โครงการย่อยที่ 1
การคัดเลือกพันธุ์กล้วยน้ำว้าเพื่อผลิตวัตถุดิบเชิงอุตสาหกรรม

ชื่อโครงการ การคัดเลือกพันธุ์กล้วยน้ำว้าเพื่อผลิตวัตถุดิบเชิงอุตสาหกรรม (Clonal Selection of 'Nam Wah' Banana for Industrial Raw Material Production)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2553 **จำนวนเงิน** 800,000.- บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ วันที่ 3 มิถุนายน 2553 ถึง 2 มิถุนายน 2554

ชื่อผู้วิจัย รศ. สุรวิช วรรณไกรโรจน์[1]

นาย ชินวัฒน์ ยัพวัฒนพันธ์[2]

และรศ. ณรงค์ สิงห์บุระอุดม[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้ลายพิมพ์ DNA ในการจำแนกพันธุ์กล้วยน้ำว้า ซึ่งมีความจำเป็นในการตรวจคุณภาพวัตถุดิบเชิงอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมเภสัชภัณฑ์ พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอจากแกนกลางของเครือมาใช้จำแนกพันธุ์กล้วยได้ และสามารถบ่งบอกเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของกล้วย12 พันธุ์ได้โดยใช้ primer จำนวน 8 คู่กับเทคนิค AFLP จึงเหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจภาคสนามซึ่งง่ายและสะดวกในการใช้งาน เช่น ชุดตรวจแบบ Biosensor ต่อไป

ส่วนการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยในการประเมินความสามารถในการทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* เชื้อสาเหตุของโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า (Panama Disease) เพื่อเป็นมาตรการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อแทนการปลูกเชื้อด้วยวิธีปกติ พบว่าสามารถประเมินผลได้อย่างรวดเร็ว คือเพียง 7 วันเมื่อใช้สปอร์ปลูกเชื้อกับต้นในสภาพปลอดเชื้อ แทนที่จะต้องใช้เวลาถึง 8 เดือนตามวิธีปกติ จึงเหมาะที่จะใช้เทคนิคนี้ในการคัดพันธุ์กล้วยต้านทานโรคตายพรายซึ่งเป็นโรคระบาดรุนแรง อันมีโอกาสคุกคามพื้นที่ผลิตกล้วยน้ำว้าของประเทศไทยในอนาคต ทั้งนี้กล้วยมีการตอบสนองต่อสารสกัดหยาบจากเชื้อสาเหตุได้ช้ากว่าการตอบสนองต่อสปอร์

---

[1] Ph.D.(Horticulture) ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร 50 ถนนงามวงศ์วาน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กทม. 10900 โทรศัพท์ 081-901-2930

[2] วท. ด. (พืชสวน) ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร 50 ถนนงามวงศ์วาน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กทม. 10900 โทรศัพท์ 0-2579- 0308

[3] วท.ม. (เกษตรศาสตร์) ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร 50 ถนนงามวงศ์วาน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กทม. 10900โทรศัพท์ 0-2579-0113 ต่อ 1300

Abstract

Using correct raw material inspection for industries, especially pharmaceutical industry, is an important step for quality control and assurance. A study on using DNA fingerprint to identify cultivars of 'Nam Wah' banana was thus conducted to develop an effective identifying tool. The results showed that tissue from the core of fruit bunch could be used for DNA extraction. DNA fingerprint identities of 12 cultivars of banana were elucidated using 8 pairs of primer in AFLP technique. The result was suitable for a future development of field test kit that is user-friendly and convenient; such as bio-sensor kit.

To avoid the danger of spreading the disease, an *in vitro* evaluation methodology for the tolerant ability of 'Nam Wah' banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis,* the causing agent of Panama Disease, was developed to replace the conventional method. It was shown that inoculating spore suspension to *in vitro* plantlets was an effective mean since taking 7 days, instead of 8 months with *in vivo* plants. This method should be used in screening experiment for the resistant to this epidemic disease, which is most probably a future serious threat to the banana production in Thailand. It should be noted that adding crude extract from the pathogen to culture medium yielded slower response than using spore suspension.

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การหาชนิดหรือพันธุ์กล้วยชนิดใหม่ ที่มีศักยภาพที่จะส่งเสริมให้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นทางหนึ่งที่จะช่วยให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มเติม (Somsri, 2004) ขณะที่พันธุ์กล้วยน้ำว้าซึ่งปลูกในประเทศไทยอยู่หลายพันธุ์เช่น กล้วยน้ำว้าขาว กล้วยน้ำว้าแดง กล้วยน้ำว้าค่อม กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง กล้วยน้ำว้าดง กล้วยน้ำว้าเตี้ย และกล้วยน้ำว้ากาบเขียว ความสับสนในชื่อของพันธุ์กล้วยน้ำว้าเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนชื่อพันธุ์เมื่อนำไปปลูกในท้องที่แตกต่างกัน(เบญจมาศ, 2545)

ปัจจุบันเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเช่น AFLP analysis, RFLP analysis สามารถตรวจสอบ ชนิดพันธุ์ของไม้ผลได้อย่างแม่นยำ รวมทั้งสามารถหาวิวัฒนาการ ความเป็นมาของชนิดและพันธุ์ รวมไปถึงการหาพ่อแม่ของลูกผสมได้ เช่นมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของไม้ผลสกุลต่างๆ โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ต่างกัน เช่น พลับ ทุเรียน มังคุด มะม่วง ขนุน ลิ้นจี่ ลำไย มะละกอ เป็นต้น ทำให้สามารถยุติปัญหาความสับสนในการเรียกชื่อพันธุ์ลงได้ นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ต่างๆยังจะมีส่วนช่วยในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ด้วย (Eiadthong, 1999; Eiadthong, 2000.; Kanzaki, 2001; Somsri, 2004; Yonmori *et al.*, 2002, Yapwattanaphun *et al.*, 2004) การหา Single unique DNA sequence จาก AFLP หรือ RFLP analysis ซึ่งเป็นการพัฒนาสูงขึ้นจาก AFLP analysisทั่วไปอีกระดับหนึ่งนั้น นอกจาก

จะทำให้สามารถตรวจระบุได้แม่นยำระดับ genotype แล้ว ยังสามารถนำไปใช้พัฒนา Biosensor ที่มี oligonucleotide sandwich-hybridization assay format สำหรับงานภาคสนามได้อีกด้วย

โรคตายพรายหรือ Panama disease ซึ่งมีเชื้อราในดิน *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 เป็นเชื้อสาเหตุ นับเป็นโรคระบาดร้ายแรงอันดับที่ 1 ของกล้วยน้ำว้าในประเทศไทย โดยพบทั้งในกล้วยน้ำว้าต้นสูง คือ กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง น้ำว้านวล น้ำว้าเขียว เป็นต้น และกล้วยน้ำว้าค่อมที่ปลูกในเกือบทุกจังหวัด (ณรงค์, มปป.) แม้ว่ากล้วยน้ำว้าจะต้านทานต่อโรค sigatika (สณทรรศน์ และคณะ, มปป.) อย่างไรก็ตาม ลักษณะความทนโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้าแต่ละพันธุ์ยังไม่เคยมีผู้ใดรายงานไว้ สำหรับลักษณะการต้านทานต่อโรคนี้ ได้มีผู้รายงานไว้ว่าสามารถประเมินระดับความต้านทานได้ในสภาพปลอดเชื้อโดยการใส่ fusaric acid ที่ระดับความเข้มข้น 0.05-0.15 mM ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Matsumoto *et al.*, 1995) และยังมีรายงานการได้พันธุ์ต้านทานจากการกลายพันธุ์ของกล้วยหอมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไต้หวันอีกด้วย (Kwang and Ko, 2004)

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การตรวจยืนยันเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้าแต่ละพันธุ์

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่กล้วยน้ำว้าจำนวน 12 พันธุ์ คือ น้ำว้าดำ น้ำว้าพัทลุง น้ำว้าค่อม น้ำว้าเงิน น้ำว้าอ่างทอง น้ำโว้ มะลิอ่อง ทองมาเอง แพทแทน ตะนาวศรี ปากช่อง50 น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

<u>การทดลองที่ 1</u> การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของกล้วย

นำชิ้นส่วนของกล้วยได้แก่ ใบ เปลือกผล ก้านผล หวี และเครือกล้วย มาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อที่จะดูปริมาณ และคุณภาพของชิ้นส่วนดังกล่าวว่ามีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP หรือไม่

<u>การสกัดดีเอ็นเอ</u>

นำตัวอย่างใบ เปลือกผล ก้านผล หวี และเครือ ของกล้วย มาล้างเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่บริเวณผิวแล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) โดยชั่งชิ้นส่วนของกล้วยมาประมาณ 5 กรัมบดในโกร่งบดยาที่มีไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดแล้วย้ายลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม CTAB buffer (2% CTAB, 1% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mMTris–HCl pH 8.0) 20 มิลลิลิตรและเติม 2-mercapto-ethanol200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีนำไปเติมสารละลายที่มีส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24 ต่อ 1 โดยปริมาตร) ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตรเพื่อตกตะกอนและกำจัดโปรตีนเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันปั่นที่ระดับความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีดูดน้ำส่วนใสส่วนบนมาใส่ในหลอดใหม่ขนาด 50 มิลลิลิตรส่วนที่เหลือทิ้งไปเติมไอโซโพรพานอลลงไปเท่ากับน้ำส่วนใสที่ดูดมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอผสมเบาๆให้เข้ากันนำไปแช่

ไว้ที่ตู้ –20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีนำไปปั่นที่ระดับความเร็วรอบเท่าเดิมเป็นเวลา 15 นาทีเทไอโซโพรพานอลทิ้งแล้วเติม 75% เอธานอลลงไป 5 มิลลิลิตรเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นและนำไปปั่นที่ระดับความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีแล้วเท 75% เอธานอลทิ้งปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 20-30 นาทีนำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mMTris –HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 4 มิลลิลิตรเมื่อดีเอ็นเอละลายหมดเติมเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต (3 M NaOAC) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และใส่เอทานอลเข้มข้น (absolute alcohol) ที่เย็นจัดลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะเห็นสายดีเอ็นเออยู่ในหลอดให้ดึงเอาสายดีเอ็นเอที่ได้ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใส่เอทานอล 75% ลงไป ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทเอทานอลทิ้งไป (ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 รอบ) ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำมาละลายใน TE buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ในตู้เย็น

<u>การวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ</u>

การวัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโตรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% ซึ่งใช้อะกาโรส 0.4 กรัมใน 1X TAE buffer (40 mMTris-acetate, 1 mM EDTA) ปริมาตร 40 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟจนกระทั่งผงอะกาโรสหลอมละลายจนหมดรอให้อะกาโรสอุ่นลงแล้วเทลงในถาดเจลที่มีหวีเสียบไว้แล้วปล่อยให้เย็นจนกระทั่งเจลแข็งตัวเมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงหวีออกย้ายเจลที่ได้ลงใน horizontal chamber โดยให้ด้านที่มีช่องหวีอยู่ด้านขั้วลบแล้วเท 1X TAE buffer ลงจนท่วมแผ่นเจลผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างกับโหลดดิ้งบัฟเฟอร์ (6X loading buffer: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วค่อยๆหยอดตัวอย่างลงในช่องหวีด้วยไมโครปิเปตต์ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 80-100 โวลต์และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโหลดดิ้งบัฟเฟอร์ (loading buffer) เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่เหมาะสมนำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นล้างแผ่นเจลโดยแช่ในถาดที่มีน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 3-5 นาทีนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 ngแล้วบันทึกภาพ

<u>การทดลองที่ 2</u> การตรวจสอบพันธุ์กล้วยน้ำว้าโดยเทคนิค AFLP

การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีต้องได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆเพื่อป้องกันการตัดดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์และการวิเคราะห์ผลที่ผิดพลาดโดยการทดลองนี้ได้นำตัวอย่างใบของกล้วยแต่ละชนิดมาล้างเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่บริเวณผิวใบแล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) โดยคัดเลือกใบพืช

ที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไปชั่งมาประมาณ 5 กรัมบดในโกร่งบดยาที่มีไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดแล้วย้ายลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม CTAB buffer (4% CTAB, 1% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mMTris–HCl pH 8.0) 20 มิลลิลิตรและเติม 2-β-mercapto-ethanol200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปเติมสารละลายที่มีส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24 ต่อ 1 โดยปริมาตร) ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตรเพื่อตกตะกอนและกำจัดโปรตีนเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันปั่นที่ระดับความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีดูดน้ำส่วนใสส่วนบนมาใส่ในหลอดใหม่ขนาด 50 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือทิ้งไปเติมไอโซโพรพานอลลงไปเท่ากับน้ำส่วนใสที่ดูดมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอผสมเบาๆ ให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ตู้ –20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีนำไปปั่นที่ระดับความเร็วรอบเท่าเดิมเป็นเวลา 15 นาทีเทไอโซโพรพานอลทิ้งระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหลุดออกมาแล้วเติม 75% เอธานอลลงไป 5 มิลลิลิตรเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นและนำไปปั่นที่ระดับความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีแล้วเท 75% เอธานอลทิ้งปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 20-30 นาทีนำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mMTris –HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 4 มิลลิลิตรเมื่อดีเอ็นเอละลายหมดเติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต (3 M NaOAC) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และใส่เอทานอลเข้มข้น (absolute alcohol) ที่เย็นจัดลงไป ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะเห็นสายดีเอ็นเออยู่ในหลอดให้ดึงเอาสายดีเอ็นเอที่ได้ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใส่เอทานอล 75% ลงไป ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทเอทานอลทิ้งไป (ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 รอบ) ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำมาละลายใน TE buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ในตู้เย็น

