

## ผลการวิจัยและวิจารณ์

### 1. การผสมพันธุ์ : จำนวนเมล็ดและต้นอ่อนลูกผสมชั่วที่ 1 (F1 seeds and seedlings)

จากการผสมเกสรแบบพบกัณหมด (diallele cross) และผสมตัวเอง (self) ของสับปะรดทั้ง 3 พันธุ์ รวมทั้งหมด 9 คู่ผสม ผลการผสมได้จำนวนเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งหมดจากทุกคู่ผสมเป็นจำนวน 2,437 เมล็ด ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 1(a-b) และเมื่อเพาะเมล็ดลูกผสมดังกล่าวได้ต้นอ่อนสับปะรดจำนวน 1,459 ต้น (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) จากการผสมตัวเองของสับปะรดทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าไม่มีเมล็ดเกิดขึ้นเลยจากการผสมตัวเองของพันธุ์ TP (TP x TP) และจากการผสมตัวเองของพันธุ์ PV (PV x PV) และ PK (PK x PK) ได้อย่างละ 2 เมล็ด แต่เมล็ดดังกล่าวไม่สมบูรณ์ทำให้ไม่งอกหลังจากทำการเพาะเมล็ดดังตารางที่ 2 สำหรับการผสมระหว่างสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรม (TP)กับพันธุ์ PK นั้น เนื่องจากสับปะรดพันธุ์ TP ได้มาจากพันธุ์ PK ที่ใส่ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาฟอส [Bialaphos resistant (*bar*) gene] เข้าไป ทำให้พันธุกรรมของพันธุ์ TP มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์ PK ทุกประการ ยกเว้นมีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาฟอส ทำให้การผสมระหว่างพันธุ์ TP x PK ไม่มีเมล็ดเกิดขึ้น หรือได้เมล็ดแต่เมล็ดไม่สมบูรณ์ทำให้เพาะไม่งอกในการผสมระหว่าง (PK x TP) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 2 จำนวนเมล็ดสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากแต่ละคู่ผสมระหว่างสับปะรด 3 พันธุ์ และจำนวนต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่งอกเมื่อ 4 อาทิตย์หลังเพาะเมล็ด

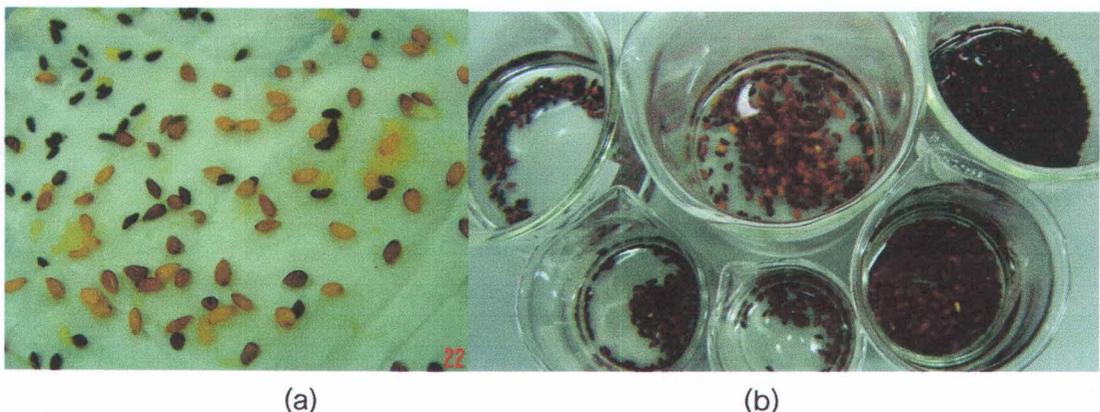
Crosses	No. of F <sub>1</sub> seeds	No. of F <sub>1</sub> plants
PV x TP	836	657
PV x PK	579	177
TP x PV	362	273
TP x PK	0	0
PK x PV	642	352
PK x TP	14	0
PV x PV	2	0
PK x PK	2	0
TP x TP	0	0
Total	2,437	1,459

## 2. การตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 และการถ่ายทอดยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสสู่สับปะรดพันธุ์การค้า

### 2.1 การตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยใช้สารเคมี X-gluc

จากต้นอ่อนสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ของการผสมระหว่าง PV x TP และการผสมกลับ TP x PV จำนวน 930 ต้น จากข้อที่ 1 (ภาพที่ 2 และ 3) เมื่อทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอส โดยใช้สารเคมี X-gluc (ภาพที่ 4) ได้จำนวนต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ใบมีสีน้ำเงิน (ภาพที่ 5) หลังป่นกับสารเคมี X-gluc จำนวน 507 ต้น ซึ่งหมายถึงมียีนรายงานผล (reporter gene คือ *gus* gene) และยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอส (*bar* gene) อยู่ในต้นสับปะรดชั่วที่ 1 และได้จำนวนต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ใบไม่แสดงสีน้ำเงิน จำนวน 423 ต้น ซึ่งแสดงว่าไม่มียีน *gus* และยีน *bar* ซึ่งเมื่อทดสอบความแตกต่างในทางสถิติของจำนวนต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสและจำนวนต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ไม่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสโดยใช้ Chi-square test ของจำนวนต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ถูกตรวจสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชด้วยสารเคมี X-gluc ดังกล่าว พบว่าไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ดังตารางภาคผนวกที่ 1 เมื่อแยกการตรวจสอบยีนรายงานผลของคู่ผสม TP x PV จำนวน 158 ต้น และ PV x TP จำนวน 95 ต้น รวม 253 ต้น มาตรวจสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืช พบว่ามี 116 ต้น ที่ให้ผลเป็น GUS positive และ 137 ต้น ที่ให้ผลเป็น GUS negative (ตารางที่ 3) แสดงว่ามีการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสจากสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมไปยังสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและอาจมียีนควบคุมอยู่ 1 คู่ และเป็น hemizygous ควบคุมลักษณะความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสและการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล

ภาพที่ 1 เมล็ดสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1: (a) จากการผลิตระหว่าง (PV x TP) และ (b) การผสมกลับ (TP x PV)



