รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในมะเขือเทศ

(Inheritance of Resistance to Bacterial Wilt of Tomato)

คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2549-2550

คณะผู้วิจัย

1) ผศ. ดร. วินิจ เสรีประเสริฐ หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

2)ผศ. เสมอใจ ชื่นจิตต์ ผู้ร่วมวิจัย

ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

3)อาจารย์จำเริญ ยืนยงสวัสดิ์ ผู้ร่วมวิจัย

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะสงขลานครินทร์ ทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยวิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 9011

4)กรุง สีตะธนี ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

นักวิชาการชำนาญการ ระดับ 8

ศูนย์ วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กำแพงแสน จ. นครปฐม

5) นวพล สุรชิต ผู้ช่วยนักวิจัย

6) นันทิญา วงศ์ประชา ผู้ช่วยนักวิจัย

กิติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ คุณปฐมพงศ์ วงศ์เลี้ยง หัวหน้าฝ่ายสถานีวิจัยและเรือนกระจก คณะทรัพยากรธรรมชาติที่ได้ อำนวยความสะดวกในการใช้เรือนกระจก ของ คณะทรัพยากรธรรมชาติ เพื่อดำเนินการวิจัยทดลอง

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยวิจัยของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช น.ส. ปฏิมาพร ปลอดภัย และ น.ส. สายชล สิกขาจารย์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 ภาควิชาพืชศาสตร์ ที่ได้ช่วยเหลือปฏิบัติการดูแลพืชทดลอง

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้อนุเคราะห์ มอบพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณ คุณ กรุง สีตะธนี นักวิชาการชำนาญการ ระดับ 8 ที่ได้ให้คำปรึกษา ในการทดลองครั้งนี้ไว้เป็นอย่างสูง

คณะผู้วิจัย

22 ก.พ. 2554

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	**1**
Abstract	**2**
คำนำ	**3**
การตรวจเอกสาร	**4**
อุปกรณ์และวิธีการ	**5**
1)การทดลองเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยว	**6**
2)การคัดเลือกวิธีการปลูกเชื้อและความรุนแรงในการเกิดโรค	**7**
3)การปลูกทดสอบเพื่อดูลักษณะเบื้องต้นของพันธุ์มะเขือเทศจาก AVRDC	**8**
4)การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น	**8**
ผลการทดลอง	**10**
อภิปรายผลการทดลอง	**13**
สรุป	**14**
เอกสารอ้างอิง	**15**

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงดัชนีการเกิดโรคเหี่ยวเมื่อมีการใช้วิธีการใส่เชื้อต่างกัน และใช้ไอโซเลทของเชื้อต่างๆ 20 ไอโซเลท	11
ตารางที่ 2	ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น ในลักษณะเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(%) แสดงข้อมูลแต่ละซ้ำ และใช้พันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นพันธุ์ตรวจสอบในทั้งสองซ้ำ	12
ตารางผนวกที่ 1	การวิเคราะห์ความแปรปรวน ลักษณะ ดัชนีการเกิดโรค เมื่อใช้วิธีการปลูกเชื้อ ต่างกัน และ ใช้เชื้อไอโซเลทต่างๆ 20 ไอโซเลทร่วมกับ ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า)	17
ตารางผนวกที่ 2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนลักษณะการเป็นโรคในหน่วยเปอร์เซ็นต์	18
ตารางผนวกที่ 3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนลักษณะการเป็นโรคในหน่วย arcsine	18