<u>การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ</u>

1. ตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ*Eco*RIและ*Mse*I เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณในการทำพีซีอาร์ได้ดีและมีขนาดเหมาะสมในการแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์เจล สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Eco*RIมีตำแหน่งจดจำ (recognition site) 6 คู่เบสและมีจุดตัด (↓) ดังนี้

5'-G ↓AATTC -3'

3'-CTTAA ↑G -5'

และ*Mse*Iมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสและมีจุดตัด (↓) ดังนี้

5'-T↓TAA -3'

3'-AAT↑ T -5'

โดยเติมดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 นาโนกรัมกรัมต่อไมโครลิตรปริมาตร 5 ไมโครลิตรสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่าปริมาตร 5 ไมโครลิตรและเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดคือ*Eco*RI/*Mse*Iปริมาตร 2 ไมโครลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

2. เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณโดย adapter ที่ต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับเกาะของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ซึ่ง adapter ที่ใช้คือ *Eco*RI adapter และ*Mse*I adapter มีลำดับเบสดังนี้

*Eco*RI adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

*Mse*Iadapter 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

3'-TACTCAGGACTCAT- 5'

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter นั้นทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดแล้วซึ่งมีปริมาตร 25 ไมโครลิตรมาเติมสารละลาย adapter ligation solution 24 ไมโครลิตรที่ผสมกับ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงในหลอดใหม่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาละลายใน TE buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

<u>การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์</u>

1. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (preamplification) เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และให้มีความจำเพาะในขั้นหนึ่งก่อนโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adapter แล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตรเติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ –20 องศาเซลเซียสเติมสารละลาย Pre-amplification primer mix ปริมาตร 40 ไมโครลิตรเติมสารละลาย 10X PCR buffer plus Mg ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติม

เอนไซม์*Taq*DNA polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอรุ่นBiometra T-gradient ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องจำนวน 20 รอบดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 60 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาทีแล้วแบ่งบางส่วนมาเจือจาง 50 เท่าด้วย TE buffer เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ –20 องศาเซลเซียส

2. เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 3 ตัวที่ปลาย 3'ของไพรเมอร์ (selective amplification) เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และให้มีความจำเพาะมากขึ้นโดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด (forward และ reverse primer) ชนิดละ 8 แบบ ซึ่งจะทำให้ได้คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนนี้เป็นจำนวน 64 คู่และองค์ประกอบของปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้มีดังนี้นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางในขั้นตอนpreamplificationแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตรเติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิดไพรเมอร์ E+3 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรและไพรเมอร์ M+3 ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10X PCR buffer plus Mg ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเอนไซม์*Taq*DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยใช้โปรแกรม touch down PCR ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาทีจำนวน 1 รอบ ลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียสจำนวน34รอบ และต่อด้วยการตั้งอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาทีจำนวน 23 รอบนำดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในพอลิอะคริลาไมด์เจล 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

<u>การวิเคราะห์ผลเอเอฟแอลพี</u>

วิเคราะห์ความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมโดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของกล้วยแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆให้สัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น “0” และคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี simple matching (Sneath and Sokal, 1973) นำมาเข้าสู่ตาราง matrix โดยใช้ Nei and Li (1979) similarity index เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มศึกษาความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคunweigthed pair group method of arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e (Rohlf,1993) และแสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree

<u>โครงการย่อยที่ 2</u> การศึกษาระดับการตอบสนองต่อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* เชื้อสาเหตุของโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าในสภาพปลอดเชื้อ

ในขั้นตอนแรกของการศึกษาระดับการตอบสนองต่อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* เชื้อสาเหตุของโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าในสภาพปลอดเชื้อ จำเป็นต้องดำเนินการรวบรวมพันธุ์กล้วยน้ำว้าในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

<u>การเตรียมชิ้นส่วนตั้งต้น</u>

กล้วยน้ำว้าพันธุ์ต่างๆ ได้รับอนุเคราะห์จากศ.(กิตติคุณ) เบญจมาศ ศิลาย้อย (ที่ปรึกษาโครงการ), ศูนย์ปฏิบัติการกลางและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, สถานีวิจัยปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ศูนย์ส่งเสริมพืชสวนพิษณุโลก และส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร, ศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัย กรมวิชาการเกษตร และซื้อจากสวนเกษตรกรซึ่งใช้ผลิตผลในโครงการย่อยที่ 2 และ 3 (ตารางที่ 1)

หน่อกล้วยที่ได้มานั้น ได้ถูกล้างทำความสะอาดเพื่อขจัดดินที่ติดมาด้วยออกให้หมด แล้วจึงนำไปตัดเอากาบใบและส่วนโคนออกจนเหลือขนาดกว้างประมาณ 5 เซนติเมตร สูงประมาณ 6 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำไปจุ่มในเอทธานอล เข้มข้น 70% นาน 1 นาที หรือฉีดพ่นหน่อด้วยเอทธานอลเข้มข้น 70% จนโชก

นำหน่อที่ได้ไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เข้มข้นประมาณ 0.5%นาน15 -20 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนที่จะตัดแต่งให้เหลือขนาดกว้างประมาณ 5 เซนติเมตร สูงประมาณ 6 เซนติเมตร แล้วผ่าตามยาวเป็น 4-6 ชิ้น โดยให้ส่วน arc กว้างประมาณ 1 เซนติเมตร

นำชิ้นพืชที่ได้ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (1962)(MS) ที่ดัดแปลงโดยเติม BA อัตรา 4 มิลลิกรัมต่อลิตร วางขวดเพาะเลี้ยงบนชั้นซึ่งไม่มีแสง ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส จนเกิดต้นอ่อนบริเวณซอกใบ

เมื่อมีการเกิดต้นอ่อนบริเวณซอกกาบใบของชิ้นพืช จึงย้ายไปวางบนชั้นที่มีแสงเข้ม 18 มิลลิโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส

Table 1-1 พันธุ์กล้วยที่นำมาใช้ในการทดลอง

พันธุ์กล้วย	ผู้เอื้อเฟื้อ/แหล่งที่มา
1. กล้วยหอมทองจากเพชรบุรี	ศูนย์ปฏิบัติการกลางและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
2.กล้วยไข่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 2	ศ.(กิตติคุณ) เบญจมาศ ศิลาย้อย
3. กล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่อง	ศ.(กิตติคุณ) เบญจมาศ ศิลาย้อย
4. กล้วยน้ำว้าพันธุ์กาบขาว	ศูนย์ส่งเสริมพืชสวนพิษณุโลก และส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร
5. กล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่อง – พิษณุโลก	ศูนย์ส่งเสริมพืชสวนพิษณุโลก กรมส่งเสริมการเกษตร
6. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ท่ายาง	ศูนย์ส่งเสริมพืชสวนพิษณุโลก กรมส่งเสริมการเกษตร
7. กล้วยน้ำว้าพันธุ์อุบล	ศูนย์ส่งเสริมพืชสวนพิษณุโลก กรมส่งเสริมการเกษตร
8. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ละอองน้ำ	สวนละอองน้ำ จังหวัดชลบุรี
9.กล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่อง	สวนเปรม 2 จังหวัดนครนายก
10. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ขาวนวล	สวนต้นสัก จังหวัดนครนายก
11. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ดำ	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
12. กล้วยน้ำว้าพันธุ์อ่างทอง	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
13. กล้วยน้ำว้าพันธุ์เงิน	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
14. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ปากช่อง 50	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
15. กล้วยน้ำว้าพันธุ์น้ำโว้	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
16. กล้วยน้ำว้าพันธุ์พัทลุง	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
17. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ทองมาเอง	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
18. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ค่อม	สถานีฝึกนิสิตปากช่อง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
19. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ตะนาวศรี	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัย กรมวิชาการเกษตร
20. กล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่อง	ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร
21. กล้วยน้ำว้าพันธุ์พระราชทาน	ส่วนพัฒนาการเพาะเลี้ยงและจัดการพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร
22. กล้วยน้ำว้าพันธุ์ชุมพร	

<u>การทดลองที่ 1</u> การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) เพื่อการสกัด Crude extract และเก็บ Spores

ต้นกล้วยน้ำว้าที่แสดงอาการ (Sign) และมีลักษณะ (Symptom) ที่คาดว่าจะเป็นโรคตายพราย เก็บตัวอย่างจาก บ้านสายเพชร หมู่ที่ 9 ต.ทองมงคล อ.บางสะพาน จ.ประจวบคีรีขันธ์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อสาเหตุด้วยวิธีการดังนี้

1. นำกล้วยที่คาดว่ามีอาการภายนอกของโรคตายพราย (รูปที่ 1) คือ ลักษณะอาการใบเหี่ยวสีเหลืองบริเวณใบมาผ่าบริเวณลำต้น (Pseudostem) เพื่อตรวจสอบลักษณะอาการภายในของโรค คือ ลำต้นมีสีน้ำตาล มีอาการเน่า และอาจพบเส้นใยของเชื้อราลักษณะโปร่งแสง หรือสีขาว
2. ทำการตัดกาบของลำต้นที่มีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณโคนของลำต้นและมีท่อลำเลียงสีม่วง ให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร
3. นำมาแช่ Clorox® 10% เป็นเวลา 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว
4. นำกาบกล้วยที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวแล้วเข้าภายในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
5. ทำการตัดกาบกล้วยให้มีขนาดเล็กประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่พื้นผิวอีกครั้งหนึ่ง เป็นเวลา 3 นาที
6. นำชิ้นกาบกล้วยขนาดเล็กไปแช่ Acetic acid เป็นเวลา 5 นาที เพื่อป้องกันแบคทีเรีย แล้วจึงนำชิ้นกาบกล้วยขนาดเล็กไปวางบนอาหาร PDA เพื่อสังเกตุการงอกของเส้นใย
7. เลือกจุดที่เส้นใยมีการงอกเบาบาง และห่างจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย มาเลี้ยงในอาหาร PDA ใหม่ และทำการเปลี่ยนอาหาร PDA จนได้เชื้อ *Foc* ที่ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น โดยตรวจสอบจากการส่องดูเส้นใย และสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เปรียบเทียบอาหารเหลวเพื่อผลิต Crude extraxt 2 สูตรเพื่อ คือ

- PDB (มันฝรั่ง 200 ก./ล. น้ำตาลทราย 20 ก./ล.)
- Fries medium (NK_4NO_3 1ก./ล. KH_2PO_4 1 ก./ล. $MgSo_4$ .7 H_2O 0.5ก./ล. NaCl 0.1 ก./ล. $CaCl_2$ 0.1 ก./ล. sucrose 30 ก./ล. yeast extract 0.5 ก./ล.)

โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Foc* ใส่อาหารทั้ง 2 สูตรลงในขวดรูปชมพู่ปริมาณ 200 ml ขวดละ 3 ชิ้น สูตรละ 5 ขวด นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปกรองเอาเส้นใยออก แล้วไปหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย

<u>การทดลองที่ 2</u> การศึกษาระยะเวลา และความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *Foc* ในการเข้าทำลายกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า

เลี้ยงเชื้อ *Foc* ในอาหารเหลว (Fries medium) นาน 4 สัปดาห์ แล้วนำมาปรับค่า OD ที่ 500 nm ให้ได้ 0.6 แล้วกรองแยกเส้นใยของเชื้อ เพื่อนำ Spore suspension ไปทำ Serial dilution โดยทำการเจือจาง Spore suspension ให้มีความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-6}

นำ Spore suspension ที่ความเข้มข้นดังกล่าวปริมาตร 20 µl ไปเลี้ยงบนอาหาร MS + 6 ppm BA เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบการงอกของเส้นใย แล้วนำกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้ามาจุ่มลงใน Spore suspension แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหาร MS + 6 ppm BA ทำการสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 21 วัน

<u>การทดลองที่ 3</u> การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อ *Foc* ในการเข้าทำลายกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า

กรองแยกเส้นใยของเชื้อ *Foc* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (Fries medium) แล้วนำ Spore suspension ไปทำ Serial dilution โดยทำการเจือจาง Spore suspension ให้มีความเข้มข้น 10^{-3}

นำกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้ามาจุ่มลงใน Spore suspension ความเข้มข้น 10^{-3} Spore แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหาร MS+6 ppm BA ทำการสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อภายนอกเป็นเวลา 10 วัน

ทำการผ่ากล้วยทุกวันเพื่อดูการเข้าทำลายของเชื้อ *Foc* และลักษณะอาการภายในของกล้วยทั้งสองพันธุ์เป็นเวลา 10 วัน

<u>การทดลองที่ 4</u> การศึกษาลักษณะความแตกต่างของเชื้อ *Foc* เมื่อเข้าทำลายกล้วยน้ำว้า 10 พันธุ์

กรองแยกเส้นใยของเชื้อ *Foc* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) แล้วนำ Spore suspension ไปทำ Serial dilution โดยทำการเจือจาง Spore suspension ให้มีความเข้มข้น 10^{-3} จากนั้นนำต้นอ่อนกล้วยน้ำว้าทั้ง 10 พันธุ์มาจุ่มลงใน Spore suspension ความเข้มข้น 10^{-3} แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหาร MS + 6 ppm BA ทำการสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อภายนอกเป็นเวลา 7 วัน