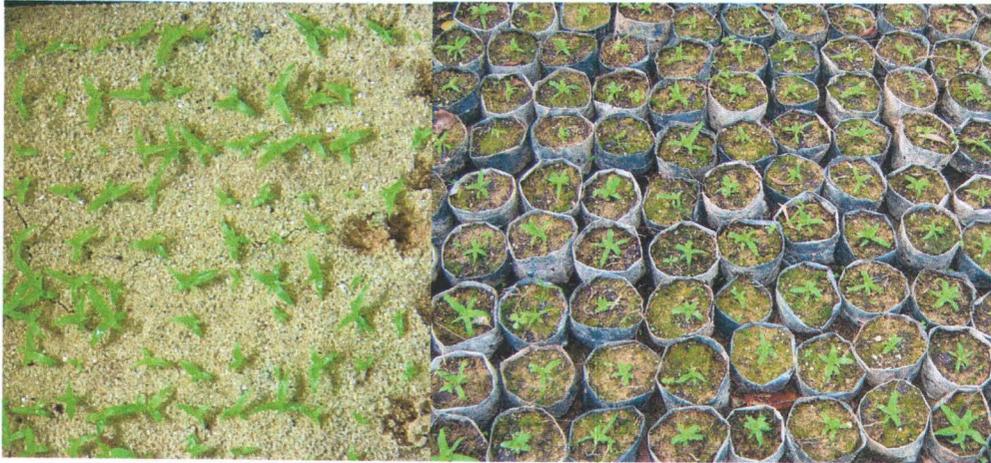
(a)

(b)

(a)

(b)

ภาพที่ 2 ต้นอ่อนของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1: (a) จากการเพาะเมล็ด 1 เดือนในกระบะทรายและ (b) ย้ายลงถุงดำ 1 เดือน ของคู่ผสมระหว่าง (PV x TP)



(a)

(b)

ภาพที่ 3 สับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 : a-b) 4 เดือนหลังจากย้ายลงในถุงดำเลี้ยงในเรือนเพาะชำ c) 6 เดือนหลังจากย้ายลงเลี้ยงในเรือนเพาะชำ d) 1 เดือนหลังจากย้ายลงแปลง

(a)

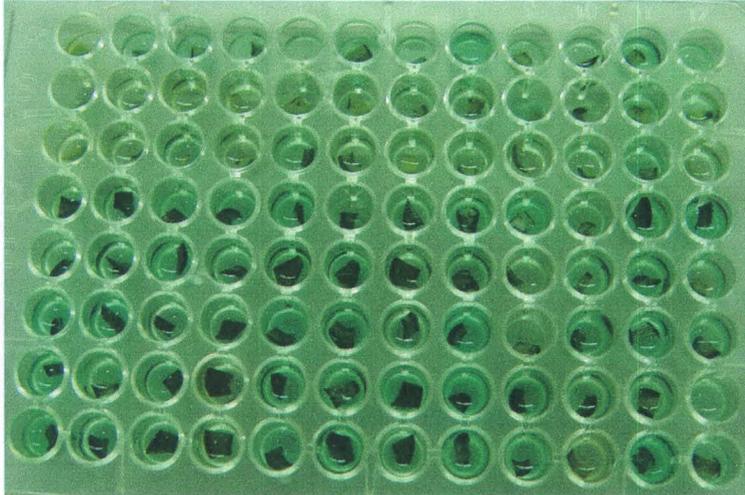
(b)



(c)

(d)

**ภาพที่ 4** การทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสโดยใช้สารเคมี X-gluc ในใบของต้นอ่อนสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีอายุ 5 เดือนหลังเพาะเมล็ดและมีความสูงของต้น 2 ซม.



**ภาพที่ 5** แสดงผลการทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสโดยใช้สารเคมี X-gluc ในใบของต้นอ่อนสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1(2-1) และหลังจากนำใบที่บ่มในสารเคมี X-gluc มาแช่ในแอลกอฮอล์(2-2): (a) แสดงใบอ่อนของต้นสับปะรดที่ไม่มี ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชเนื่องจากไม่เกิดสีน้ำเงินเมื่อบ่มใบในสารเคมี (b) ปลายใบแสดงติดสีน้ำเงินแสดงต้นสับปะรดที่มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืช

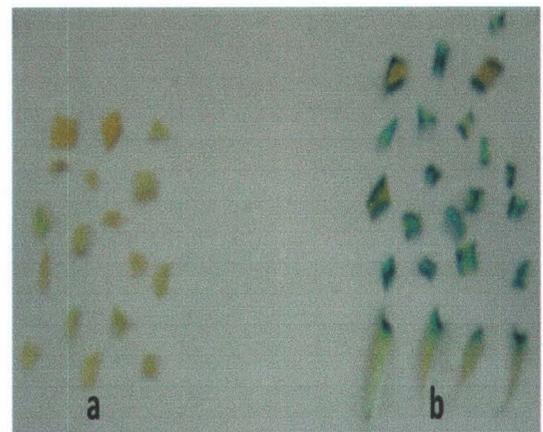
(2-1)

(2-2)



(a)

(b)



ตารางที่ 3 ทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบอลาฟอส โดยใช้สารเคมี X-gluc และการใช้สารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> ของต้นประดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากแต่ละคู่ผสมระหว่างต้นประด 3 พันธุ์ และการทดสอบความแตกต่างในทางสถิติของจำนวนต้นต้นประดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบอลาฟอสและจำนวนต้นต้นประดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ไม่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบอลาฟอสโดยใช้ Chi-square test

Crosses	F <sub>1</sub> assessed for GUS	No. of F <sub>1</sub>		$\chi^2$ (1:1)	Apparent genotype of F <sub>1</sub> seedlings <sup>c</sup>	No. of F <sub>1</sub> hybrids selected
		GUS <sup>+a</sup> BastaR <sup>b</sup>	GUS <sup>-a</sup> BastaS <sup>b</sup>			
TP x PV	158	72	86	1.24 <sup>NS</sup>	<i>gus</i> /- <i>bar</i> /-	-
PV x TP	95	44	51	0.52 <sup>NS</sup>	<i>gus</i> /- <i>bar</i> /-	18
PV x PK	10	-	10	-	-/- -/-	-
PK x PV	10	-	10	-	-/- -/-	-
PK x TP	-	-	-	-		
PV x PV	-	-	-	-		
PK x PK	-	-	-	-		
$\Sigma$ (PV x TP Parents)	253	116	137	1.74 <sup>NS</sup>		
Total	273	116	157	-		

<sup>a</sup>GUS<sup>+</sup>: GUS positive, GUS<sup>-</sup>: GUS negative, <sup>b</sup>BastaR: Biaphos-resistant, BastaS; Bialaphos-sensitive <sup>c</sup>*gus*: *gus* gene, *bar*: bialaphos resistant gene, NS: not significant.