สารบัญภาพ

ภาพผนวกที่		หน้า
1	มะเขือเทศชั่วรุ่นต่างๆ ในโรงเรือนทดสอบด้วยการปลูกเชื้อ โรงเรือนนี้ ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า (Control)	19
2	การทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อให้กับพืชในชั่วรุ่นต่างๆ การทดลองในซ้ำที่ 2 พืชจะถูกปลูกเชื้อด้วยวิธีตัดใบ	19
3	มะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ แสดงอาการเป็นโรค อย่างรุนแรง ในขณะที่ F2 ซึ่งอยู่ใกล้เคียง ไม่แสดง การเกิด โรค	20
4	ต้นมะเขือเทศที่เกิดโรค จะแยกออกมานับ และแยกออกจากกลุ่มที่ยังไม่เกิดโรค อาการเหี่ยวจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงไม่มีการให้คะแนนการเกิดโรค ภาพจากการทดสอบ ในซ้ำที่ 2	20
5	สีดาทิพย์ 3 ซึ่งอ่อนแอ อยู่ด้านหน้า และ F2 ซึ่งไม่แสดงการเกิดโรค จาก การทดสอบในซ้ำที่ 2	21
6	ต้นมะเขือเทศ ในชั่วรุ่นต่างๆ จะ วางใน โรงเรือนคลุมพลาสติก รวม 4 โรงเรือน โดย 1 โรงเรือน จะเป็น การปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า	21
7	พันธุ์ CLN2026D เกิดโรค น้อยกว่า พันธุ์ สีดาทิพย์ 1 และ สีดาทิพย์ 3 ภาพ จาก การทดสอบในซ้ำ	22
8	พันธุ์ สีดาทิพย์ 1 ที่ปลูกเชื้อ เริ่มแสดงอาการเกิดโรค	22
9	หลัง การนับครั้งสุดท้าย จะเห็นต้นที่อยู่รอด บางส่วน ทางซ้ายมือ เป็น ต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า ภาพการทดลองซ้ำที่ 2	23
10	ต้นมะเขือเทศที่ปลูก เพื่อ การผสมระหว่างพันธุ์ ผสมกลับ และ ผสมตัวเอง ภายใน เรือนกระจก คณะทรัพยากร ธรรมชาติ (9 พฤษภาคม 2551)	23
11	มะเขือเทศที่ปลูกในเดือน พฤษภาคม 2551 ในระยะ ออกดอก และติดผล	24
12	ผลมะเขือเทศจาก ต้น F1 คู่ผสม CLN2026D X สีดาทิพย์ 3	24
13	ผลของมะเขือเทศจากต้น F1 คู่ผสม CLN2026D X สีดาทิพย์ 1	25
14	ผลของมะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 เป็นผลที่เก็บรวมจากหลายต้น	25
15	ผลของสีดาทิพย์ 1 หลังเก็บเกี่ยว	26
16	อาการเป็นโรคที่เกิดขึ้นเองในพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ปลูกในเรือนกระจก	27
17-18	การทดสอบเชื้อที่ทำพร้อมกัน 3 ซ้ำ ต้นกล้าตายมากหลังการย้ายปลูก ด้วยสาเหตุเนื่องจากเพลี้ยแป้ง และ สาเหตุอื่น	28

19	การทดสอบเชื้อกับพืชในชั่วรุ่นต่างๆ 3 ซ้ำ 23 กรกฎาคม 2552	29
20	ต้นกล้าที่เพาะในถาดเพาะชำก่อนย้ายลงกระถางปลูก	29
21	ต้นกล้ามะเขือเทศ ที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ใหม่(re-isolation)	30
22	มะเขือเทศพันธุ์ CLN2026D	31
23	มะเขือเทศ พันธุ์ สีดาทิพย์ 1	32
24	มะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 4 ปลูกเพื่อดูลักษณะทั่วๆไป	33
25	สภาพภายในเรือนกระจก ที่มีการปลูกทดสอบเบื้องต้นพันธุ์ ต่างๆ	34
26	มะเขือเทศพันธุ์ CL 5915-153 D4 –3-3-0	35
27	มะเขือเทศสายพันธุ์ CL 5915-223 D4-2-1-0	36
28	มะเขือเทศพันธุ์ CLN2026D	37
29	มะเขือเทศพันธุ์ CLN2116 B	38
30	มะเขือเทศพันธุ์ CL5915-206D4 2-5-0	39
31	มะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3	40
32	มะเขือเทศพันธุ์ CLN2026D	41
33	มะเขือเทศพันธุ์ CL5915-223 D4 2-1-0	42
34	มะเขือเทศพันธุ์ CL294 BC1 F2 31-1	43