ทำการผ่ากล้วยเพื่อดูการเข้าทำลายของเชื้อ *Foc* และลักษณะอาการภายในของกล้วยเป็นเวลา 7 วัน

<u>การทดลองที่ **5**</u> การศึกษาผลของสารสกัดหยาบ(crude extract)จากเชื้อ*Foc* ต่อการเกิดโรคในกล้วยน้ำว้า

เตรียมอาหาร MS โดยเติมสารละลายของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200 และ 400 ppm ลงในอาหาร MS หลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นย้ายต้นกล้วยน้ำว้าลงในอาหารทั้งสี่สูตรๆละ 7 ขวด โดยกล้วยน้ำว้า 5 พันธุ์ พันธุ์ละ 2 ต้นต่อขวด ได้แก่

พันธุ์ ละอองน้ำ มะลิอ่อง พระราชทาน กาบขาว และน้ำไท และ 2 พันธุ์ที่ใช้พันธุ์ละ 1 ต้นต่อขวด ได้แก่ พันธุ์พระประแดงและชุมพร

สังเกตการเจริญเติบโตและอาการต่างๆ ที่เกิดขึ้นบนต้น และภายในต้นกล้วยที่ระยะเวลา 30 วัน หลังการย้ายลงอาหาร โดยสุ่มมาเพียง 5 ขวด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การตรวจยืนยันเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้าแต่ละพันธุ์

การทดลองที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของกล้วย

การสกัดดีเอ็นเอของกล้วย จากส่วนต่างๆ คือใบ เปลือกผล ก้านผล หวี และเครือกล้วยเพื่อตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ ก่อนที่จะใช้ในการตรวจสอบพันธุ์กล้วยน้ำว้าต่อไป ผลการทดลองพบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมีปริมาณมากและคุณภาพดีที่สุดขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดจากเปลือกผล ก้านผล หวี มีปริมาณและคุณภาพรองลงมา แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเปลือกผล ก้านผล และหวี ไม่ต่างกัน แต่น้อยกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบ ขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเครือมีปริมาณ และคุณภาพที่น้อยที่สุด (Figure 1-1)

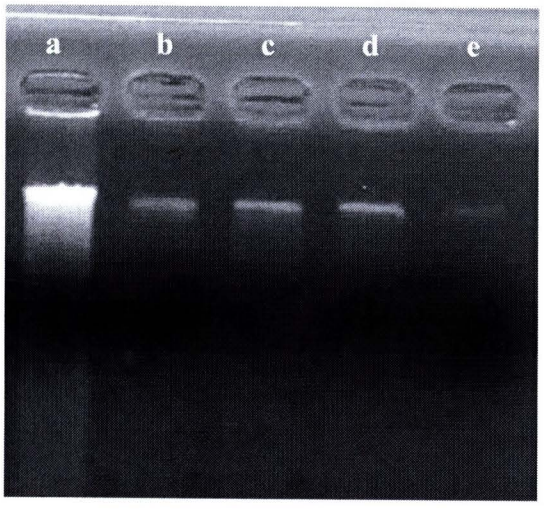


Figure 1-1 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก a) ใบ b) เปลือกผล c) ก้านผล d) หวี และe) เครือ

ในการสกัดดีเอ็นเอหากใช้ในส่วนของใบ จะมีปริมาณที่เพียงพอ แต่คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้พบว่ายังมี phenolic compound อยู่ในปริมาณที่มาก ในส่วนของเปลือกผล ก้านผล และหวี ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่านี้ อาจต้องสกัดเพิ่มแล้วตกตะกอนดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณที่ต้องการ ขณะที่ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากเครือ มีปริมาณที่น้อยมาก

เมื่อนำชิ้นส่วนของเครือมาทำการสกัดใหม่ โดยนำชิ้นส่วนมาจากบริเวณด้านนอกสุดของเครือ ตรงกลางเครือ และด้านในสุดของเครือ มาทำการสกัดดีเอ็นเออีกครั้งเพื่อเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยใช้สารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอที่มี CTABความเข้มข้น แตกต่างกัน คือ 2% และ 4% ผลการทดลองพบว่า ในส่วนของเครือกล้วยสามารถสกัดดีเอ็นเอได้มากที่สุดบริเวณที่อยู่ตรงกลางของเครือ ขณะที่บริเวณขอบด้านในและด้านนอกของเครือให้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่า

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 28 ก.ค. 2555
246406
เลขทะเบียน.....
เลขเรียกหนังสือ.....

(Figure 1-2) และพบว่าการใช้ความเข้มข้นของ CTAB 2% และ 4 % ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้ CTAB 2%ในการสกัดดีเอ็นเอจากเครือกล้วย น่าจะเพียงพอ เพราะสามารถประหยัดสารเคมี และค่าใช้จ่ายได้เนื่องจากสารเคมีที่ใช้มีราคาที่แพง

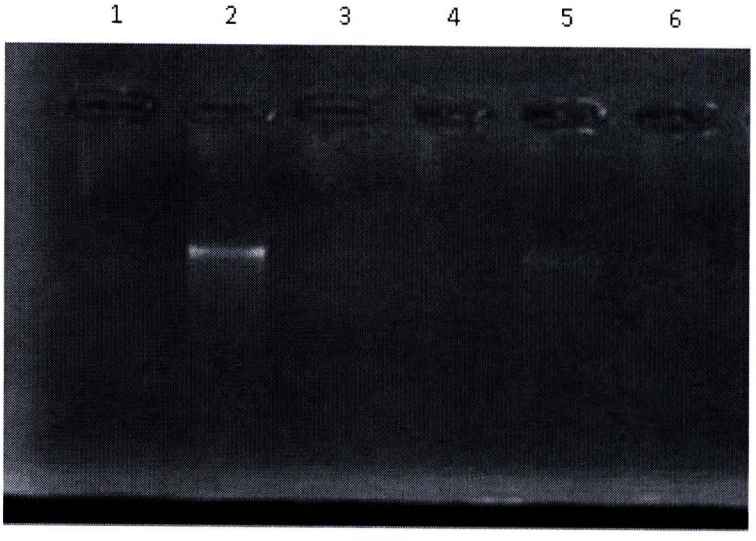


Figure 1-2 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนของเครือ1)บริเวณด้านนอกสุดของเครือ CTAB 2%, 2)บริเวณตรงกลางเครือ CTAB 2%, 3)บริเวณด้านในสุดของเครือ CTAB 2%,4)บริเวณด้านนอกสุดของเครือ CTAB 4 %,5)บริเวณตรงกลางเครือCTAB 4%และ 6)บริเวณด้านในสุด ของเครือ CTAB 4 %

ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยโดยใช้ชิ้นส่วนต่างๆ พบว่า การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยจะให้ปริมาณมากที่สุด หากไม่สามารถนำใบกล้วยมาสกัดดีเอ็นเอได้ ชิ้นส่วนที่สามารถนำมาใช้ทดแทนได้ได้แก่เปลือกผล ก้านผล และหวี ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่าที่สกัดได้จากใบ และชิ้นส่วนสุดท้ายคือส่วนของเครือพบว่าสามารถนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอได้เช่นกัน แต่จะต้องใช้บริเวณตรงกลางของเครือ และใช้ความเข้มข้นของ CTAB 2%

<u>การทดลองที่ 2</u> การจำแนกพันธุ์กล้วยน้ำว้าโดยเทคนิค AFLP

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยทั้ง 12 พันธุ์พบว่าสามารถสกัดได้โดยใช้สารละลาย CTAB 4% ดังแสดงในFigure 1-3 ซึ่งตัวอย่างที่ 7 คือกล้วยน้ำว้าตะนาวศรี มีปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยจึงใช้ตัวอย่างที่ 8 กล้วยน้ำว้าตะนาวศรี ต้นเดิมแต่เป็นการสกัดใหม่อีกครั้ง

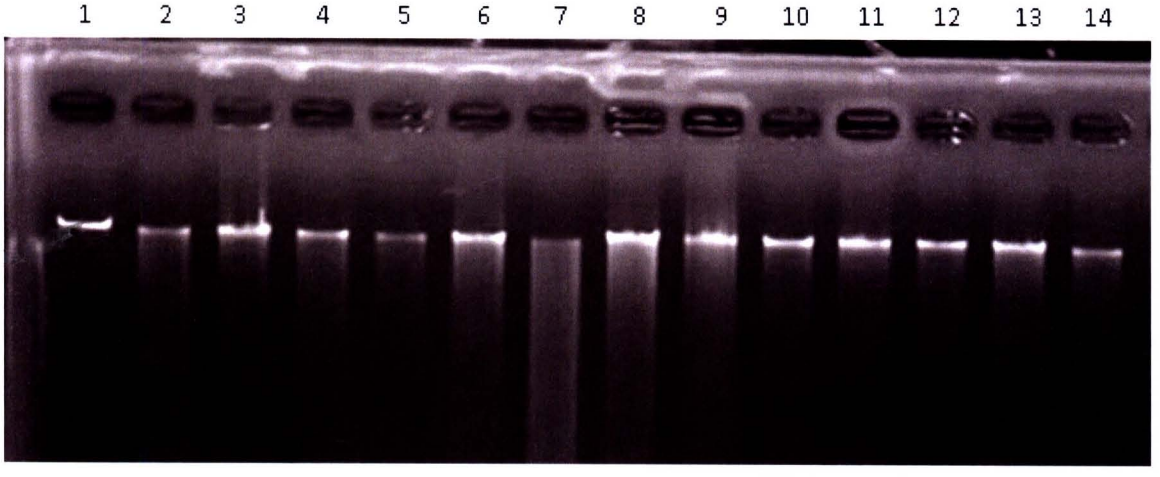


Figure 1-3 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบกล้วย 12 พันธุ์ 1) λ DNA , 2)น้ำว้าดำ, 3) น้ำว้ามะลิอ่อง, 4) น้ำว้าปากช่อง 50, 5) น้ำว้าเงิน, 6) น้ำโว้, 7) น้ำว้าตะนาวศรี,8)น้ำว้าตะนาวศรี,9)น้ำว้าค่อม, 10) น้ำว้าทองมาเอง, 11) น้ำว้าอ่างทอง, 12) น้ำว้าพัทลุง,13) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 14)แพทแทน

หลังจากที่ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอกล้วยทั้ง 12 พันธุ์มาแล้วได้ดำเนินการตัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีการข้างต้นโดยใช้ primer จำนวน 8 คู่ ได้แก่ primer E-AAC, M-CAT, primer E-AAC, M-CTA, primer E-AAG, M-CAG, primer E-AAG, M-CTT, primer E-ACC, M-CTG, primer E-ACC, M-CTT, primer E-AGG, M-CAA, และ Primer E-AGG, M-CAG (Figure 1-4) พบว่าสามารถแยกพันธุ์กล้วยน้ำว้าทั้ง 12 พันธุ์ออกจากกันได้และแต่ละ primer pair สามารถให้เอกลักษณ์ของกล้วยน้ำว้าแต่ละพันธุ์ได้โดยดูจากลูกศรที่อยู่ในภาพที่ 4-11ตัวอย่างเช่น primer pair E-ACC, M-CAT ที่ลำดับเบสขนาด 300 bpพบ single band ในกล้วยน้ำว้าพันธุ์ตะนาวศรี (Figure 1-4) หรือ ใน Figure 1-5 primer E-AAC, M-CTA ที่ลำดับเบสขนาด 200 bp พบ single band ในกล้วยน้ำว้าพันธุ์อ่างทอง หรือใน primer pair EAAG, M-CAG ที่ลำดับเบสขนาด 3,000 bpพบ single band ในกล้วยแพทแทน (Figure 1-6) ใน primer pair E-AAG, M-CAG ที่ลำดับเบสขนาด 200 bpพบ single band ในกล้วยน้ำว้าพันธุ์ปากช่อง50 (Figure 1-7) ขณะที่ primer pair E-ACC, M-CTG ที่ลำดับเบสขนาด 1,500 bpพบ single band ในกล้วยน้ำว้าพันธุ์ค่อม (Figure 1-8) ในprimer pair E-ACC, M-CTT ที่ลำดับเบสขนาด 200 bpพบ single band ในกล้วยน้ำว้าพันธุ์เงิน (Figure 1-9) Primer E-AGG, M-CAG ที่ลำดับเบสขนาด 1,200 bpพบ single band ในกล้วยน้ำโว้เป็นต้น อย่างไรก็ตามในแต่ละ primer pair สามารถใช้เป็นพิมพ์เขียวของพันธุ์กล้วยทั้ง 12 พันธุ์ได้ หากมีตัวอย่างที่ไม่ทราบและต้องการที่จะรู้ว่าเป็นพันธุ์ ก็สามารถตรวจสอบโดยใช้ primer pair ทั้ง 8 คู่แล้วเปรียบเทียบรูปแบบของ band ที่ปรากฏว่าเหมือนกับกล้วยน้ำว้าพันธุ์ใด