## 2.2 การตรวจสอบความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยการให้สารโดยใช้ สารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup>

ลูกผสมชั่วที่ 1 ของสับปะรดจากคู่ผสม (TP x PV) และ (PV x TP) ที่ผ่านการตรวจสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชโดยใช้ยื่นรายงานผลจากการใช้สารเคมี X-gluc พบว่าทุกต้นมีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชบาสต้า-เอ็กซ์ ที่อัตราความเข้มข้นในอัตราที่แนะนำ 400 ลบ.ซม. ต่อไร่ ส่วนในสับปะรดพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้เป็นสิ่งทดลองควบคุม (control treatments) พบว่าสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชบาสต้า-เอ็กซ์ ที่อัตราความเข้มข้นแนะนำ 400 ลบ.ซม. ต่อไร่ แต่ในพันธุ์ภูเกิดและพันธุ์ปัตตาเวียใบสับปะรดค่อยๆชืดเหลืองและตายในที่สุดหลังจากฉีดพ่นยา 14 วัน ดังในตารางที่ 4 ตารางภาคผนวกที่ 2 และในภาพที่ 6-8 ซึ่งพันธุ์พ่อแม่ทั้งสองพันธุ์แสดงผลลบในการตรวจสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืช ทั้งวิธีการใช้สารเคมี X-gluc และการใช้สารกำจัดวัชพืชบาสต้า-เอ็กซ์ ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของการทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของ Sripaoraya (2001) และ Sripaoraya et al. (2006) ซึ่งรายงานว่าสับปะรดที่มีการแสดงออกของยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช หรือ ยีน *bar* สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้จริงในทุกๆความเข้มข้น แต่สับปะรดพันธุ์ภูเกิดและพันธุ์ปัตตาเวียที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *bar* ไม่สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup>

ตารางที่ 4 ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชใบลาฟอสของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย พันธุ์ภูเกิด สับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมและสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ของคู่ผสมต่างๆหลังพ่นสารกำจัดวัชพืชบาสต้า-เอ็กซ์ อัตรา 400 ลบ.ซม.ต่อไร่ ในต้นสับปะรดที่มีอายุ 6 เดือนในเรือนเพาะชำ

พันธุ์สับปะรด	ซ้ำ	เปอร์เซ็นต์การตาย			คะแนน		
		จำนวนวันหลังพ่นยา			จำนวนวันหลังพ่นยา		
		3	7	14	3	7	14
พันธุ์ภูเกิด (PK)	1	30	70	100	2.5	4.5	6
	2	30	70	100	2.5	4.5	6
	3	30	70	100	2.5	4.5	6
	4	30	70	100	2.5	4.5	6
พันธุ์ปัตตาเวีย (PV)	1	30	70	100	2.5	4.5	6
	2	30	70	100	2.5	4.5	6

	3	30	70	100	2.5	4.5	6
	4	30	70	100	2.5	4.5	6
ลำดับปรดัดแปร พันธุกรรม (TP)	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
	3	0	0	0	1	1	1
	4	0	0	0	1	1	1
ลำดับปรดลูกผสมชั่วที่ 1 (TP x PV)	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
	3	0	0	0	1	1	1
	4	0	0	0	1	1	1
ลำดับปรดลูกผสมชั่วที่ 1 (PV x TP)	1	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	1	1	1
	3	0	0	0	1	1	1
	4	0	0	0	1	1	1
ลำดับปรดลูกผสมชั่วที่ 1 (PV x PK)	1	30	70	100	2.5	4.5	6
	2	30	70	100	2.5	4.5	6
	3	30	70	100	2.5	4.5	6
	4	30	70	100	2.5	4.5	6
ลำดับปรดลูกผสมชั่วที่ 1 (PK x PV)	1	30	70	100	2.5	4.5	6
	2	30	70	100	2.5	4.5	6
	3	30	70	100	2.5	4.5	6
	4	30	70	100	2.5	4.5	6

- เมื่อ 1 - พืชปกติไม่แสดงอาการเป็นพิษ
- 2 - พืชแสดงความเป็นพิษเล็กน้อย หรือน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์
- 3 - พืชแสดงความเป็นพิษปานกลาง หรือ 40 เปอร์เซ็นต์
- 4 - พืชแสดงความเป็นพิษค่อนข้างรุนแรง หรือ 60 เปอร์เซ็นต์
- 5 - พืชแสดงความเป็นพิษอย่างรุนแรง หรือ 80 เปอร์เซ็นต์
- 6 - พืชแสดงความเป็นพิษ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือ ตายทั้งหมด



ภาพที่ 6 แสดงความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาลฟอสของสับปะรด พันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 และสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรม ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาลฟอส (บาสต้า-เอ็กซ์) โดยที่ใบและต้นยังคงเขียวสมบูรณ์

ภาพที่ 7 แสดงความไม่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาลฟอสของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย มีใบค่อยๆเหลืองหลังพ่นยาบาสต้า-เอ็กซ์ 5 วัน และสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ(แถวข้างสุด)ที่ยังมีใบเขียวสมบูรณ์



ภาพที่ 8 แสดงความไม่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาลฟอสของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (ขวาสุด) ซึ่งมีใบแห้งตายหลังพ่นยาบาสต้า-เอ็กซ์ 14 วัน ในขณะที่สับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เป็น GUS positive ที่ยังมีใบและต้นสีเขียว