บทคัดย่อ

จากการศึกษา เชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับมะเขือเทศ (*Ralstonia solanacearum*) พบว่า ไอโซเลทที่ 15 (KP02) เป็นไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรคได้รุนแรง และพบว่าวิธีการปลูกเชื้อต่างกัน 3 วิธี คือ วิธีตัดใบ วิธีฉีดด้วยไมโครปิเปต และวิธีใส่เชื้อที่ต้น สามารถทำให้เกิดโรคที่ต้นพืชได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธีทั้งสาม จะก่อให้เกิดโรคได้46.06 , 46.38 , และ 45.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้ทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อโดยวิธีตัดใบ กับต้นกล้าอายุ 30 วัน ของมะเขือเทศชั่วรุ่นต่างๆ 6 ชั่วรุ่นที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ สีดาทิพย์ 1 (P_1) กับพันธุ์ CLN2026D (P_2) ชั่วรุ่นที่ ใช้ในการทดสอบคือ P_1 ,P_2 , F_1 ,F_2 BC_1 และ BC_2 ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์(Randomized Complete Block)ที่มีจำนวนซ้ำ 2 ซ้ำ ผลการใส่เชื้อให้กับต้นพืชก่อให้เกิดโรคกับพันธุ์ สีดาทิพย์ 1 100.00 และ 53.22 เปอร์เซ็นต์ในซ้ำที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ CLN2026D เกิดโรค 57.14 และ 37.93 เปอร์เซ็นต์ ในซ้ำที่1 และซ้ำที่ 2 ตามลำดับ การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชั่วรุ่น ไม่ว่าจะวัดในหน่วยของเปอร์เซ็นต์ หรือวัดในรูปค่าอาร์คไซน์ จึงไม่สามารถศึกษาอิทธิพลของยีนได้โดยการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น

ABSTRACT

The study at Faculty of Natural Resources, Prince of Songkhla University at Hat Yai revealed that bacterial isolate KP 02 (*Ralstonia solanacearum*) can cause severely wilt in 30 day-old seedlings of tomato. Three methods of inoculation *viz* : leaf clipping, micropipette injection and stem inoculation were not significant different in causing disease severity index. The seedlings inoculated by the three methods showed severity index 46.06 , 46.38 and 45.75 per cent respectively. The study to investigate genetic of bacterial wilt resistance using six generations from a cross between Seeda Thip 1 (P_1) and CLN2026D (P_2) were attempted. The six generations *viz* P_1 ,P_2, F_1 , F_2 ,BC_1 and BC_2 were artificially inoculated by leaf cutting. The six generations were tested in a Randomized Complete Block Design with 2 replications in a glasshouse. Seeda Thip 1 showed 100.00 and 53.22 per cent diseased plants in replication 1 and 2 respectively. The variety CLN2026D showed 57.14 and 37.93 per cent of diseased plants in replication 1 and 2 respectively. Analysis of variance showed no significant difference in percentages of diseased plant between generations, neither in percentage nor in arcsine scale. . Thus the generation mean analysis was not carried out.

คำนำ

มะเขือเทศเป็นพืชผักที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถนำมาบริโภคได้หลายรูปแบบ และสามารถปลูกได้ทั่วทุกท้องที่ แต่การปลูกมะเขือเทศ มักประสบปัญหาการรบกวนจากโรคและแมลง ศัตรู โดยเฉพาะในท้องที่ภาคใต้ ซึ่งมีอากาศชุ่มชื้น หนึ่งในโรคที่เป็นปัญหาสำคัญในการปลูกมะเขือเทศคือ โรค เหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith.) เชื้อนี้เข้าทำลายพืชได้มากกว่า 250 ชนิด (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537) เป็นโรคที่ระบาดแพร่หลายและรวดเร็วพบทุกแห่งที่มีการปลูกมะเขือเทศ มะเขือเทศจะแสดงอาการเหี่ยวเฉา และตายทั้งต้นอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 วัน โรคนี้เกิดได้ทุกระยะการเจริญเติบโต (กรุง สีตะธนี, 2536) อัตราการอยู่รอดของพันธ์อ่อนแอ (L 390) ซึ่งปลูกทดสอบในประเทศต่างๆ คือ ญี่ปุ่น ไต้หวัน อินเดีย ฟิลิปปินส์ บราซิล และ สหรัฐอเมริกา มีค่าตั้งแต่ 0- 56.3 % (Wang *et al.* ,1996) ความเสียหายต่อผลผลิตมีในแหล่งที่มีการระบาดของโรคนี้มี รายงานว่า เกิดขึ้นได้ระหว่าง 15-75 % ของผลผลิตทั้งหมด (กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร และ นุชนารถ จงเลขา , 2542) มีการศึกษาการควบคุมโรคหลายวิธี เช่นการปลูกพืชหมุนเวียน ปลูกพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อนี้ และต้องใช้เวลาถึง 6 ปี (ศักดิ์ สุนทรสิงห์ ,2537) การใช้สารเคมีซึ่งจนถึงปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีที่เหมาะสม การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่ง อุรัจฉทา กสิกรรมไพบูลย์ (2536)รายงานว่า *Bacillus subtilis* , *B. licheniformis* , *Pseudomonas fluorescens* และ *Seratia marcescens* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ ส่วน กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร และ นุชนารถ จงเลขา (2542) พบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 ชนิด คือ *B. cereus* , *P. putida* และ *P. aeruginosa* และ เมื่อทดสอบในแปลงพบว่า ระดับการเกิดโรคไม่ต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้จุลินทรีย์ การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาหรือลดความเสียหายจากโรคนี้ ซึ่งจากการวิจัยในประเทศไทย ยังไม่พบว่ามีพันธุ์การค้าที่มีความต้านทานต่อโรคนี้ (มณีฉัตร นิกรพันธุ์, 2542) แต่จะพบว่าพันธุ์บางพันธุ์จาก AVRDC มีความต้านทานต่อโรคนี้ เช่นพันธุ์ CLN 2116B, CLN 2026 D และพันธุ์ CL5915-223D4-2-1-0 เป็นต้น