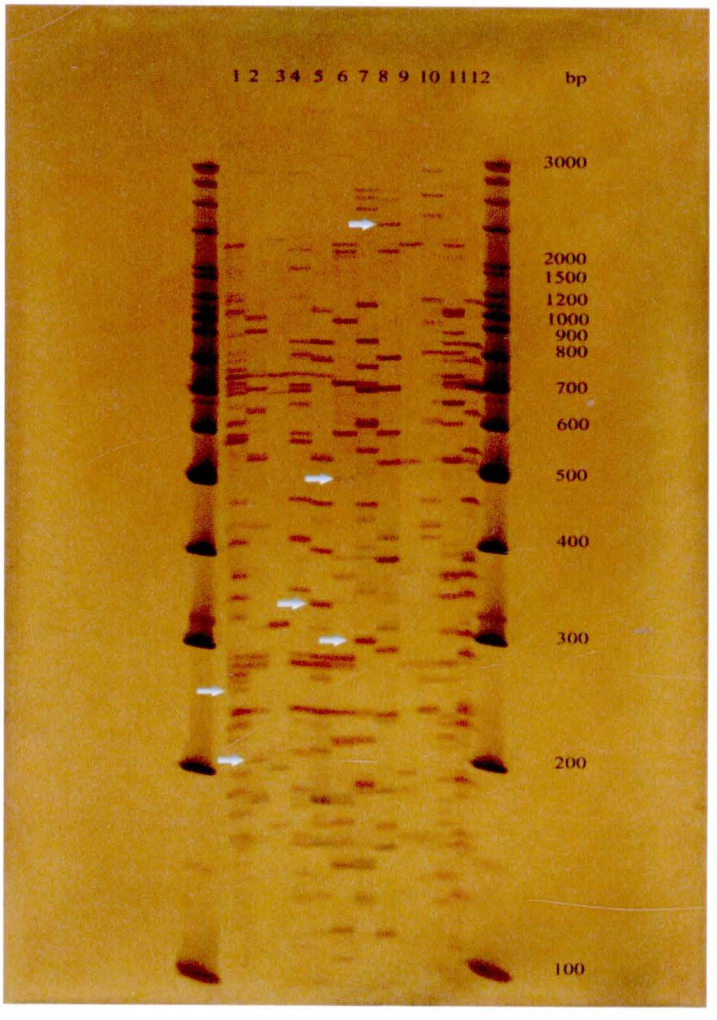


Figure 1-4 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-AAC, M-CAT, 1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

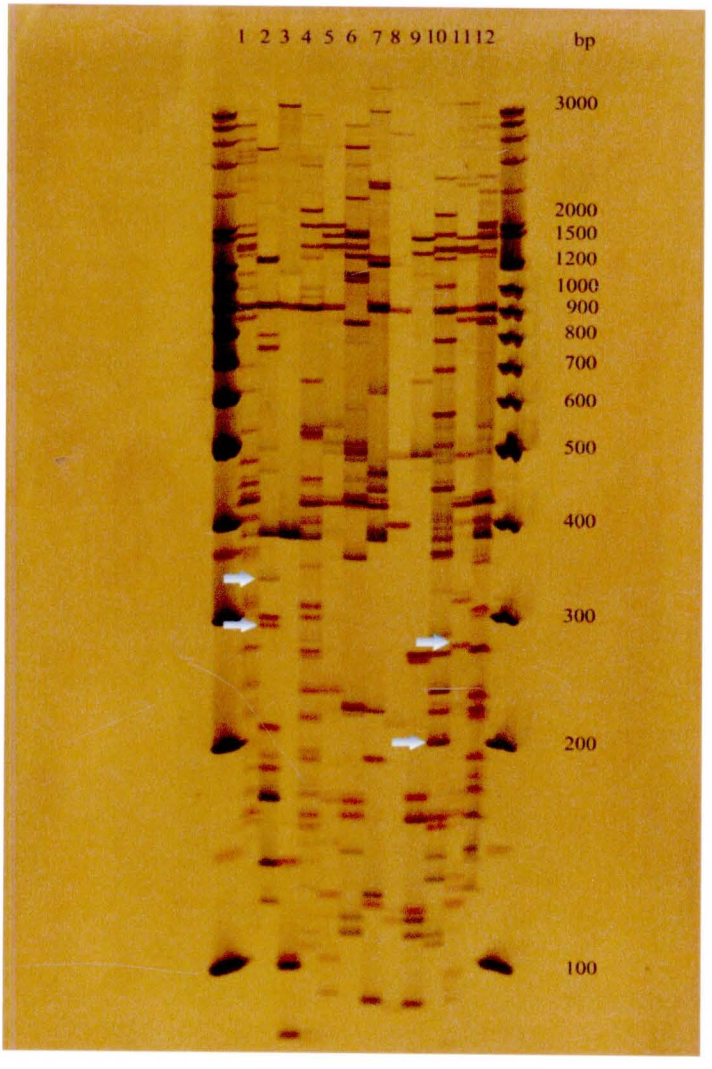


Figure 1-5 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-AAC, M-CTA, 1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

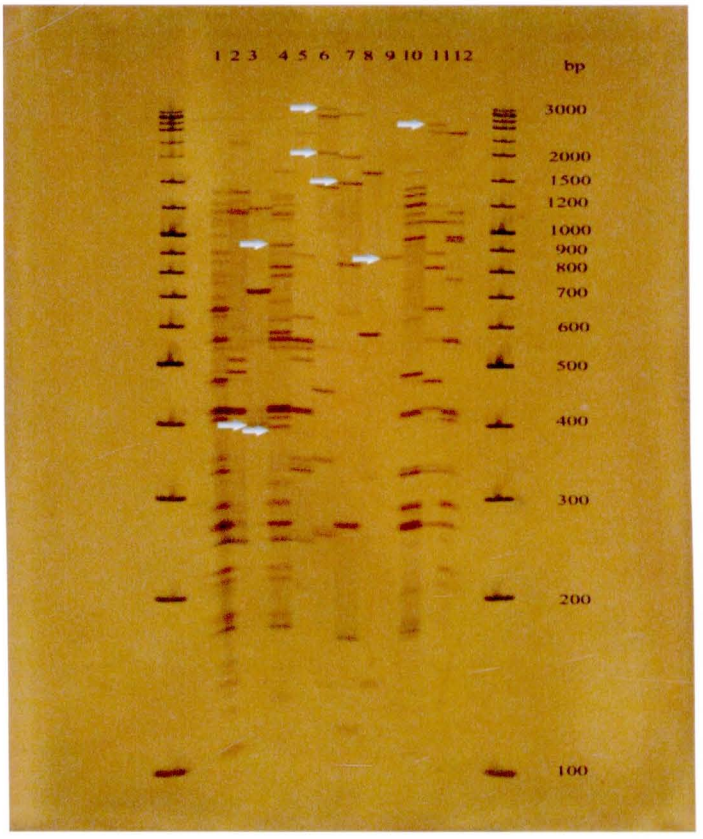


Figure 1-6 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-AAG, M-CAG, 1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

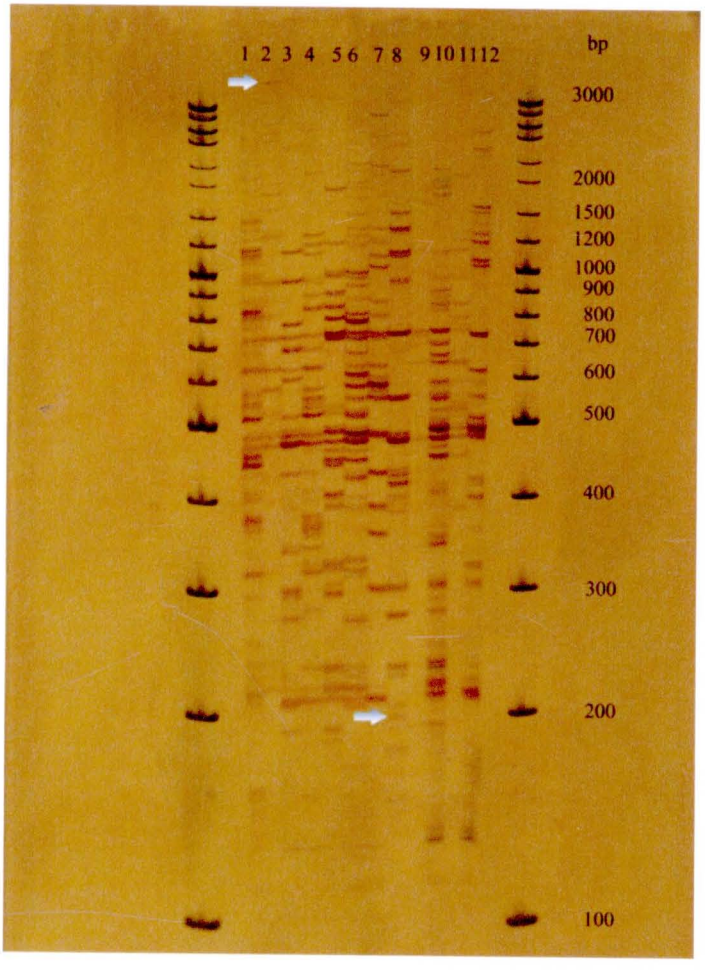


Figure 1-7 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-AAG, M-CTT, 1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

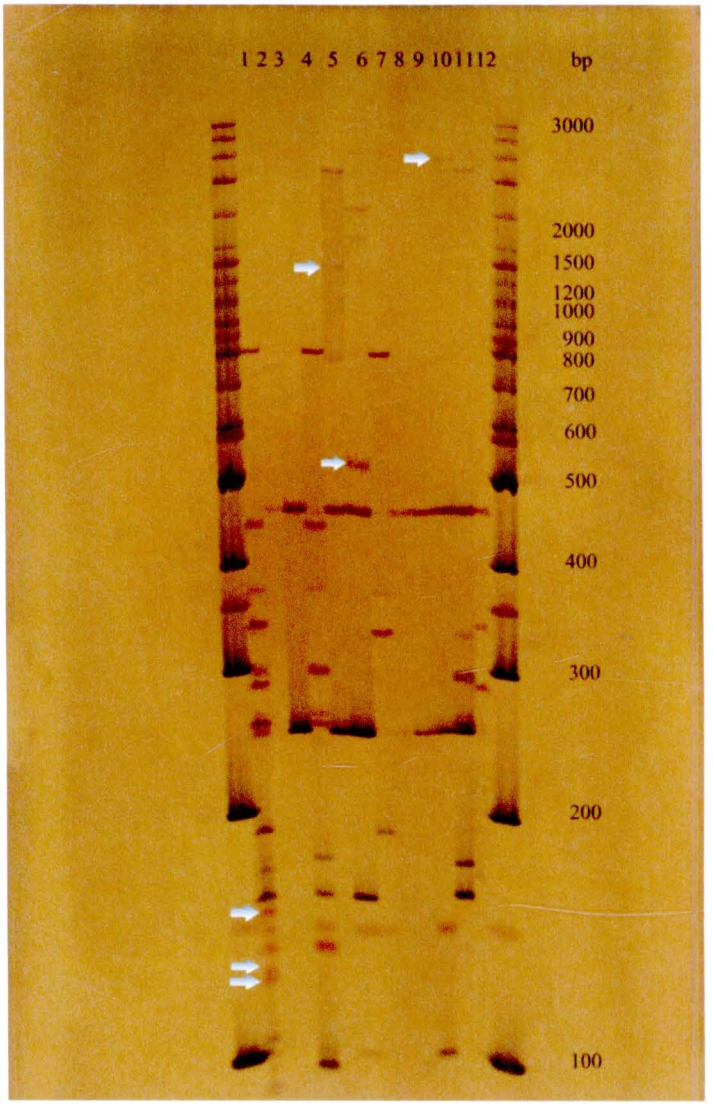


Figure 1-8 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-ACC, M-CTG,1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

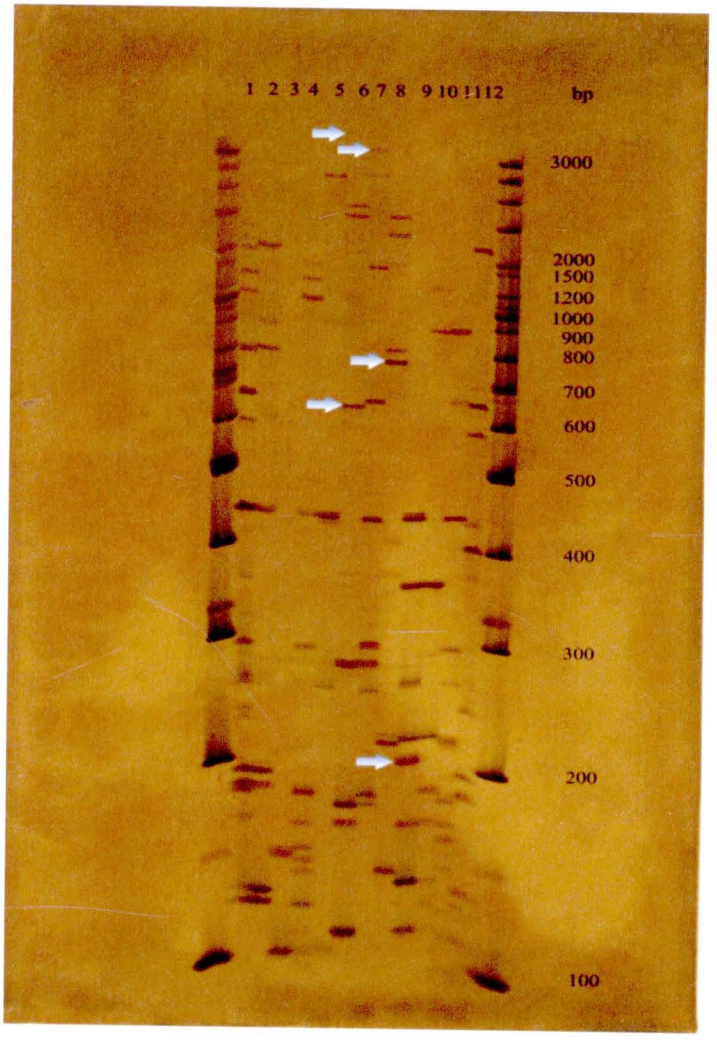


Figure 1-9 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-ACC, M-CTT, 1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