### 3. ลักษณะทางเขตรกรรมของสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 และการคัดเลือกสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 (F<sub>1</sub>)

#### 3.1 ลักษณะทางเขตรกรรมของสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1

ทำการย้ายต้นสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่โตขนาด 2 ซม. จากกระเพาะเพาะจำนวน 1,459 ต้น ลงถุงดำและเลี้ยงในเรือนเพาะชำ แล้วย้ายต้นสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่โตขนาดประมาณ 20 ซม. จากเพาะเรือนเพาะชำลงแปลงทดลอง จำนวน 1,459 ต้น (ภาพที่ 3a-d) เมื่อต้นโตขนาดน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัมขึ้นไป ทำการหยอดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการออกดอกที่ยอดของต้นสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 สับประรดจะออกดอก (ภาพที่ 9a-d) ทำการบันทึกวันออกดอก ลักษณะการมีหนามและสีใบของสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่าสีใบมีตั้งแต่สีเขียวอ่อนเขียวเข้ม ส้มเขียว ม่วง ส้ม ส้มเขียว (ภาพที่ 10a-d) ส่วนลักษณะการมีหนามของใบ พบว่าใบของสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 มีความแปรปรวนของลักษณะการมีหนามของใบ โดยใบมีหนามตลอดทั้งใบ จนกระทั่งใบไม่มีหนาม มีเฉพาะปลายใบหรือมีหนามไม่สม่ำเสมอดังภาพที่ 11a-c แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะต่างๆของสับประรดลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างสับประรดพันธุ์ต่างๆ ซึ่งมีการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์ที่ต่างกัน

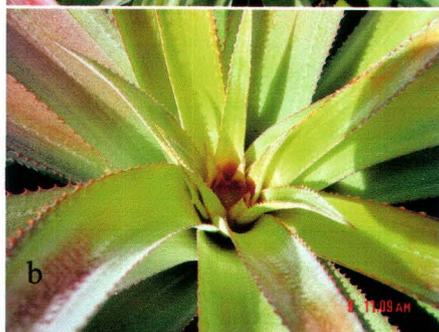
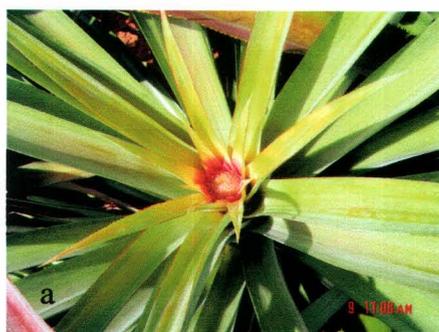
ภาพที่ 9 กระตุ้นการออกดอกในสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่พร้อมจะออกดอก: a) ต้นที่มีน้ำซังที่ยอดและ พร้อมที่จะออกดอก, b) หยอดสารเคมีลงในหยอด, c-d) 45 วัน หลังจากหยอดสารกระตุ้นการออกดอก



ภาพที่ 10 ความแปรปรวนลักษณะสีของใบในสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 : a) สีเขียวม่วง, b) สีส้มเขียว c) สีเขียวเข้ม d) สีม่วง



ภาพที่ 11 แสดงความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะการมีหนามของใบในสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 หลังจากย้ายลงปลูกในแปลงทดลอง: a) ขอบใบเรียบมีหนามเฉพาะปลายใบ b) ขอบใบมีหนามตลอด c) ขอบใบมีหนามไม่สม่ำเสมอ



ส่วนลักษณะการเป็นโรครากและไส้เน่า จะให้ผลเช่นเดียวกันทั้งในสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 สับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรม พันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์ภูเก็ต แต่ลักษณะจำนวนตะเกียงต่อต้นพบว่า ทั้งสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 สับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมและพันธุ์ภูเก็ตที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีทั้งต้นที่มีตะเกียงและไม่มีตะเกียงเกิดขึ้น ทั้งนี้อาจจะเกิดจากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจมีผลของฮอร์โมนที่ถูกใช้เป็นอาหารขณะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และในสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมมีจำนวนมากกว่าในพันธุ์ภูเก็ต คือเฉลี่ย 1.23 ตะเกียง ซึ่งมากกว่าพันธุ์ภูเก็ตที่มี 0.2 ตะเกียง ดังตารางที่ 5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรม ผ่านการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาหลายครั้งกว่าพันธุ์ภูเก็ตซึ่งอาจทำให้มีผลต่อการเกิดตะเกียงดังกล่าว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละครั้งมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด ส่วนพันธุ์ปัตตาเวียไม่มีตะเกียงเกิดขึ้น สำหรับอายุการออกดอก อายุการเก็บเกี่ยวไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากมีการใช้สารเคมีหยุดที่ยอดเพื่อควบคุมการออกดอก ยกเว้นในพันธุ์ปัตตาเวียที่ใช้ต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีเปอร์เซ็นต์การออกดอกต่ำและช้ากว่าพันธุ์อื่นๆ แม้ว่าจะหยุดสารเคมีเพื่อกระตุ้นการออกดอกพร้อมกับพันธุ์อื่นๆ ส่วนต้นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ทำการผสมตัวเอง (ภาพที่ 12a-c) ก็มีลักษณะทางเขตกรรมที่หลากหลาย เช่นเดียวกับสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ปลูกเพื่อคัดเลือกต้นอื่นๆ