การวิจัยที่รายงานฉบับนี้ มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ในคู่ผสมระหว่าง สีดาทิพย์ 1 X CLN 2026D โดยศึกษาจาก ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น 6 ชั่วรุ่น ที่ประกอบด้วย พันธุ์ พ่อ-แม่ (P_1 , P_2)ลูกผสม ชั่วที่1 และ ลูกผสมชั่วที่ 2 (F_1, F_2) ลูกผสมกลับสู่ พ่อ แม่ (BC_1 ,BC_2)

การตรวจเอกสาร

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และ ศักดิ์ สุนทรสิงห์ (2538) ได้ทำการทดสอบพันธุ์ต้านทานของมะเขือเทศต่อเชื้อ *R solanacearum* โดยใช้เชื้อไอโซเลท จากจังหวัดนครปฐม พบว่าพันธุ์ที่ต้านทาน คือ CL 5915-233D4-2-1-0 ค่อนข้างต้านทานได้แก่ CL 184 และ CL5915-206D4-2-5-0 ค่อนข้างอ่อนแอ ได้แก่ สีดาทิพย์ 2 , CL153 , P502 และ VF 134-1-2 และ เมื่อทดลองโดยใช้เชื้อไอโซเลทจากหนองคาย และใช้พันธุ์ที่แตกต่างจากชุดแรก มีเพียง 2 พันธุ์ที่เหมือนกับชุดแรกคือ CL5915-233D4-2-1-0 และ P502 พบว่าพันธุ์ CL 5915-233D4-2-1-0 ค่อนข้างต้านทาน CL 80 ค่อนข้างอ่อนแอ ส่วน CL110, CL 115 , CL116 , CL 159 , CL 162 , P502 , Early Pink , และ 3-31 A-B2 อ่อนแอ

การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคนี้มีรายงานในสายพันธุ์ LA1421 โดย Mohamed *et al*. (1997) เขาพบว่ามีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น ใน คู่ผสม LA 1421 x Cascade และระหว่างคู่ผสม LA 1421 X Caraibo เขาได้รายงานว่า กลไกการถ่ายทอดทางพันธุกรรมความต้านทานในพันธุ์ LA 1421 อาจเกี่ยวกับอิทธิพลของยีนต่างตำแหน่งมีผลร่วมกันแบบ duplicate epistasis การทดสอบทำในสภาพแปลงทดลองที่มีการสะสมเชื้อโดยการไถกลบต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อไว้ก่อนหน้า แล้วจึงนำต้นพืชที่ทดสอบย้ายลงปลูกในเวลาต่อมา และข้อมูลที่บันทึกคือ จำนวนวันที่ทำให้ต้นพืชเกิดอาการเหี่ยว