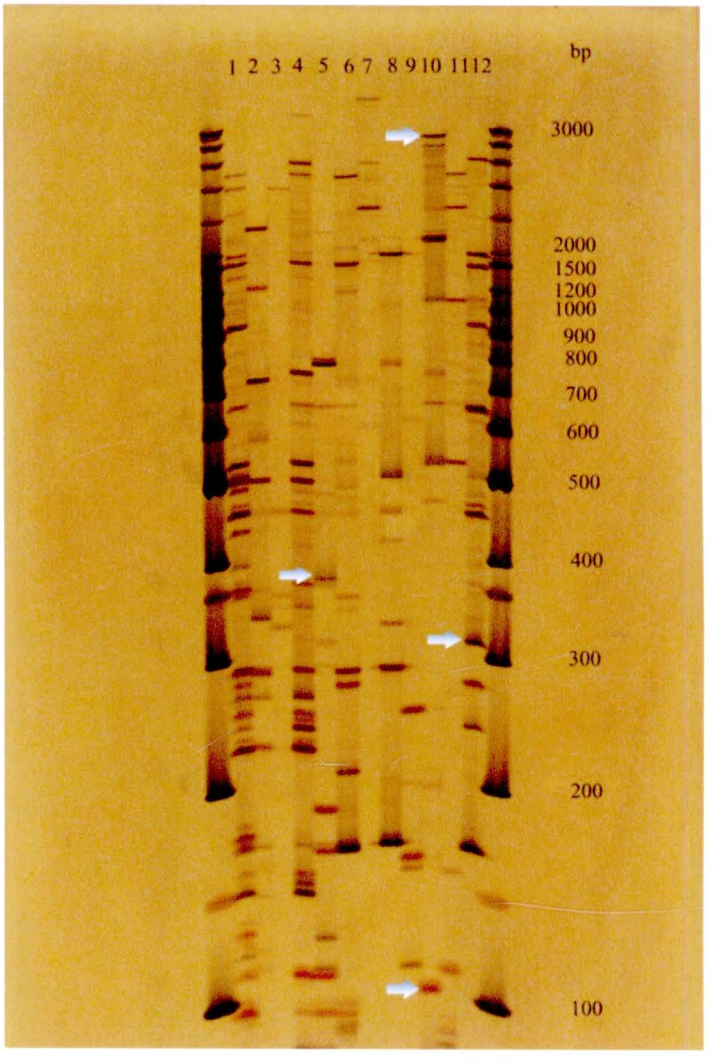


Figure 1-10 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-AGG, M-CAA, 1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

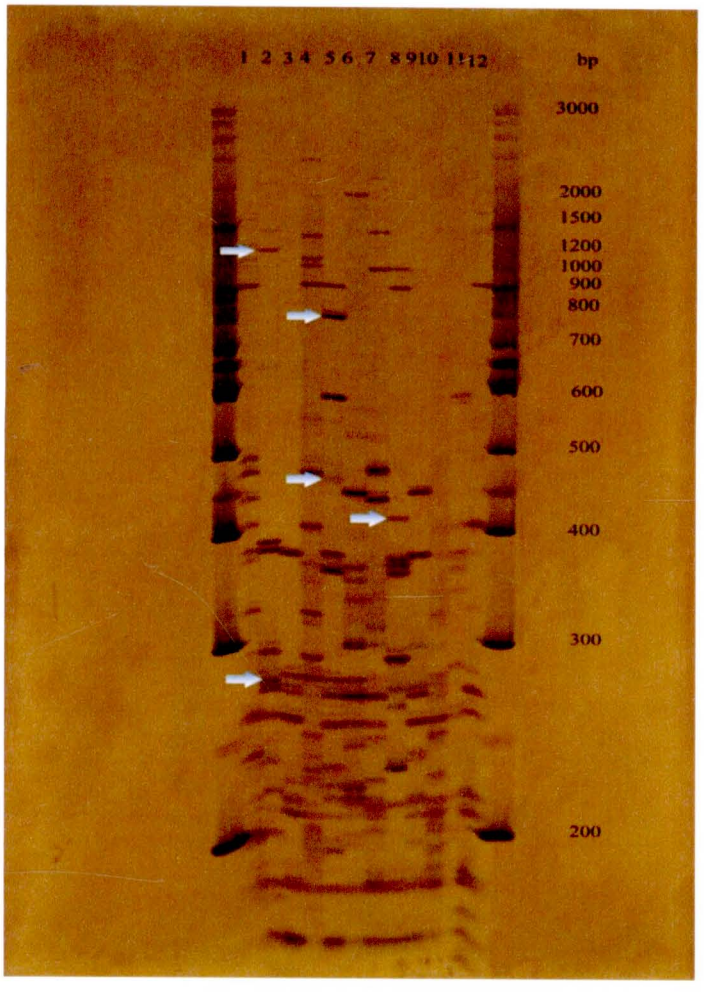


Figure 1-11 ลายพิมพ์ AFLP จาก Primer E-AGG, M-CAG,1) น้ำว้ามะลิอ่อง, 2) น้ำโว้,3) น้ำว้าทองมาเอง, 4) น้ำว้าพัทลุง, 5) น้ำว้าค่อม, 6) แพทแทน, 7) น้ำว้าตะนาวศรี, 8) น้ำว้าปากช่อง 50, 9) น้ำว้าเงิน, 10) น้ำว้าอ่างทอง, 11) น้ำว้าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, และ 12) น้ำว้าดำ

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้าทั้ง 12 พันธุ์พบว่า ที่ค่า coefficient 0.67 สามารถแบ่งกลุ่มกล้วยน้ำว้าออกได้เป็น 7 กลุ่มด้วยกัน กลุ่มแรกได้แก่ กล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่อง และ กล้วยน้ำว้าพันธุ์พัทลุง กลุ่มที่สองได้แก่กล้วยน้ำว้าพันธุ์น้ำโว้ กล้วยน้ำว้าทองมาเอง และกล้วยน้ำว้าพันธุ์เงิน กลุ่มที่สามได้แก่ กล้วยน้ำว้าพันธุ์ค่อมและกล้วยน้ำว้ากล้วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กลุ่มที่สี่ได้แก่กล้วยน้ำว้ากล้วยตะนาวศรี กลุ่มที่ห้าได้แก่กล้วยน้ำว้ากล้วยอ่างทอง กลุ่มที่หกได้แก่แพทแทน และกลุ่มที่เจ็ดได้แก่กล้วยน้ำว้ากล้วยดำ (Figure 1-12) และพบว่ากล้วยน้ำว้ากล้วยทองมาเองมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกล้วยน้ำว้ากล้วยเงินมาก แต่ยังคงเป็นคนละพันธุ์อยู่

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำข้อมูลลายพิมพ์ AFLP ไปพัฒนาชุดตรวจยืนยันพันธุ์กล้วยน้ำว้าซึ่งใช้ได้ง่ายและสะดวกในภาคสนาม เช่น Bio-sensor ต่อไป

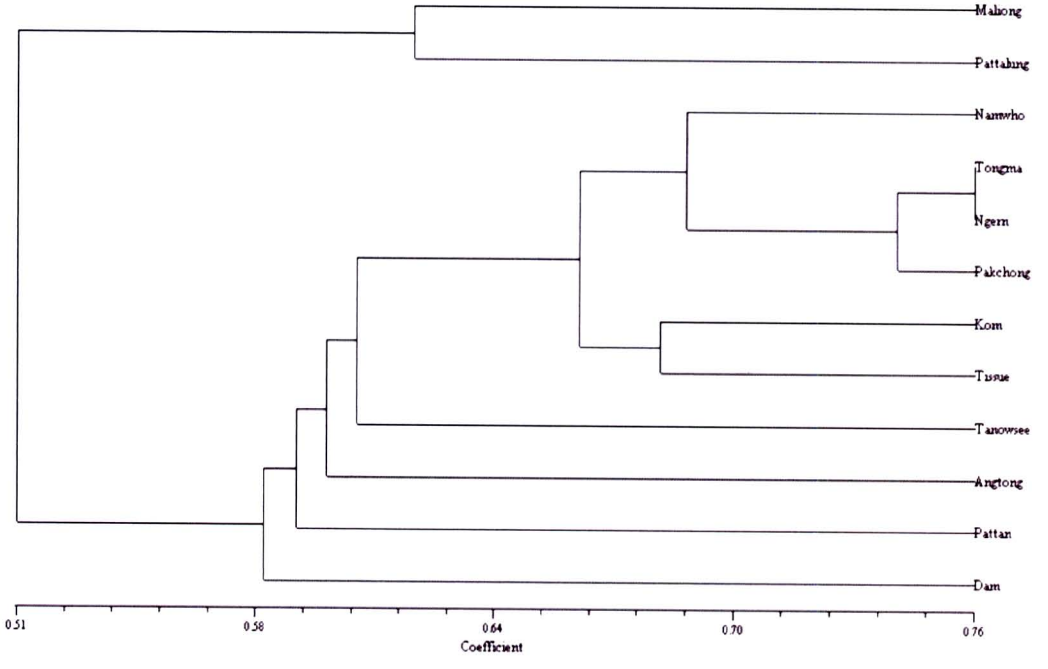


Figure 1-12 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย 12 พันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี จากการใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ ในลักษณะ phylogenetic tree วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e (Rohlf, 1993)

2. การศึกษาระดับการตอบสนองต่อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* เชื้อสาเหตุของโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยพันธุ์ต่างๆ เพื่อใช้ในการศึกษาระดับการตอบสนองต่อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* เชื้อสาเหตุของโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าในสภาพปลอดเชื้อ ทำให้ได้ต้นอ่อนกล้วยจำนวน 10 พันธุ์ ซึ่งนำไปใช้ในการทดลองที่ 2 และ 3

Figure 1-13 ต้นอ่อนกล้วยน้ำว้าที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของต้น (พันธุ์ท่ายางและน้ำโว้ ; จากซ้าย)

Figure 1-14 ต้นอ่อนกล้วยน้ำว้าที่ขยายโคลนเพิ่มจำนวนในสภาพปลอดเชื้อ ใกล้จะใช้ศึกษาผลการตอบสนองต่อกรด Fusaric ได้ (พันธุ์ขาวนวล มะลิอ่องและทองมาเอง; จากซ้าย)

<u>การทดลองที่ 1</u> การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) เพื่อการสกัด Crude extract และเก็บ Spores

การทดสอบความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) นาน 3 สัปดาห์ พบว่า เส้นใยในอาหารสูตร Fries medium มีน้ำหนักสดสูงกว่าในอาหารสูตร PDB (Table 1-2)

Table 1-2 น้ำหนักแห้งของเส้นใย *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว 2 สูตร นาน 3 สัปดาห์

PDB	Fries medium
1. 0.2865	1. 0.4392
2. 0.2916	2. 0.6031
3. 0.334	3. 0.5410
4. 0.3089	4. 0.5952
5. 0.3142	5. 0.5688

<u>การทดลองที่ 2</u> การศึกษาระยะเวลา และความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *Foc* ในการเข้าทำลายกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า

ผลการแยกเชื้อ พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 วัน จะพบว่าเส้นใยของเชื้องอกมากขึ้น แม้ว่าจะมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย จึงได้นำเส้นใยบริเวณที่คาดว่าจะเป็นเชื้อราที่สนใจมาทำการตรวจสอบลักษณะเส้นใย และสปอร์ แล้วจึงเปลี่ยนอาหาร ปรากฏว่าหลังจากทำการเปลี่ยนอาหาร 3 ครั้ง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย จึงได้นำเชื้อราดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) เป็นเวลาอย่างต่ำ 3 สัปดาห์เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป (Table 1-3)

Table 1-3 ระยะเวลาที่สามารถสังเกตุพบเส้นใยของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* หลังการปลูกเชื้อ

วันที่	ลักษณะอาการที่พบ
1	ไม่พบการงอกของเส้นใย
2	พบเส้นใยสีขาวบางๆ งอกปกคลุมชิ้นกาบกล้วย
3	พบเส้นใยสีขาวมากขึ้น โดยบางจุดพบการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย มีลักษณะเยิ้มสีน้ำตาลเข้ม
4	บริเวณต้นกำเนิดการงอกของเส้นใยสีขาว เริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วงจางๆ และแบคทีเรียเจริญเติบโตมากขึ้น

Figure 1-15 ลำต้นตัดขวางของกล้วยน้ำว้า แสดงอาการภายในของโรคตายพราย

เมื่อศึกษาระยะเวลาการงอกของเส้นใยบนอาหาร MS พบการงอกเส้นใย *Foc* บนชุด Negative Control หรืออาหาร MS+6 ppm BA 2 วันหลังจากหยด Spore suspension 20 µl ทุกความเข้มข้นของสารแขวนลอย ยกเว้น 10^{-6} ซึ่งการงอกของเส้นใยที่ความเข้มข้น 10^{-6} เกิดขึ้นในวันที่ 3

การศึกษาระยะเวลาการงอก และการเข้าทำลายของเชื้อ *Foc* ในต้นกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า พบการงอกของเส้นใยครั้งแรกที่ความเข้มข้นของ Spore suspension 10^{-3} ในกล้วยหอมจำนวน 3 ขวด เมื่อระยะเวลาผ่านไป 7 วัน เมื่อครบ 10 วัน พบการงอกของเส้นใยบนอาหาร MS ของกล้วยทั้งสองพันธุ์ที่ความเข้มข้น 10^{-3} ทุกขวด การงอกของเส้นใยที่ความเข้มข้น 10^{-6} นั้นเริ่มเห็นครั้งแรกที่ระยะเวลา 14 วัน โดยพบเส้นใยบนกล้วยหอม 3 ขวด และกล้วยน้ำว้า 2 ขวด