### 3.2 การคัดเลือกสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1

ทำการคัดเลือกสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 จากลักษณะทางเขตกรรมเช่นลักษณะทรงต้น ลักษณะใบ ลักษณะการมีหนามที่ใบ โดยเลือกต้นที่ไม่มีหนามหรือมีหนามเฉพาะปลายใบ ลักษณะความต้านทานโรค จำนวนจุกและจำนวนหน่อต่อต้น เมื่อสับปะรดสุกแก่แล้ว ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตและบันทึกลักษณะผลผลิตและลักษณะคุณภาพผลของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 เช่น ความกว้าง ความยาวของผล น้ำหนักผลก่อนและหลังปลิดจุกออก ความลึกของตา ลักษณะความหวาน ความหอม ความกรอบของเนื้อ ได้สรุปข้อมูลต่างๆได้ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 14-15 ซึ่งพบว่ามีสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชบาสด้า-เอ็กซ์ มีลักษณะทางเขตกรรมดี และมีคุณภาพผลดี มีศักยภาพที่จะเป็นสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ดีจำนวน 18 เบอร์ (ตารางที่ 4) จากตารางพบว่าลักษณะผลของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ศึกษาเช่นรูปร่างของผลพบว่าเป็นความแปรปรวนในรูปร่างของผลในสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ดังภาพที่ 14 ซึ่งมีตั้งแต่ผลทรงกลม ทรงรี ทรงกระบอก ทรงกรวย ส่วนลักษณะสีของผลก็มีตั้งแต่ผลสีเหลืองอ่อน เหลืองอมส้ม สีส้ม จนถึงสีแดง ส่วนขนาดความกว้างของผล พบว่าผลมีขนาดความกว้างอยู่ในช่วง 8.50 – 14.00 ซม. ความยาวของผลอยู่ในช่วง 8.00 -19.00 ซม. น้ำหนักผลทั้งจุกและน้ำหนักผลอยู่ในช่วง 0.82 - 2.33 และ

0.68 - 1.90 กก. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ภูเก็ตและลับประรดตัดแปรรูปพันธุ์กรรมมีขนาดความกว้างของผลเป็น 9.46 ซม. เท่ากัน มีความยาวของผลเป็น 14.05 และ 18.09 ซม. มีน้ำหนักผลทั้งจุกเป็น 0.81 และ 0.93 กก. มีน้ำหนักผลเป็น 0.79 และ 0.87 กก.ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ปัตตาเวียมีความกว้างของผลเป็น 12.85 ซม. มีความยาวของผลเป็น 17.54 ซม. มีน้ำหนักผลทั้งจุกเป็น 2.09 กก. มีน้ำหนักผลเป็น 1.89 กก. (ตารางที่ 5) จากตารางที่ 4 และตารางที่ 5 พบว่าต้นลับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่คัดเลือกไว้เบื้องต้นจำนวน 18 เบอร์ นั้น มีจำนวน 3 เบอร์ คือ (PV x TP)-51; (PV x TP)-46 และ (PV x TP)-34 ซึ่งให้ลักษณะความต้านทานสารกำจัดวัชพืช มีเปอร์เซ็นต์ความหวานสูง (18-22 องศาบริกซ์) โดยเฉพาะลูกผสม (PV x TP)-34 ที่ให้ความหวานสูงถึง 22.2 องศาบริกซ์ ตา (blossom cup) ตื้นคือ 0.7 ซม. ผลกลมเล็กกว่าพันธุ์ภูเก็ตและพันธุ์ปัตตาเวียคือมีน้ำหนักผลทั้งจุก 840 กรัม เนื้อผลมีกลิ่นหอม กรอบ ขอบใบเรียบมีหนามเฉพาะปลายใบ ส่วนลูกผสมเบอร์ (PV x TP)-46 นั้นมีลักษณะคล้ายพันธุ์ปัตตาเวียแต่ผลรูปกรวย มีน้ำหนักผลทั้งจุก 2,230 กรัม มีความหวาน 18 องศาบริกซ์ ส่วนลูกผสมเบอร์ (PV x TP)-51 มีผลทรงกระบอก แต่มีขอบใบเรียบมีหนามเฉพาะปลายใบ ตาตื้น มีน้ำหนักผลทั้งจุก 1,080 กรัม มีความหวานสูงถึง 18.65 องศาบริกซ์ ส่วนลักษณะความกรอบและความหอมเมื่อทดสอบโดยการชิมแล้วพบว่าให้ทั้งความกรอบและความหอมที่เหมือนกันในทั้งสามเบอร์ที่เป็นลับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ลักษณะที่สำคัญคือลับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ทุกเบอร์ที่คัดเลือกไว้มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปลาฟอสในอัตราที่แนะนำคือ 400 ลบ.ซม./ไร่ โดยอัตรานี้ทำให้วัชพืชตายหมดแต่ลับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ยังเจริญเติบโตเป็นปกติ โดยที่ลับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีลักษณะดีและมีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชและมีศักยภาพที่เป็นพันธุ์ลูกผสมที่ดีสูงเหล่านี้จะถูกนำไปปลูกขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและปลูกทดสอบเพื่อยืนยันการให้ลักษณะดีและเป็นพันธุ์ดีต่อไป

ตารางที่ 4 ลักษณะเปอร์เซ็นต์ความหวาน (% Brix) และลักษณะทางเขตกกรรมของสับปะรด  
ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> ที่มีศักยภาพเป็นลูกผสมที่ดีและถูก  
คัดเลือกไว้จำนวน 18 เบอร์

Hybrid No.	°Brix	wt. (g)		Shape	Fruit size (cm)		Core dia. (cm)	Cup+ depth (cm)	Leaf spiny
		crown	fruit		width	length			
7	17.15	120	1450	cylindrical	12.0	17.0	2.8	1.5	spiny
8	17.50	100	1580	cylindrical	12.5	19.0	3.0	1.1	tip only
13	17.25	130	1420	cylindrical	12.0	18.0	4.5	1.5	spiny
15	17.15	130	720	round	10.5	11.5	2.5	0.7	tip only
17	16.90	130	720	cylindrical	8.9	14.2	2.0	0.7	tip only
23	18.50	130	730	cylindrical	9.2	13.8	2.0	1.0	spiny
24	17.55	70	840	cylindrical	10.0	13.0	2.0	1.0	tip only
25	16.20	80	850	cylindrical	10.0	14.0	2.0	0.9	spiny
34	22.2	140	740	round	8.5	8.0	2.0	0.7	tip only
37	17.40	130	1060	cylindrical	11.5	13.5	2.2	1.1	tip only
39	17.45	280	1160	cylindrical	12.4	18.0	2.4	1.2	tip only
45	18.70	120	850	round	10.5	11.5	2.3	0.7	spiny
46	18.00	430	1900	conical	14.0	18.5	4.0	1.0	tip only
51	18.65	160	920	cylindrical	10.5	12.8	2.3	0.8	tip only
308	17.40	140	700	round	11.5	8.0	4.0	0.9	tip only
312	17.65	130	1340	cylindrical	11.0	18.0	1.5	1.0	spiny
320	17.25	140	680	round	11.5	9.0	3.5	1.1	irregularly
322	17.60	250	990	round	13.0	11.0	5.0	0.6	spiny



