระทั่งต้นมะเขือเทศมีอายุ 4-5 สัปดาห์ ทำการย้ายต้นกล้ามะเขือเทศลงในดินปลูกที่มีส่วนผสมของ ขี้เถ้าแกลบ: ขุยมะพร้าว: มูลเป็ด ในอัตราส่วน 1: 1:1 ในกระถางขนาด 6 นิ้ว นำไปวางในกระบะ ๆ ละ 12 ต้น หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ ทำการปลูกเชื้อ โดยการราดเชื้อที่โคนต้น ๆ ละ 30 มิลลิลิตร

การทดสอบโรคมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดแบบราดดินจำนวน 11 สายพันธุ์ดังนี้ NIL-QTL2, NIL-QTLTG48, NIL-QTL6.1, NIL-QTL6.2, NIL-QTL10, NIL-QTLTG285/CT234, NIL-QTL6.2/10, NIL-QTL2/10, NIL-QTL2/6.2, NIL-QTL2/6.1, NIL-QTL2/6.2/10 ในปี 2548 จำนวน

2 ครั้ง คือทดสอบครั้งที่ 1 ในช่วงเดือนมกราคม ถึงเดือนมีนาคม ทดสอบโรคครั้งที่ 2 ในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนสิงหาคม

4.3 การเปรียบเทียบสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันโดยการทดสอบโรคที่ต่างช่วงเวลากัน

4.3.1 การทดสอบโรคทั้ง 4 ครั้ง ในปี 2547 และ 2548

ใช้การทดสอบโรคที่ต่างช่วงเวลากันและวิธีการต่างกัน 4 ครั้ง คือการทดสอบโรคแบบตัดใบจำนวน 2 ครั้ง และ การทดสอบโรคแบบবাদดินจำนวน 2 ครั้ง ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 L285 และ H7996 ที่ 14 วันหลังปลูกเชื้อ เปรียบเทียบความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในการทดสอบโรคแบบตัดใบในปี 2547 โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับการเกิดโรคโดยการวิเคราะห์ทางสถิติชนิด non-parametric คือ kruskal-wallis rank sum test ด้วยโปรแกรม SAS

4.3.2 การทดสอบแบบตัดใบในปี 2547

ใช้การทดสอบโรคที่ต่างช่วงเวลากัน 2 ครั้งคือ การทดสอบโรคครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 L285 และ H7996 ที่ 14 วันหลังปลูกเชื้อ สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในการทดสอบโรคแบบตัดใบปี 2547 โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับคะแนนการเกิดโรคด้วยสถิติชนิด non-parametric คือ kruskal-wallis rank sum test ด้วยโปรแกรม SAS

4.3.3 การทดสอบแบบবাদดินในปี 2548

ใช้การทดสอบโรคที่ต่างช่วงเวลากัน 2 ครั้ง คือการทดสอบโรคครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 L285 และ H7996 ที่ 18 วันหลังปลูกเชื้อ สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างของสภาพแวดล้อมในการทดสอบโรคแบบবাদดินในปี 2548 โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของระดับคะแนนการเกิดโรคด้วยสถิติชนิด non-parametric คือ kruskal-wallis rank sum test ด้วยโปรแกรม SAS

4.4 การเปรียบเทียบระดับการเกิดโรคด้วยเชื้อที่ต่างสายพันธุ์กัน

เปรียบเทียบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *R. solanacearum* จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยปลูกเชื้อดังกล่าวลงบนต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 L285 และ H7996 เปรียบเทียบระดับคะแนนการเกิดโรคที่ 14 วันหลังปลูกเชื้อโดยทดสอบแบบตัดใบครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ใช้ระดับการเกิดโรคที่ 18 วันหลังปลูกเชื้อการทดสอบโรคแบบรากดินในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ด้วยการวิเคราะห์ผลทางสถิติชนิด non-parametric คือ kruskal-wallis rank sum test ด้วยโปรแกรม SAS

4.5 เปรียบเทียบการตอบสนองในเชิงบวกของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มีอินควมคุมความต้านทานโรคตำแหน่งต่าง ๆ เทียบกับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3