เมื่อครบ 21 วันจึงนำกล้วยที่ถูกปลูกเชื้อมาผ่าลำต้นเพื่อนดูการเข้าทำลายของเชื้อ *Foc* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ได้ผลตามที่ปรากฏใน Table 1-4

จากการทดลองพบว่า Spore suspension ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อ *Foc* ในกล้วยทั้งสองพันธุ์คือ 10^{-3} เนื่องจากสามารถแสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคตายพรายในระยะเวลา 21 วันได้มากกว่าความเข้มข้น 10^{-6} โดยเทียบกับ Negative control ที่ความเข้มข้นเท่ากันนั้น พบว่ามีการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา โดยในการทดลองต่อๆ ไปนั้น อาจจะทำการลดระยะเวลาของการสังเกตอาการภายนอกลงเหลือ 7-10 วัน โดยจะสังเกตจากการที่เริ่มมีเส้นใยของเชื้อราปกคลุมอาหารแล้วจะเริ่มทำการผ่าลำต้นเพื่อดูการเข้าทำลายของเส้นใยก่อนที่เนื้อเยื่อภายในลำต้นจะถูกทำลายกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม

Table 1-4 การเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ต่อกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า

Spore suspension	ระยะเวลาที่ปลูกเชื้อ	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า
10^{-3}	14	ใบเริ่มมีสีเหลือง เชื้อเจริญฟู เส้นใยสีขาวปกคลุมผิวอาหาร และเจริญบนลำต้น ทั้ง 6 ขวด	ใบเริ่มมีสีเหลือง เชื้อเจริญฟู เส้นใยสีขาวปกคลุมผิวอาหาร และเจริญบนลำต้น ทั้ง 6 ขวด
	21	กล้วย 5 ขวดมีสภาพลำต้นสีน้ำตาลเข้ม ใบเริ่มกลายเป็นสีน้ำตาล 1 ขวดมีลำต้นเป็นสีน้ำตาล ใบเป็นสีเหลือง	กล้วย 2 ขวดมีสภาพลำต้นสีน้ำตาลเข้ม ใบเริ่มกลายเป็นสีน้ำตาล 4 ขวดลำต้นสีน้ำตาล ใบสีเหลือง
10^{-6}	14	เชื้อเริ่มเจริญงอกเส้นใยบนผิวอาหาร สภาพต้นกล้วยปกติ ใบยังไม่แสดงอาการเหลือง พบจำนวน 3 ขวด	เชื้อเริ่มเจริญงอกเส้นใยบนผิวอาหาร สภาพต้นกล้วยปกติ ใบยังไม่แสดงอาการเหลือง พบจำนวน 2 ขวด
	21	กล้วย 3 ขวดไม่พบเส้นใยเจริญเติบโต 1 ขวดสภาพลำต้นสีน้ำตาลเข้ม ใบสีน้ำตาล 2 ขวดลำต้นเป็นสีน้ำตาล ใบเป็นสีเหลือง	กล้วย 4 ขวดไม่พบเส้นใยเจริญเติบโต 2 ขวดลำต้นเป็นสีน้ำตาล ใบเป็นสีเหลือง

<u>การทดลองที่ 3</u> การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ในการเข้าทำลายกล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า

หลังจากทำการปลูกเชื้อพบว่า (Table 1-5) วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 นั้น ไม่พบเส้นใยที่ในขวดทดลอง เนื้อเยื่อภายในลำต้นมีสีขาวปกติ เส้นใยเริ่มงอกเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน แต่อาจจะยังไม่เข้าทำลายภายในลำต้น เนื่องจากเนื้อเยื่อยังมีลักษณะปกติอยู่ เนื้อเยื่อของลำต้นกล้วยเริ่มเปลี่ยนสีเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน โดยสีจะเข้มขึ้น จนเกิดอาการเละเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ส่วนเส้นใยภายนอกจะเจริญเติบโตปกคลุมลำต้นกล้วยไปเรื่อยๆ

Table 1-5 ลักษณะอาการภายนอกของกล้วยน้ำว้าที่ปลูกด้วยเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ที่ Spore suspension ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน

วันที่	อาการภายนอก	อาการภายใน
1	ไม่พบเส้นใย	เนื้อเยื่อลักษณะปกติ
2	ไม่พบเส้นใย	เนื้อเยื่อลักษณะปกติ
3	ไม่พบเส้นใย	เนื้อเยื่อลักษณะปกติ
4	พบเส้นใยบางๆ รอบบริเวณโคนต้น	เนื้อเยื่อลักษณะปกติ
5	กลุ่มของเส้นใยมากขึ้นจนเห็นได้ชัด	เนื้อเยื่อบริเวณที่คาดว่าจะเป็นท่อลำเลียงเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองเข้ม
6	เส้นใยเริ่มปกคลุมอาหาร ในกรณีของต้นที่ไม่แข็งแรงจะไม่สามารถเจริญเติบโต และมีสีเข้ม และบางต้นตาย	เนื้อเยื่อบริเวณที่คาดว่าจะเป็นท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
7	เส้นใยปกคลุมลำต้นซึ่งเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ใบของกล้วยบางใบเริ่มมีสีเหลือง	เนื้อเยื่อบริเวณที่คาดว่าจะเป็นท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
8	เส้นใยปกคลุมลำต้นซึ่งมีสำน้ำตาล	เนื้อเยื่อบริเวณที่คาดว่าจะเป็นท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
9	เส้นใยปกคลุมลำต้นซึ่งมีสำน้ำตาล ต้นกล้วยบางต้นเริ่มมีสำน้ำตาลเข้ม	เนื้อเยื่อบริเวณที่คาดว่าจะเป็นท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และเนื้อเยื่อเริ่มเละ
10	ต้นกล้วยมีสีน้ำตาลเข้ม บางต้นสีเริ่มคล้ำ	เนื้อเยื่อบริเวณที่คาดว่าจะเป็นท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และเนื้อเยื่อเริ่มเละ

ในขณะที่ทำการผ่าลำต้นเพื่อดูลักษณะของสีบริเวณไส้ของลำต้นที่เปลี่ยนไปพบว่า มีกลุ่มท่อวงกลมขนาดเล็กๆ เรียงตัวตามแนวกาบกล้วย รอบลำต้น คาดว่าจะเป็นบริเวณของท่อลำเลียง และยังพบลำต้นมีกาบเป็นชั้นประมาณ 4 ชั้น จึงได้ทำการให้คะแนนเพื่อดูความแตกต่างระหว่างชั้น (**Table 1-6**)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Table 1-6 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าที่ปลูกด้วยเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ความเข้มข้น 10^{-3} Spore เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level			
	1	2	3	4
1	83.34%	75.00%	8.34%	100.00%
2	100.00%	83.34%	8.34%	100.00%
3	100.00%	83.34%	25.00%	100.00%
4	Dead	Dead	Dead	Dead
5	100.00%	75.00%	8.34%	100.00%
6	91.67%	83.34%	16.67%	100.00%
7	100.00%	66.67%	8.34%	100.00%
8	83.34%	83.34%	16.67%	100.00%
9	100.00%	91.67%	8.34%	100.00%
10	100.00%	91.67%	25.00%	100.00%
11	100.00%	91.67%	25.00%	100.00%

ระดับคะแนน 1 ชั้นด้านในสุด หรือแกน โดยสังเกตจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก แบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

2 ชั้นถัดออกมา เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก แบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3 ชั้นนอกที่สุด เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก แบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย แต่พบการเข้าทำลายน้อยกว่าชั้นที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน

4 พื้นผิวภายนอกกล้วย แทนด้วย 100.00% เพราะพบเส้นใยปกคลุมโดยรอบ

ในขณะที่กล้วยหอมนั้นไม่พบการเข้าทำลายบริเวณที่คาดว่าจะเป็นท่อลำเลียง แต่ต้นกล้วยหอมเกิดการตายทั้งหมด โดยคาดว่าอาจเกิดจากการแข่งขันกันระหว่างเชื้อและต้นกล้วย (Competition) โดยเชื้อได้แย่งอาหารจากต้นกล้วย ทำให้ต้นกล้วยไม่มีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญเติบโต และต่อสู้กับเชื้อ ต้นกล้วยจึงตาย การทดลองนี้ได้ทำการปลูกเชื้อที่ความเข้มข้น และเวลาเท่ากับกล้วยน้ำว้า โดยหนึ่งหน่วยทดลองได้ปลูกกล้วยทั้งสองพันธุ์ไว้ในขวดเดียวกันสองขวด

จากการทดลองพบว่าการใช้ Spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^{-3} Spore เป็นเวลา 7 วัน สามารถใช้จำแนกลักษณะอาการของกล้วยที่ถูกทำลาย โดยดูจากชั้นภายในลำต้น

ในขณะที่กล้วยหอมนั้นไม่พบการเข้าทำลายภายใน แต่ต้นกล้วยหอมเกิดการตายทั้งหมด โดยคาดว่าอาจเกิดจากการแข่งขันกันระหว่างเชื้อและต้นกล้วย (Competition) โดยเชื้อได้แย่งอาหารจากต้นกล้วย ทำให้ต้นกล้วยไม่มีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญเติบโต และต่อสู้กับเชื้อ ต้นกล้วยจึงตาย การทดลองนี้ได้ทำการปลูกเชื้อที่ความเข้มข้นและเวลาเท่ากับกล้วยน้ำว้า โดยหนึ่งหน่วยทดลองได้ปลูกกล้วยทั้งสองพันธุ์ไว้ในขวดเดียวกันสองขวด

Table 1-7 ลักษณะอาการภายนอกของกล้วยที่ปลูกเชื้อด้วย Spore suspension ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ที่ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

วันที่	ลักษณะที่พบ
1	ไม่พบเส้นใย
2	ไม่พบเส้นใย
3	ไม่พบเส้นใย
4	พบเส้นใยบางๆ รอบบริเวณโคนต้น
5	กลุ่มของเส้นใยมากขึ้นจนเห็นได้ชัด
6	เส้นใยเริ่มปกคลุมอาหาร ในกรณีของต้นที่ไม่แข็งแรงจะไม่สามารถเจริญเติบโต และบางต้นตาย
7	ใบของกล้วยบางใบเริ่มมีสีเหลือง

Table 1-8 สัดส่วนของกล้วยน้ำว้าที่เป็นโรค หลังปลูกเชื้อด้วย Spore suspension ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ที่ความเข้มข้น 10^{-3} นาน 7 วัน

Plantlet No.	Level			
	1	2	3	4
1	83.34%	75.00%	8.34%	100.00%
2	100.00%	83.34%	8.34%	100.00%
3	100.00%	83.34%	25.00%	100.00%
4	Dead	Dead	Dead	Dead
5	100.00%	75.00%	8.34%	100.00%
6	91.67%	83.34%	16.67%	100.00%
7	100.00%	66.67%	8.34%	100.00%
8	83.34%	83.34%	16.67%	100.00%
9	100.00%	91.67%	8.34%	100.00%
10	100.00%	91.67%	25.00%	100.00%
11	100.00%	91.67%	25.00%	100.00%

Level 1 ชั้นด้านในสุด (แกน) เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก โดยแบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

2 ชั้นที่ 2 ถัดออกมา เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก โดยแบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3 ชั้นนอกที่สุด เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก โดยแบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย แต่พบการเข้าทำลายน้อยกว่าชั้นที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน

พื้นผิวภายนอกกล้วย แทนด้วย 100.00% หากพบเส้นใยปกคลุมโดยรอบ

Figure 1-16 กล้วยน้ำว้า (ซ้าย) และกล้วยหอม (ขวา) หลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับ Spore suspension ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ที่ความเข้มข้น 10^{-3} นาน 7 วัน

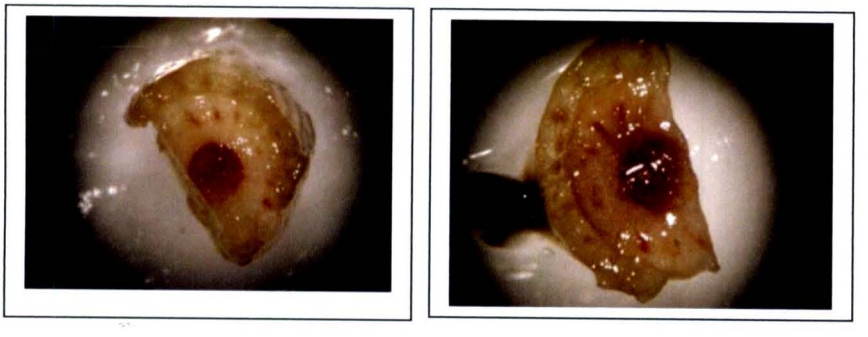


Figure 1-17 ภาพตัดขวางของต้นอ่อนกล้วยน้ำว้าหลังปลูกเชื้อด้วย Spore suspension ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ที่ความเข้มข้น 10^{-6} นาน 7 วัน

การทดลองที่ 4 การศึกษาลักษณะความแตกต่างของเชื้อ *Foc* เมื่อเข้าทำลายกล้วยน้ำว้า 10 พันธุ์

Table 1-9 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์ละอองน้ำที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	0	33.34	100
2	0	8.34	100
3	8.34	25	100
4	8.34	25	100
5	0	0	100
6	0	0	00
7	0	33.34	100
8	0	0	100
9	0	0	100
10	0	0	100
11	8.34	25	100
12	8.34	0	100
13	8.34	0	100
14	8.34	8.34	100
15	0	8.34	100