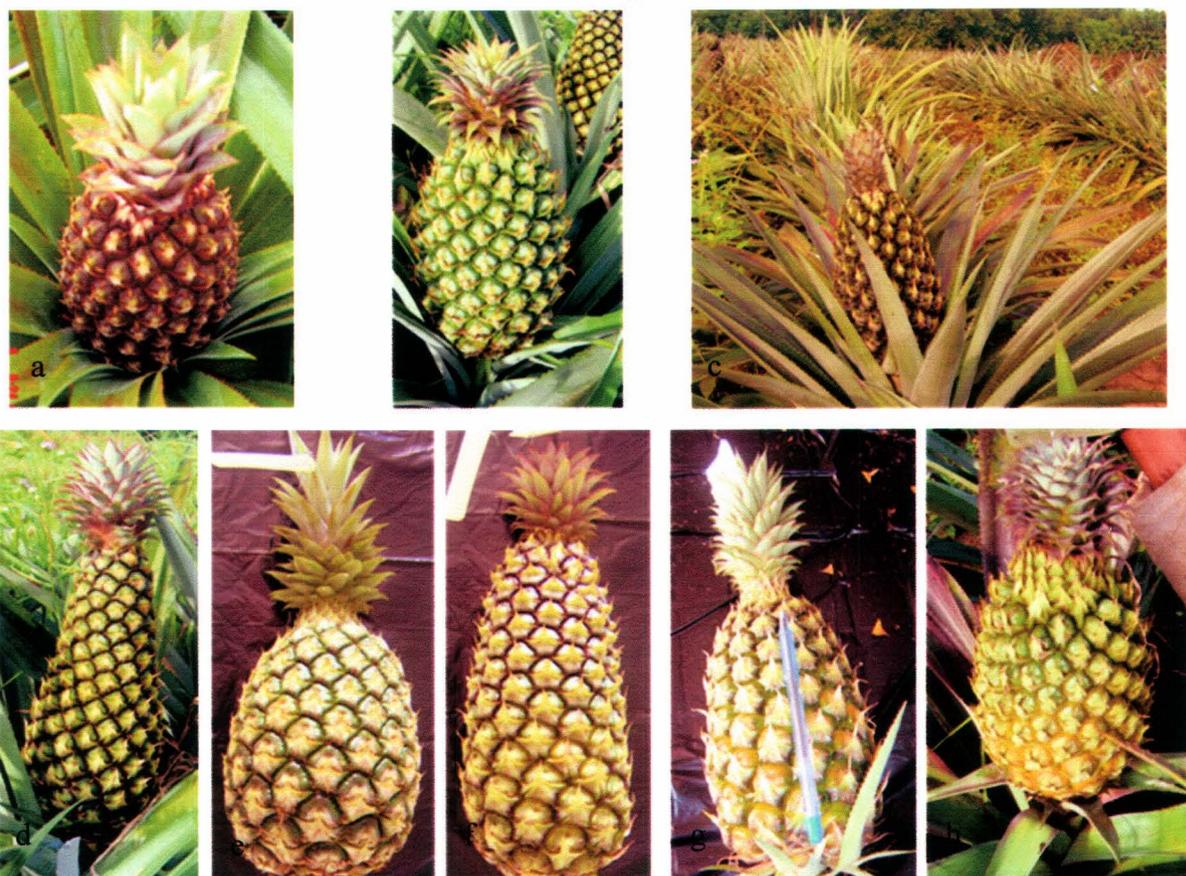
ตารางที่ 5 ลักษณะทางเกษตรกรรมและลักษณะเปอร์เซ็นต์ความหวาน (% Brix) ของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> ที่มีศักยภาพเป็นลูกผสมที่ดีเด่นและถูกคัดเลือกไว้จำนวน 3 เบอร์ เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ คือ PK TP และ PV

ลักษณะทางการเกษตร	พันธุ์พ่อแม่			พันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เบอร์ที่		
	PK	TP	PV	# 34	# 46	# 51
1. ความกว้างของผล (ซม.)	9.46	9.49	12.85	8.5	14.0	10.5
2. ความยาวของผล (ซม.)	14.05	18.09	17.54	8.0	18.5	12.8
3. น้ำหนักผลทั้งจุก (กิโลกรัม)	0.81	0.93	2.09	0.88	2.33	1.08
4. น้ำหนักผล (กิโลกรัม)	0.79	0.87	1.89	0.74	1.9	0.92
5. ลักษณะการมีหนาม	spiny	spiny	tip only	tip only	tip only	tip only
6. อายุการออกดอก (เดือน, หลังย้ายปลูก)	13	13	14	13	13	13
7. อายุการเก็บเกี่ยว (เดือน, หลังย้ายปลูก)	17	17	18	17	17	17
8. การเป็นโรครากและไส้เน่า(%)	0	0	1.12	0	0	0
9. จำนวนตะเกียงต่อต้น	0.2	1.23	0	0	0.45	0.77
10. ความกรอบ	กรอบ	กรอบ	จ๋า	กรอบ	กรอบ	กรอบ
11. ความหวาน (% Brix)	15.7	15.0	14.4	22.2	18.0	18.65