การวิเคราะห์ ไดอัลเลล เพื่อศึกษาพันธุกรรมของความทนทานต่อโรคเหี่ยวในมะเขือเทศในต่างประเทศ มีรายงานโดย Hanson *et al.*(1998)ได้ศึกษาว่าการผสมระหว่างพ่อ-แม่ ที่ ต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่มีแหล่งความต้านทานต่างกัน จะทำให้ความต้านทานต่อโรคในชั่วลูกมีสูงขึ้นหรือไม่ เขาใช้พันธุ์ที่มีแหล่งความต้านทานต่างกัน 5 พันธุ์ คือ CL5915 , L285 , CRA84 ,H7997 และ GA219 และ พันธุ์ที่ อ่อนแอต่อโรค 1 พันธุ์ คือ UC204A การทดสอบ พันธุ์ พ่อ แม่ ร่วมกับลูกในชั่วรุ่น F_1 และชั่วรุ่น F_2 ทดสอบในสภาพเรือนเพาะชำ ใน ใต้หวัน ฟิลิปปินส์ และ อินโดนีเซีย ความต้านทานวัดด้วย เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด หลัง 6 สัปดาห์ นับจากที่ได้รับเชื้อที่ใช้ราดลงในดิน ผลการทดสอบพบว่า ลูก F_1 จากพ่อ-แม่ ที่มีความต้านทานต่างแหล่งกัน ไม่ได้มีความต้านทานที่สูงขึ้นกว่าพ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษา พบว่า ค่าความแปรปรวนที่มีสาเหตุจาก สมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (General Combining Ability variance) มีค่าสูง ชี้ว่า การผสมระหว่างพ่อ-แม่ ที่มีสมรรถนะการรวมตัวทั่วไปสูง เช่น พันธุ์ H7997 , CRA84 หรือพันธุ์ L285แล้วทำการคัดเลือกในชั่วรุ่นที่2 และคัดเลือกต่อไป จะได้สายพันธุ์แท้ที่มีความต้านทานสูงกว่าพ่อ-แม่

Monma *et al*. (1997) รายงานว่า ความต้านทานต่อโรคเหี่ยวของ มะเขือเทศ เป็นลักษณะด้อย โดยลูก F_1 จะมีดัชนีความต้านทาน อยู่ระหว่าง พ่อ กับ แม่ แต่ค่อนไปในทางพ่อแม่ข้างที่อ่อนแอ (มีค่าดัชนีความต้านทานต่ำกว่า) โดยเขาศึกษา ใน การผสมระหว่าง พ่อ –แม่ คือ D9 X TPL-5 และ TPL-5 X Hawaii 7998

ในประเทศไทย การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่ศึกษาโดย บุปผา (2538) โดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น 6 ชั่วรุ่น พบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทาน เป็นยีนที่แสดงผลแบบบวก ใน 1 คู่ ผสมคือ สีดาทิพย์ 2 x CL 143-0-10-3-0-1-10 , ในคู่ผสมระหว่าง สีดาทิพย์ 2 x BL 342 และ Early pink X CL 143-0-10-3-0-1-10 พบว่าอิทธิพลของยีนเป็นแบบบวก ร่วมกับอิทธิพลของยีนแบบ epistasis ชนิด ข่ม X ข่ม ส่วนคู่ผสม Early Pink X BL 342 มีการแสดงออกของยีนทั้งแบบ บวก แบบข่ม และ อิทธิพลของยีนแบบ epistasis ชนิด บวก X บวก ซึ่ง จะเห็นได้ว่า ยีนควบคุม ลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยว จะมีกลไกการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ซับซ้อน

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การทดลองเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยว

การแยกเชื้อสาเหตุและทดสอบหาสายพันธุ์ที่รุนแรง

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย จำนวน 3 แหล่ง ดังนี้ อ. หาดใหญ่ อ.บางเหรียง อ.บางกล่ำ จ.สงขลา จำนวน 8 ตัวอย่าง ทดสอบว่าเกิดจากแบคทีเรียหรือไม่โดยการตัดส่วนของโคนต้นและแช่ในน้ำสะอาด หากตัวอย่างโรคนั้นเกิดจากเชื้อแบคทีเรียจะปรากฏกลุ่มของแบคทีเรียเคลื่อนที่เป็นสายในน้ำที่แช่นั้นในเวลา 1-5 นาที บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเหี่ยวมาล้างบริเวณโคนต้นและรากให้สะอาดทำความสะอาดผิวด้วย alcohol 70% ตัดโคนต้นตามขวางยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ในหลอดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้สักครู่จะปรากฏ bacterial exudate เป็นของเหลวสีขาวขุ่นไหลออกมาจากชิ้นส่วนพืช ใช้ลูปแตะน้ำแขวนลอยแบคทีเรีย สตรีคบนอาหาร Potato synthetic agar (PSA) ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีสีขาว

ลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ผิวหน้าโค้งนูนเป็นมัน โดยใน 1 ตัวอย่างพืชจะเลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ 2-3 โคโลนีได้เชื้อจำนวน 17 ไอโซเลท