Table 1-10 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่องที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	100	75	100
2	100	66.67	100
3	41.67	41.67	100
4	83.34	33.34	100
5	33.34	33.34	100
6	41.67	58.34	100
7	33.34	58.34	100
8	41.67	58.34	100
9	33.34	50	100
10	33.34	41.67	100
11	50	58.34	100
12	41.67	58.34	100
13	41.67	58.34	100
14	58.34	66.67	100
15	33.34	50	100

Table 1-11 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์พระราชทานที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	83.34	50	100
2	100	100	100
3	100	66.67	100
4	91.67	75	100
5	100	66.67	100
6	83.34	75	100
7	100	58.34	100
8	100	75	100
9	100	100	100
10	91.67	58.34	100
11	91.67	83.34	100
12	83.34	83.34	100
13	66.67	58.34	100
14	100	75	100
15	100	58.34	100

Table 1-12 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์ขาวนวลที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	83.34	50	100
2	66.67	33.34	100
3	58.34	41.67	100
4	75	41.67	100
5	83.34	50	100
6	83.34	41.67	100
7	83.34	□0	100
8	66.67	41.67	100
9	75	41.67	100
10	100	66.67	100
11	100	66.67	100
12	83.34	75	100
13	91.67	66.67	100
14	58.34	41.67	100
15	83.34	50	100

Table 1-13 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์น้ำไทที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	100	100	100
2	100	83.34	100
3	75	50	100
4	75	50	100
5	83.34	66.67	100
6	100	50	100
7	100	83.34	100
8	83.34	58.34	100
9	83.34	66.67	100
10	91.67	66.67	100
11	100	58.34	100
12	100	100	100
13	100	91.67	100
14	100	41.67	100
15	100	50	100

Table 1-14 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์พระประแดงที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	100	100	100
2	100	83.34	100
3	83.34	83.34	100
4	100	75	100
5	83.34	66.67	100
6	100	91.67	100
7	100	91.67	100
8	100	100	100
9	100	100	100
10	83.34	66.67	100
11	100	91.67	100
12	100	83.34	100
13	91.67	91.67	100
14	83.34	75	100
15	100	91.67	100

Table 1-15 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์ค่อมที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	50	41.67	100
2	0	0	100
3	0	0	10□
4	8.34	0	10□
5	0	0	100
6	0	0	100
7	0	0	100
8	0	16.67	100
9	25	25	100
10	8.34	8.34	100
11	0	0	100
12	0	0	100
13	0	0	100
14	16.67	0	100
15	8.34	0	100

Table 1-16 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์กำแพงเพชรที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	100	83.34	100
2	100	83.34	100
3	83.34	83.34	100
4	25	50	100
5	83.34	41.67	100
6	100	83.34	100
7	100	91.67	100
8	75	58.34	100
9	66.67	66.67	100
10	100	91.67	100
11	100	91.67	100
12	91.67	100	100
13	91.67	66.67	100
14	75	66.67	100
15	75	75	100

Table 1-17 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์ดำที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	100	50	100
2	100	33.34	100
3	91.67	58.34	100
4	83.34	50	100
5	100	50	100
6	83.34	33.34	100
7	100	41.67	100
8	100	66.67	100
9	91.67	58.34	100
10	100	33.34	100
11	91.67	41.67	100
12	91.67	66.67	100
13	100	33.34	100
14	100	58.34	100
15	100	41.67	100

Table 1-18 คะแนนการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์ชุมพรที่ปลูกด้วยเชื้อ *Foc* ความเข้มข้น 10^{-3} เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

Plantlet No.	Level		
	1	2	3
1	83.34	83.34	100
2	83.34	83.34	100
3	91.67	58.34	100
4	91.67	66.67	100
5	100	100	100
6	83.34	66.□7	100
7	100	66.67	100
8	91.67	□5	100
9	9□.67	91.67	100
10	100	83.34	100
11	91.67	66.67	100
12	100	100	100
13	91.67	66.67	100
14	100	66.67	100
15	91.67	75	100

Level 1 ชั้นด้านในสุด (แกน) เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก โดยแบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

2 ชั้นที่ 2 ถัดออกมา เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก โดยแบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3 ชั้นนอกที่สุด เทียบจากท่อลำเลียงขนาดเล็ก โดยแบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย แต่พบการเข้าทำลายน้อยกว่าชั้นที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน

<u>การทดลองที่ 5</u> การศึกษาผลของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเชื้อ *Foc* ต่อการเกิดโรคในกล้วยน้ำว้า

การศึกษาพบว่ากล้วยแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของสารพิษในสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* ในระดับที่ต่างกัน (Table 1-19 – Table 1-25) โดยกล้วยน้ำว้าพันธุ์ขาวนวลแสดงอาการเป็นโรคในสัดส่วนที่ต่ำ (4 ใน 10 ต้น: 40%) และมีอาการใน level 1 ซึ่งเป็นส่วนในของลำต้น (1.5 คะแนน) น้อยกว่าพันธุ์อื่น ขณะที่กล้วยน้ำว้าพันธุ์พระประแดงตอบสนองต่อการเข้าทำลายของสารพิษในสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* สูงที่สุด ทั้งสัดส่วนของต้นที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (4 ใน 5 ต้น: 80%) และระดับอาการใน level 1 (6.5 คะแนน)

ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับการตอบสนองของกล้วยที่มีต่อเชื้อ *Foc* ในการทดลองที่ 4 ซึ่งพบว่ากล้วยน้ำว้าพันธุ์ละอองน้ำและกล้วยน้ำว้าพันธุ์ค่อมมีระดับความทนทานสูง ขณะที่กล้วยน้ำว้าพันธุ์พระราชทาน กล้วยน้ำว้าพันธุ์พระประแดง กล้วยน้ำว้าพันธุ์ค่อม กล้วยน้ำว้าพันธุ์ดำ กล้วยน้ำว้าพันธุ์ชุมพร และกล้วยน้ำไท ตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อในระดับสูง ซึ่งอาจเกิดจากการตอบสนองต่อเชื้อนั้นเกี่ยวข้องกับความจำเพาะในการเข้าทำลายของเชื้อ แต่การตอบสนองต่อสารสกัดหยาบเป็นผลของปฏิกิริยาของเซลล์กล้วยที่มีต่อสารพิษในสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* ดังนั้นการใช้สปอร์ของเชื้อสาเหตุจึงเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการคัดพันธุ์กล้วยน้ำว้าที่ทนทานต่อการเข้าทำลายของโรคตายพราย

Table 1-19 การแสดงอาการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าละอองน้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* นาน 30 วัน

Crude extract	External	Internal	Score
0 ppm	0/10	0/10	0
100 ppm	1/10	3/10	2.5
200 ppm	0/10	4/10	0.5
400 ppm	5/10	6/10	6.0

หมายเหตุ

ปกติ ภายนอก ไม่แสดงอาการ ลำต้นเขียว ใบเขียว

ภายใน ท่อลำเลียงเขียว

เป็นโรค ภายนอก ลำต้นเหลือง ปลายใบเหลือง ใบล่างเหี่ยว

ภายใน ท่อลำเลียงฉ่ำน้ำ มีสีเหลือง

คะแนน อัตราการเกิดโรคภายในลำต้น แบ่งเป็น 100 ส่วน

Table 1-20 อาการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* นาน 30 วัน

Crude extract	**External**	**Internal**	**Score**
0 ppm	0/10	0/10	0
100 ppm	0/10	0/10	1.5
200 ppm	7/10	5/10	5.5
400 ppm	2/10	3/10	6.5

หมายเหตุ

ปกติ ภายนอก ไม่แสดงอาการ ลำต้นเขียว ใบเขียว

ภายใน ท่อลำเลียงเขียว

เป็นโรค ภายนอก ลำต้นเหลือง ปลายใบเหลือง ใบล่างเหี่ยว

ภายใน ท่อลำเลียงฉ่ำน้ำ มีสีเหลือง

คะแนน อัตราการเกิดโรคภายในลำต้น แบ่งเป็น 100 ส่วน

Table 1-21 อาการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพันธุ์พระราชทานที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* นาน 30 วัน

Crude extract	**External**	**Internal**	**Score**
0 ppm	0/10	0/10	0
100 ppm	0/10	3/10	0.5
200 ppm	5/10	6/10	6
400 ppm	8/10	10/10	5

หมายเหตุ

ปกติ ภายนอก ไม่แสดงอาการ ลำต้นเขียว ใบเขียว
ภายใน ท่อลำเลียงเขียว

เป็นโรค ภายนอก ลำต้นเหลือง ปลายใบเหลือง ใบล่างเหี่ยว
ภายใน ท่อลำเลียงฉ่ำน้ำ มีสีเหลือง

คะแนน อัตราการเกิดโรคภายในลำต้น แบ่งเป็น 100 ส่วน

Table 1-22 อาการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าขาวนวลที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* นาน 30 วัน

Crude extract	**External**	**Internal**	**Score**
0 ppm	0/10	0/10	0
100 ppm	0/10	1/10	0
200 ppm	1/10	5/10	0.5
400 ppm	2/10	4/10	1.5

หมายเหตุ

ปกติ ภายนอก ไม่แสดงอาการ ลำต้นเขียว ใบเขียว

ภายใน ท่อลำเลียงเขียว

เป็นโรค ภายนอก ลำต้นเหลือง ปลายใบเหลือง ใบล่างเหี่ยว

ภายใน ท่อลำเลียงฉ่ำน้ำ มีสีเหลือง

คะแนน อัตราการเกิดโรคภายในลำต้น แบ่งเป็น 100 ส่วน

Table 1-23 อาการเป็นโรคของกล้วยน้ำไทที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* นาน 30 วัน

Crude extract	**External**	**Internal**	**Score**
0 ppm	0/10	0/10	0
100 ppm	2/10	4/10	0
200 ppm	2/10	3/10	0
400 ppm	5/10	8/10	6.5

หมายเหตุ

ปกติ ภายนอก ไม่แสดงอาการ ลำต้นเขียว ใบเขียว
ภายใน ท่อลำเลียงเขียว

เป็นโรค ภายนอก ลำต้นเหลือง ปลายใบเหลือง ใบล่างเหี่ยว
ภายใน ท่อลำเลียงฉ่ำน้ำ มีสีเหลือง

คะแนน อัตราการเกิดโรคภายในลำต้น แบ่งเป็น 100 ส่วน

Table 1-24 อาการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าพระประแดงที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* นาน 30 วัน

Crude extract	**External**	**Internal**	**Score**
0 ppm	0/5	0/5	0
100 ppm	0/5	0/5	2
200 ppm	1/5	4/5	2
400 ppm	1/5	4/5	4

หมายเหตุ

ปกติ ภายนอก ไม่แสดงอาการ ลำต้นเขียว ใบเขียว
ภายใน ท่อลำเลียงเขียว

เป็นโรค ภายนอก ลำต้นเหลือง ปลายใบเหลือง ใบล่างเหี่ยว
ภายใน ท่อลำเลียงฉ่ำน้ำ มีสีเหลือง

คะแนน อัตราการเกิดโรคภายในลำต้น แบ่งเป็น 100 ส่วน

Table 1-25 อาการเป็นโรคของกล้วยน้ำว้าชุมพรที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Foc* นาน 30 วัน

Crude extract	**External**	**Internal**	**Score**
0 ppm	0/5	0/5	0
100 ppm	3/5	4/5	0
200 ppm	1/5	2/5	0
400 ppm	4/5	4/5	3

หมายเหตุ

ปกติ ภายนอก ไม่แสดงอาการ ลำต้นเขียว ใบเขียว
ภายใน ท่อลำเลียงเขียว

เป็นโรค ภายนอก ลำต้นเหลือง ปลายใบเหลือง ใบล่างเหี่ยว
ภายใน ท่อลำเลียงฉ่ำน้ำ มีสีเหลือง

คะแนน อัตราการเกิดโรคภายในลำต้น แบ่งเป็น 100 ส่วน

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆของกล้วย พบว่าสามารถใช้แกนกลางของเครือมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้จำแนกพันธุ์กล้วยได้ และสามารถบ่งบอกเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของกล้วย12 พันธุ์ได้โดยใช้ primer จำนวน 8 คู่กับเทคนิค AFLP โดยสามารถจัดกลุ่มกล้วย 10 พันธุ์ที่ศึกษาได้เป็น 7 กลุ่ม

ส่วนการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยในการประเมินความสามารถในการทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis* เชื้อสาเหตุของโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า พบว่าสามารถประเมินผลได้อย่างรวดเร็ว คือเพียง 7 วันเมื่อใช้สปอร์ปลูกเชื้อกับต้นในสภาพปลอดเชื้อ แทนที่จะต้องใช้เวลาถึง 8 เดือนตามวิธีปกติ ทั้งนี้กล้วยมีการตอบสนองต่อสารสกัดหยาบจากเชื้อสาเหตุได้ช้ากว่าการตอบสนองต่อสปอร์

บรรณานุกรม

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม มปป. การควบคุมโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า http://ppath.agr.ku.ac.th/index.php?option=com_content&task=view&id=115&Itemid=1 29 กรกฎาคม 2552

เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2545. **กล้วย**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 357 หน้า

พัฒนา ศรีฟ้า. 2538. พันธุวิศวกรรม, น. 268-374. *ใน***พฤกษศาสตร์ขั้นสูงสำหรับครู.** บัณฑิตศึกษาสาขาวิชาศึกษาศาสตร์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, กรุงเทพฯ.