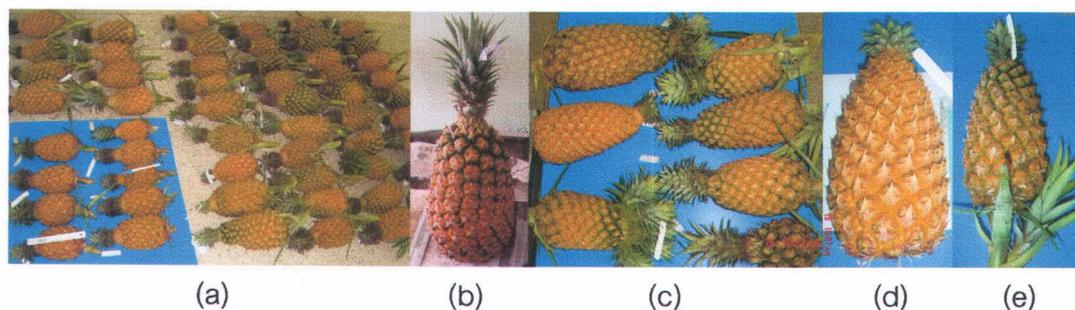
ภาพที่ 12 สับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 : a) การผสมตัวเองของลูก  $F_1$  b-c) ผลสับปะรดชั่วที่ 1 อายุ 2 และ 3 เดือนหลังจากการถูกทำการผสมตัวเองของดอกตามลำดับ



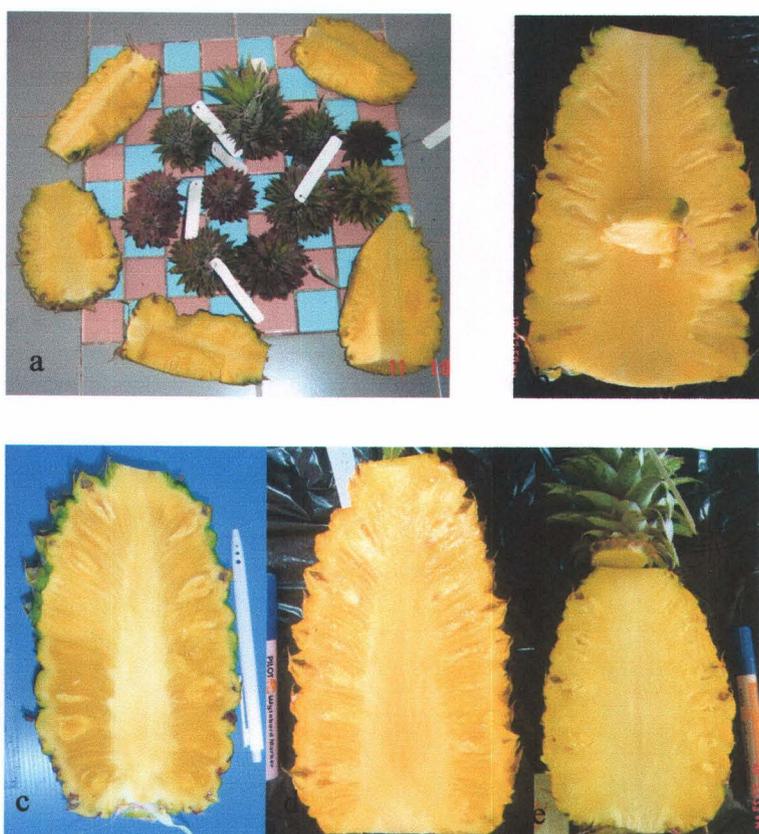
ภาพที่ 13 แสดงความแปรปรวนของผลสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 ในลักษณะของสีผล รูปร่างของผล ลักษณะและสีของจุก : a-d) การผสมตัวเองของลูก  $F_1$  (PV x TP) e-h) การผสมตัวเองของลูก  $F_1$  (TP x PV) ที่มียืนต้นทางานสารกำจัดวัชพืชไบลาฟอสอยู่



ภาพที่ 14 แสดงความแปรปรวนของผลสืบประดลูกผสมชั่วที่ 1 ในลักษณะของสีผล ขนาดและรูปร่างของผล ลักษณะและสีของจุก : a) ลูก  $F_1$  จากการผสมของ (PV x TP) , b-e) ลูก  $F_1$  จากการผสมของ (TP x PV)



ภาพที่ 15 แสดงความแปรปรวนของเนื้อผลสืบประดลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งลักษณะของสีเนื้อของผล ความกว้างของแกน ความลึกของตา ความกว้างความยาวของผล: a) ลักษณะจุกและเนื้อของผลของ ลูก  $F_1$  (PV x TP) b-e) ลักษณะเนื้อผลของลูก  $F_1$  (TP x PV)

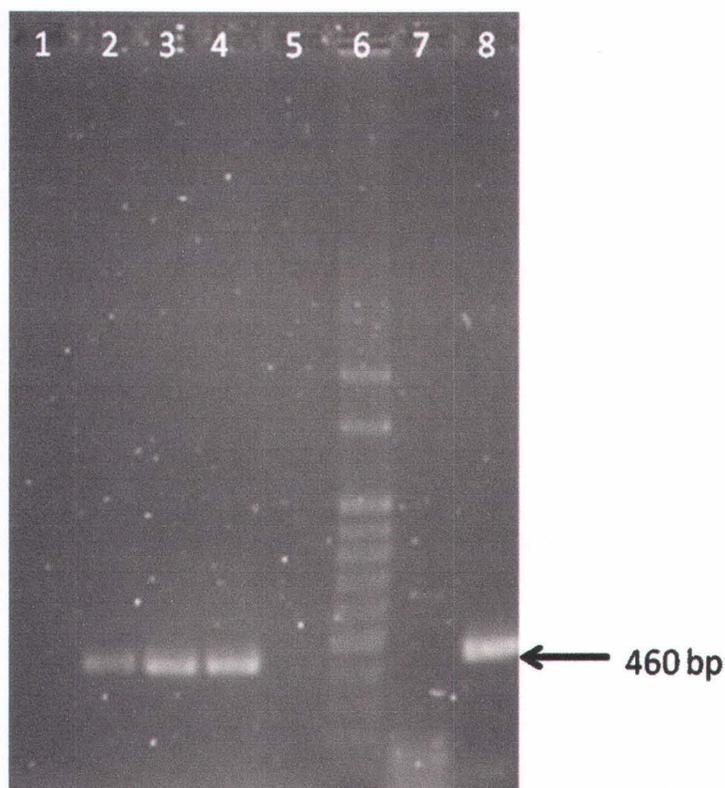


#### 4. ความเสถียร (stability) และการแสดงออก (expression) ของยีน *bar* ในสับประรดชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub> generation)