4.6 เปรียบเทียบความถี่ในการตอบสนองในการปลูกเชื้อแบบรากดินและแบบตัดใบ

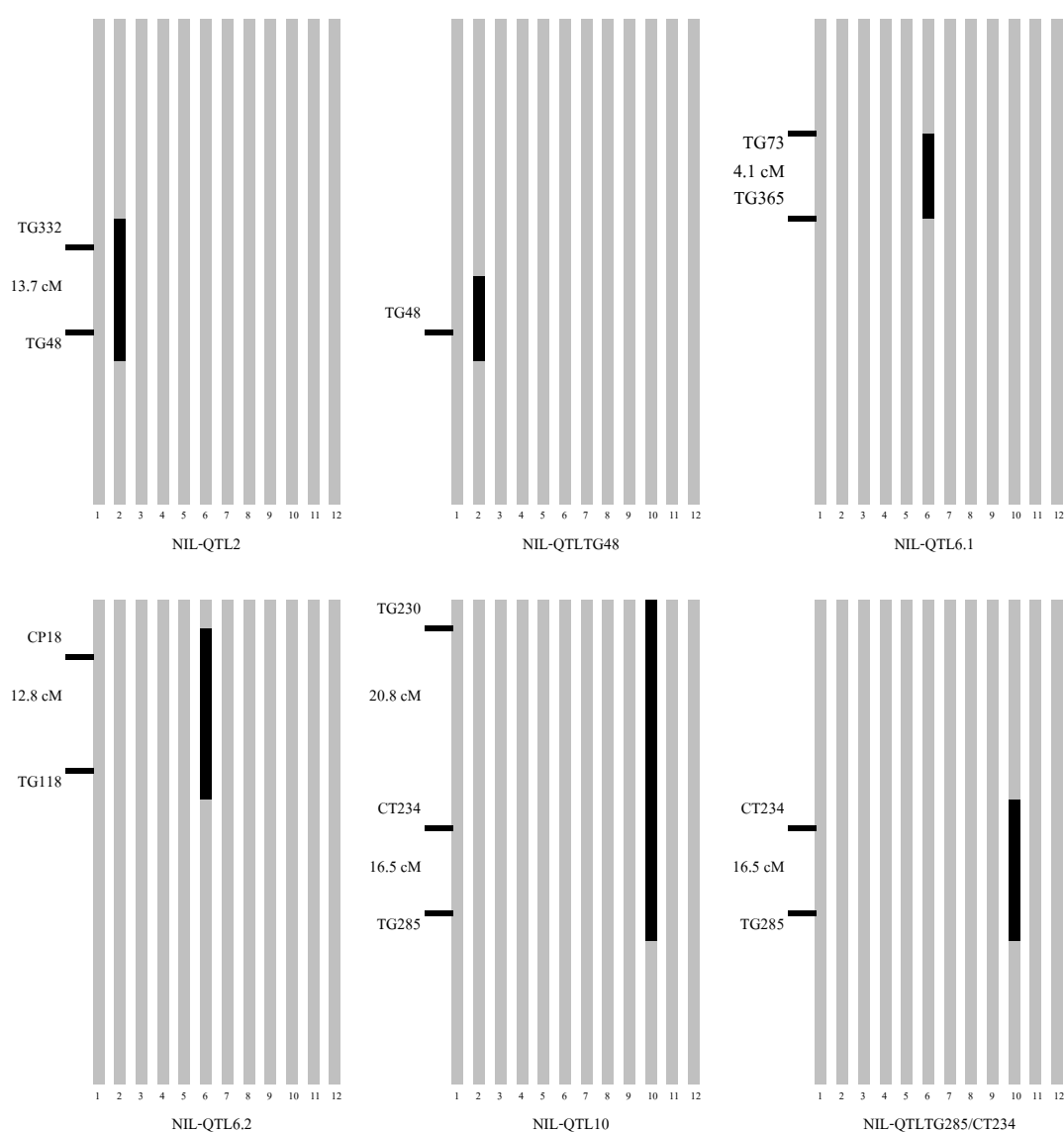
4.7 เปรียบเทียบการตอบสนองในเชิงบวกของการเพิ่มเข้ามาของตำแหน่งอินควมต้านทานของสายพันธุ์คู่แฝดที่มีอินควมคุมความต้านทานเพิ่มเข้ามาจาก 1 ตำแหน่งเป็น 2 และ 3 ตามลำดับโดยทดสอบ ด้วยสถิติชนิด non-parametric คือ kruskal-wallis rank sum test ด้วยโปรแกรม SAS

4.8 เปรียบเทียบความถี่ในการตอบสนองในเชิงบวกของการเพิ่มตำแหน่งอินควมต้านทานของสายพันธุ์คู่แฝด

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design (CRD) โดยมีสายพันธุ์คู่แฝดที่สร้างขึ้น เพื่อให้มีอินควมคุมความต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่งที่ต่างกัน รวมทั้งสายพันธุ์คู่แฝดที่มีอินควมคุมความต้านทานโรคเป็น 2 และ 3 ตำแหน่ง จัดเป็นทริทเมนต์ เปรียบเทียบระดับการเกิดโรคของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดแต่ละสายพันธุ์กับพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และสายพันธุ์ที่มีตำแหน่งอินควมต้านทานเพิ่มเข้ามา โดยให้แต่ละทริทเมนต์มี 15 ต้นในการทดลองแบบตัดใบ 1 ครั้ง และ 16 ต้นในการทดลองแบบตัดใบครั้งที่ 2 ส่วนการปลูกเชื้อแบบรากดินใช้ 8 ต้นในการทดลองครั้งที่ 1 และ 10 ต้น ในการทดลองแบบรากดินครั้งที่ 2 โดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ non-parametric โดยวิธี wilcoxon rank sum test ด้วยโปรแกรม SAS