ยุคลธร สถาปนศิริ. 2542. **การวิเคราะห์จีโนมของพืชบางชนิดในสกุล*Gracinia*โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สณหรรศน์ นันทะไชย ธำรง ช่วยเจริญ วีรวิทย์ วิทยรักษ์ และนิรันดร์ ดิษฐกระจัน. มปป. โครงการทดสอบกล้วยระหว่างชาติ International Musa Testing Program. จากhttp://www.doae.go.th/library/html/detail/banana/page142.htm 29 กรกฎาคม 2552

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ :ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Bänfer, G., B. Fiala and K. Weising. 2004. AFLP analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic species of Macaranga (Euphorbiaceae) and their allies. **Plant Syst. Evol**. 249: 213–231.

Dnyaneshwar, W., C. Preeti, J. Kalpana and P. Bhushan. 2006.Development and Application of RAPD-SCAR Marker for Identification of *Phyllanthusemblica*LINN.*Biol.* **Pharm. Bull.**29(11) 2313-2316.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** 12: 13-15.

Eiadthong W., K. Yonemor, A. Sugiura, N. Utsunomiya and S. Subhadrabandhu. 1999. Analysis of phylogenetic relationships in *Mangifera* by restriction site analysis of an amplified region of cp DNA. **Scientia Hort.** 80: 145-155.

Eiadthong W., K. Yonemori, S. Kanzaki, A. Sugiura, N. Utsunomiya and S. Subhadrabandhu. 2000. Amplified fragment length polymorphism analysis for studying genetic relationships among *Mangifera* species in Thailand. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**. 125: 160-164.

Engelborghs, I., S. Campenhout and R. Swennen. 1998. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* sp. **Infomusa**7: 3-6.

Hwang, S.-C. and W.-H. Ko. 2004. Cavendish Banana Cultivars Resistant to Fusarium Wilt Acquired through Somaclonal Variation in Taiwan. **Plant Disease**. 88: 580-588.

Kanzaki, S., K. Yonemori, A. Sugiura, A. Sato, and M. Yamada (2001) Identification of molecular markers linked to the trait of natural astringency loss of Japanese persimmon fruit. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 126: 51-55.

Kuzumitsu M., M. L. Barbosa, L. A. C. Souza and J. B. Teixeira. 1995. Race 1 fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. **Euphytica** 84: 67-71.

Morgante, M. 1994. Applications of Molecular Markers in Plant Genetics and Breeding. **Proc. of IPBA.** Rogla, Slovenia.

Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 76: 5269-5273.

Rohlf, H. J. 1993. **NTSYS pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System.** Applied Biostatistic Inc, New york.

Sefc, K.M., F. Regner, E. Turetschek, J. Glössl and H. Steinkellner. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitisriparia*and their applicability for genotyping of different *Vitis*species. **Genome.**42: 367-373.

Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. **Numerical Taxonomy.** Freeman, San Francisco.

Tatikonda, L., S. P. Wani., S. Kannan., N. Beerelli., T. K. Sreedevi., D. A. Hoisington., P. Devi and R. K. Varshney. 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatrophacurcas* L., a biofuel plant. **Plant Science** 176: 505–513.

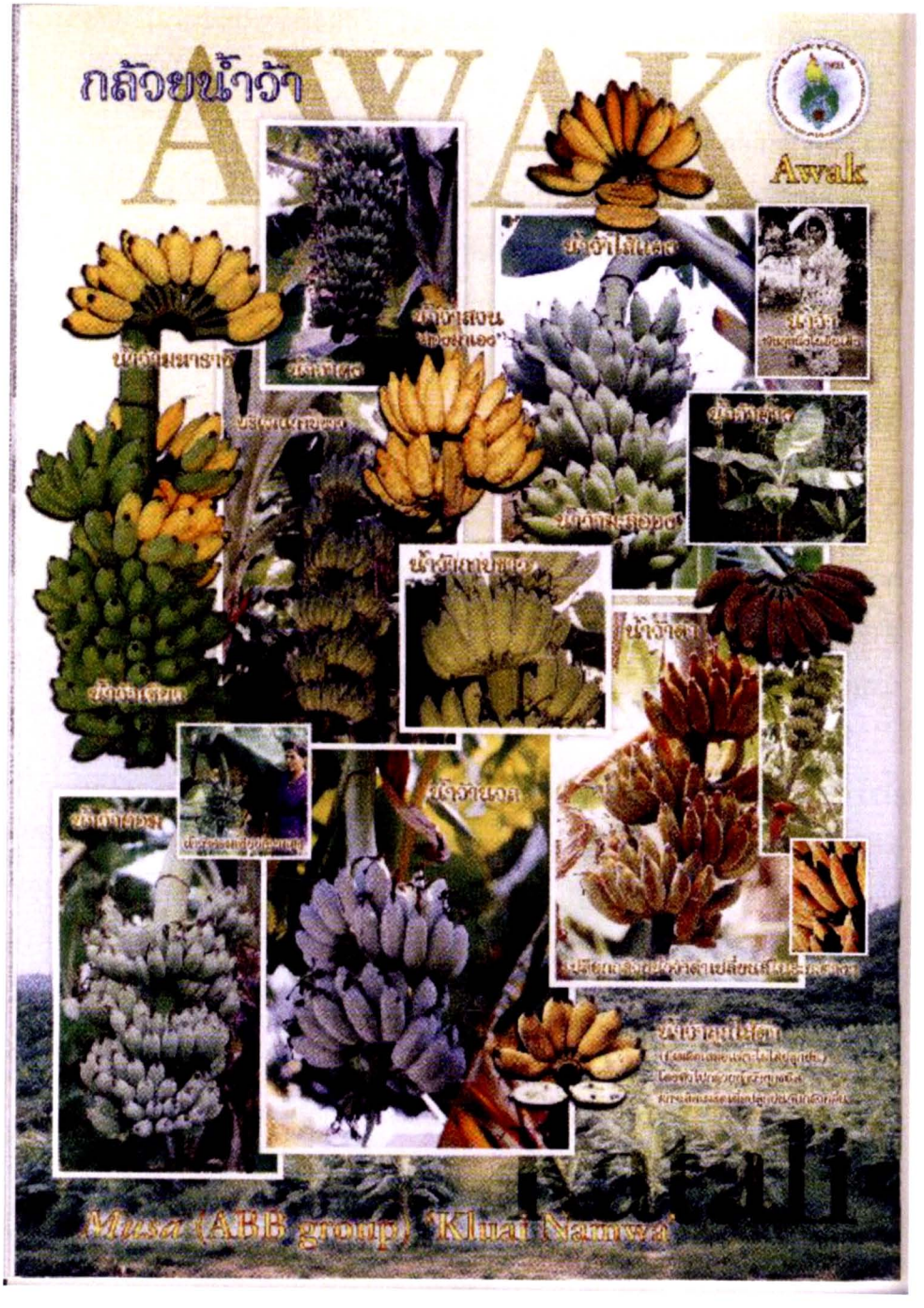
Yang, X., C. Liu and S. Lin. 2009. Genetic relationships in Eriobotrya species as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Scientia Horticulturae** 122: 264–268.

Yapwattanaphun, C., S. Subhadrabandhu, C. Honsho, and K. Yonemori (2004) Phylogenetic relationship of mangosteen and several wild relatives revealed by ITS sequence data. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 129: 368-373.

อาการของโรคตายพราย

กล้วยที่เป็นโรคตายพราย เกิดจากการที่เชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* เข้าทำลายราก แล้วเจริญเข้าไปอยู่ในท่อน้ำท่ออาหารของเหง้าและโคนลำต้น ทำให้ท่อน้ำท่ออาหารเกิดอุดตันและเน่าเป็นสีน้ำตาล ตัดกับเนื้อเยื่อสีขาวอย่างเห็นได้ชัด ของเหลวจากเซลล์ที่เน่าจะไหลเข้าไปอุดตันท่อน้ำท่ออาหารด้วยเช่นกัน เมื่อโรคมีความรุนแรงจะทำให้ท่อน้ำท่ออาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มและแดงม่วง ซึ่งเป็นผลให้การส่งผ่านน้ำและแร่ธาตุอาหารไม่สามารถเป็นไปตามปกติได้ เพราะท่อน้ำท่ออาหารเสื่อมสภาพ ใบจึงเกิดขาดน้ำมีลักษณะอาการเหี่ยวเฉาเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ผืนใบอาจเหี่ยวย่นและหักพับลงมาขนานแนบลำต้น ส่วนใบยอดนั้นยังเห็นสีขาวและเจริญตั้งตรงอยู่บนยอด กาบของลำต้นเทียมจะประกบอยู่อย่างหลวม ๆ แล้วแยกออกและห้อยลงมา การเจริญเติบโตจะชะงักงัน ไม่ผลิดอกออกผล ในขณะเดียวกันก็อาจมีหน่อกล้วยงอกเจริญออกมาสดใสเหมือนปกติอยู่ระยะหนึ่ง และจะชะงักการเจริญ มีลักษณะอาการเหี่ยวเฉาตามมา อย่างไรก็ตาม ทั้งต้นแก่และต้นอ่อนเมื่อผ่าลำต้นตรวจดูตามขวางจะพบว่ากาบที่อยู่ภายนอกจะมีเนื้อเยื่อสีเหลือง แต่กาบถัดเข้าไปจะเป็นสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแดง

ภาคผนวก



กล้วยน้ำว้าพันธุ์ต่างๆ

(ที่มา: ณรงค์ โฉมเฉลา. 2547. สายพันธุ์กล้วยน้ำว้า บันทึกเครือข่ายพืชปลูกพื้นเมืองไทย 4: 19-23.)

ลักษณะของกล้วยน้ำว้าบางพันธุ์

1) กล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่อง (ไส้เหลือง)

ต้นสูง 350-450 เซนติเมตร กาบใบมีสีเหลืองอมเขียว ติดผลได้ 14 -16 ผล/หวี มี 7 - 16 หวี/เครือ เนื้อสีครีมค่อนข้างนิ่มมีรสหวานอมเปรี้ยวเมื่อเริ่มสุก ไส้มีสีเหลือง

ความหนาของใบ บริเวณฐานใบ 0.052 มม. บริเวณปลายใบ 0.037 มม.

น้ำหนักสดของใบ 761.67 กรัม

น้ำหนักสดของก้านใบ 288.33 กรัม

2) กล้วยน้ำว้าพันธุ์ขาวนวล

ความหนาของใบ บริเวณฐานใบ 0.047 มม. บริเวณปลายใบ 0.038 มม.

น้ำหนักสดของใบ 1250 กรัม

น้ำหนักสดของก้านใบ 318.33 กรัม

3) กล้วยน้ำว้าพันธุ์ไส้แดง

ความหนาของใบ บริเวณฐานใบ 0.045 มม. บริเวณปลายใบ 0.038 มม.

น้ำหนักสดของใบ 730.69 กรัม

น้ำหนักสดของก้านใบ 243.33 กรัม

4) กล้วยน้ำว้าพันธุ์ค่อม

ความหนาของใบ บริเวณฐานใบ 0.097 มม. บริเวณปลายใบ 0.041 มม.

น้ำหนักสดของใบ 674.67 กรัม

น้ำหนักสดของก้านใบ 181.67 กรัม

5) กล้วยน้ำว้าพันธุ์กาบขาว[1]

ความหนาของใบ บริเวณฐานใบ 0.047 มม. บริเวณปลายใบ 0.038 มม.

น้ำหนักสดของใบ 1250 กรัม

น้ำหนักสดของก้านใบ 318.33 กรัม

6) กล้วยน้ำว้าพันธุ์ดำ

---

1 ณรงค์ โฉมเฉลา. 2547. สายพันธุ์กล้วยน้ำว้า บันทึกเครือข่ายพืชปลูกพื้นเมืองไทย 4: 19-23.

ต้นสูง 280-310 เซนติเมตร ติดผลได้ 12-14 ผล/หวี มี 5-9 หวี/เครือ เนื้อมีรสหวานจัด ไส้มีสีเหลือง

7) กล้วยน้ำว้าพันธุ์เงิน/กล้วยน้ำว้าพันธุ์นวล

ต้นสูง 320-350 เซนติเมตร กาบใบมีสีเขียวอ่อนเจือชมพู ติดผลได้ 12-14 ผล/หวี มี 7-9 หวี/เครือ ผิวมีสีนวล เนื้อมีรสหวานแต่ฝาดเล็กน้อย ไส้มีสีเหลือง

8) กล้วยน้ำว้าพันธุ์ละโว้

ต้นสูง 320-350 เซนติเมตร ผลใหญ่กว่าพันธุ์อื่นประมาณเท่าตัว

9) กล้วยน้ำว้าพันธุ์ทองมาเอง

ต้นสูง 320-350 เซนติเมตร กาบใบมีสีน้ำตาลแดงคล้ายกล้วยหอม ติดผลได้ 12-14 ผล/หวี มี 7-12 หวี/เครือ ผิวมีสีเหลืองจัด เนื้อมีสีขาว รสหวาน ไส้มีสีเหลือง ผลไม่เละเมื่องอม

10) กล้วยน้ำว้าพันธุ์ตะนาวศรี

ต้นสูง 450-480 เซนติเมตร กาบใบมีสีเขียวสด ติดผลได้ 14 -16 ผล/หวี มี 14-20 หวี/เครือ เนื้อมีรสหวานหอม ไส้มีสีขาวอมเหลือง

ความหนาของใบ บริเวณฐานใบ 0.097 มม. บริเวณปลายใบ 0.041 มม.

น้ำหนักสดของใบ 674.67 กรัม

น้ำหนักสดของก้านใบ 181.67 กรัม