ทำการแกะเมล็ดสับประรดชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub>) จากผลที่ได้จากการผสมตัวเองและการผสมกลับไปยังพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์ภูเก็ตของสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ด้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาลฟอส ได้จำนวนเมล็ดทั้งหมด 287 เมล็ด ที่เป็นเมล็ดสืบ จำนวน 69 เมล็ด และเป็นเมล็ดปกติ 218 เมล็ด เพาะเมล็ดชั่วที่ 2 ซึ่งเป็นเมล็ดที่มีลักษณะปกติ จำนวน 218 เมล็ด และพบว่ามีต้นอ่อนสับประรดงอกหลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลาสองเดือน จำนวน 22 ต้น ซึ่งการที่มีเมล็ดงอกน้อยอาจมีผลจากการป้องกันการผสมตัวเองของสับประรด และเมื่อตรวจสอบยืนยันรายงานผลในใบสับประรดชั่วที่ 2 ที่ออกดังกล่าวโดยการทำ GUS assay พบว่ามีการแสดงของยีนรายงานผลในใบสับประรดชั่วที่ 2 ที่ตรวจสอบโดยให้สีน้ำเงินจำนวน 13 ต้น และไม่พบสีน้ำเงินจำนวน 9 ต้น และไม่พบสีน้ำเงินในสับประรดพันธุ์ปัตตาเวีย พบว่าสัดส่วนที่ได้จากการทดสอบจาก GUS assay ระหว่าง GUS positive และ GUS negative เป็น 1:1 ซึ่งหากการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดลสัดส่วนในลูกชั่วที่ 2 จากการผสมตัวเองดังกล่าวควรเป็น 3:1 แต่อาจเป็นเพราะจำนวนต้นสับประรดชั่วที่ 2 ที่งอกมีจำนวนน้อยเกินไปอาจมีผลทำให้ผลดังกล่าวไม่เป็นไปตามกฎ จึงน่าจะมีการศึกษาเพิ่มโดยทำการผสมตัวเองของสับประรดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ด้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาลฟอสและผสมกลับไปยังพันธุ์ปัตตาเวียและพันธุ์ภูเก็ตเพิ่มเติมและทำในจำนวนต้นที่มาก โดยเฉพาะการผสมกลับเพราะครั้งนี้อาจผสมกลับได้ในจำนวนต้นที่น้อยเพราะเป็นการทำเพิ่มเติมจากแผนการวิจัย ทำให้มีจำนวนต้นและดอกในการผสมน้อย

สำหรับการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้านทานสารกำจัดวัชพืช (*bar* gene) เพื่อตรวจสอบความคงอยู่ของยีน *bar* ในใบสับประรดชั่วที่ 2 โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และการตรวจสอบ mRNA ของยีน *bar* ด้วยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบสับประรด พบว่า สับประรดชั่วที่ 2 ที่มีอายุการเจริญเติบโต 1 เดือนหลังงอกและมี GUS positive (Lane ที่ 2-4) แสดงความเสถียรและมีการแสดงออก (expression) ของยีน *bar* โดยปรากฏแถบที่ขนาดเดียวกับยีน *bar* ซึ่งเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lane ที่ 6) แล้วมีขนาด 460 คู่เบส ในขณะที่สับประรดชั่วที่ 2 ที่มี GUS negative (Lane ที่ 1 และ Lane ที่ 5) ไม่ปรากฏแถบที่ขนาด 460 คู่เบส ดังในรูปที่ 16 ส่วนการแสดงออกของยีน *bar* เมื่อตรวจสอบที่ 1 เดือนหลังงอก จากการทำ RT-PCR พบว่าสับประรดชั่วที่ 2 ที่มี GUS positive ทั้ง 3 ต้น มีการแสดงออกของยีน *bar* แต่ไม่พบว่ามียีนดังกล่าวในสับประรดชั่วที่ 2 ที่มี GUS negative การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลยืนยันว่ามีความเสถียรและการแสดงออกของยีน

*bar* ในยีนโนมของสับปะรดชั่วที่ 2 ส่วนการอยู่รอดและการเจริญเติบโตที่ปกติของสับปะรดชั่วที่ 2 เมื่อฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> ที่ความเข้มข้น 400 ลบ.ชม./ไร่ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่แนะนำ ยังไม่สามารถทดสอบได้ในต้นสับปะรดชั่วที่ 2 เนื่องจากต้นสับปะรดชั่วที่ 2 ตอนนี้อยู่เล็กอยู่ และมีจำนวนต้นน้อยคือ 13 ต้น แต่จากผลความอยู่รอดและการเจริญเติบโตที่ปกติของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 เมื่อฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช Basta X<sup>®</sup> ที่ความเข้มข้น 400 ลบ.ชม./ไร่ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแสดงของยีน *bar* และยืนยันถึงการแสดงออกของยีน *bar* ซึ่งมีเอ็นไซม์ phosphinothricin transferase อยู่ อย่างไรก็ตาม ยังต้องศึกษาถึงความปลอดภัยด้านอาหารและสิ่งแวดล้อมของสับปะรดลูกผสมชั่วที่ 1 นี้ เนื่องจากมียีน *bar* ซึ่งเป็น Transgene ที่ได้จากการถ่ายยีนในแบคทีเรีย ซึ่งเป็นงานวิจัยที่จะต้องทำต่อไป



รูปที่ 16 แสดงความเสถียรของยีน *bar* เมื่อวิเคราะห์ด้วย Polymerase chain reaction โดยการวิเคราะห์ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชในสับปะรดชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub> generation) Lane 1 และ lane 5 = สับปะรดชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub>) ที่เป็น GUS negative, Lane 2-4 = สับปะรดชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub>) ที่เป็น GUS positive, Lane 6 = 100 bp ladder Marker (ดีเอ็นเอมาตรฐาน), Lane 7 = negative control (น้ำ), Lane 8 = positive control (pAHC25)