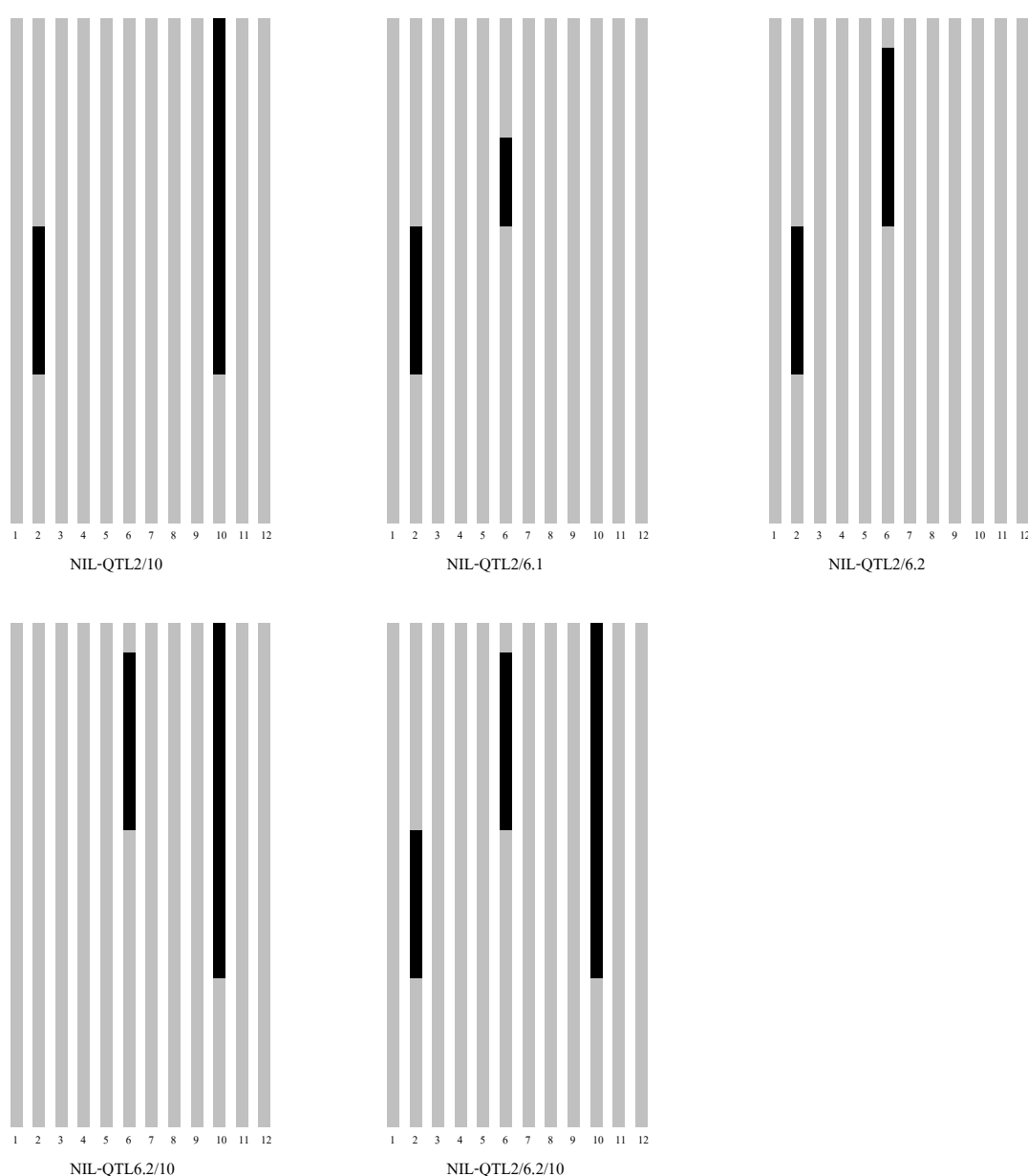
5. การบันทึกผล

บันทึกผลเหมือนการทดลองที่ 1



ภาพที่ 4 Graphical genotype ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มีส่วนของความต้านทานที่ได้มาจากพันธุ์ให้อย่างเฉพาะเจาะจงในแต่ละสายพันธุ์

1, 2, 3, ..., 12 แทน โครโมโซมแท่งที่ 1, 2, 3, ..., 12
 ■ แทน พันธุ์กรรมที่ได้จากพันธุ์รับ (สีดาทิพย์ 3)
 ■ แทน พันธุ์กรรมที่ได้จากพันธุ์ให้ (L285 หรือ H7996)



ภาพที่ 5 Graphical genotype ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่รวมยีนต้านทานในแต่ละตำแหน่งเข้าด้วยกันเป็น 2 และ 3 ตำแหน่ง

1, 2, 3, ..., 12 แทน โครโมโซมแท่งที่ 1, 2, 3, ..., 12

■ แทน พันธุกรรมที่ได้จากพันธุ์รับ (สีดาทิพย์ 3)

■ แทน พันธุกรรมที่ได้จากพันธุ์ให้ (L285 หรือ H7996)

สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

แปลงทดลองภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน

จ. นครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มต้นทำการทดลองเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2545 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2548