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

การเตรียมพืช เตรียมต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 อายุ 30 วัน จำนวน 100 ต้น ปลูกในกระถางพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร ภายในเรือนกระจก

การเตรียมเชื้อ เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 17 ไอโซเลท ที่แยกได้ย้ายเลี้ยงในอาหาร PSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ 0.5 McFarland และเนื่องจากผู้วิจัยมีเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว *R. solanacearum* ที่เก็บรักษาไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 จึงได้คัดเลือกและนำมาร่วมทดสอบความสามารถและรุนแรงในการทำให้เกิดโรคใหม่ โดยปกติเชื้อที่ผ่านการย้ายเลี้ยงหลาย ๆ ครั้ง และเก็บรักษาไว้ ความสามารถในการก่อโรคอาจลดลงหรือหายไป โดยเฉพาะเชื้อ *R. solanacearum* สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคค่อนข้างมาก คัดเลือกได้เชื้อจำนวน 41 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากพืชอาศัย 9 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มะเขือยาว พริกขี้หนู พริกหนุ่ม มันฝรั่ง ดาวกระจาย ขิง และงา ที่เก็บไว้ในอาหาร NA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 3 ครั้ง ใน อาหาร PSA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ จากนั้นเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ 0.5 McFarland

การปลูกเชื้อ ทำการปลูกเชื้อโดยการตัดใบ (leaf cutting) โดยนำกรรไกรจุ่มในแบคทีเรียแขวนลอย แล้วตัดใบเริ่มจากใบที่ 3 นับจากยอดลงมาต้นละ 4 ใบ ทำการทดลองไอโซเลทละ 2 ต้น ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรียแขวนลอย

การตรวจผล หลังจากนั้นตรวจผลภายใน 7-10 วัน และประเมินความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Winstead และ Kelman (1952) โดยคำนวณดัชนีการเกิดโรคเหี่ยว
การแสดงออกของโรคเหี่ยวแบ่งเป็น 6 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว
1 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 1-2 ใบ
2 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 3-4 ใบ
3 = ยอดเริ่มแสดงอาการเหี่ยว
4 = ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น
5 = ต้นเหี่ยวและแห้งตาย

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ x100}}{\text{จำนวนต้น x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}}$$

และจากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่า เชื้อที่ได้จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ใหม่ จำนวน 17 ไอโซเลท สามารถทำให้เกิดโรคในระดับ 3-4 ส่วนเชื้อที่คัดเลือกจากการเก็บรักษา จำนวน 41 ไอโซเลท มีเพียง 3 ไอโซเลท ที่ทำให้เกิดโรคระดับ 4 ส่วนที่เหลือบางไอโซเลทไม่ทำให้เกิดโรค และทำให้เกิดโรคในระดับ 2 จึงคัดเชื้อส่วนนี้ออกไป และทำการแยกเชื้อใหม่ (re-isolate) จากมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคระดับ 4 จำนวน 20 ต้น พบว่าได้เชื้อชนิดเดิม จึงใช้ในการศึกษาต่อไป

2) การคัดเลือกวิธีการปลูกเชื้อและความรุนแรงในการเกิดโรค

เป็นการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาพันธุกรรมต่อไป วางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design in Randomized Complete Block มี 4 ซ้ำ และมี วิธีการในการปลูกเชื้อมี 3 วิธี คือ clipping technique, stem inoculation technique และ micropipette technique จัด เป็น Main plot และให้เชื้อไอโซเลทต่างกัน 20 ไอโซเลท กับ ชุดควบคุม คือการปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่น เป็น Sub plot ใช้ต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน 3 ต้น ต่อ 1 sub- plot ต่อ ซ้ำ

การเตรียมพืช เตรียมต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 อายุ 30 วัน จำนวน 300 ต้น

การเตรียมเชื้อ เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองก่อนหน้านี้ จำนวน 20 ไอโซเลท โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายเลี้ยงต่อใน Nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที นำเชื้อที่ได้มาปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 108 หน่วย โคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ 0.5 McFarland

วิธีการปลูกเชื้อ ใช้วิธีการปลูกเชื้อ 3 วิธี

Cliping technique โดยใช้มีดผ่าตัด ตัดก้านใบห่างจากลำต้น 0.5 เซนติเมตร เริ่มตัดจากใบ ที่ 3 นับจากยอดลงมา หยดแบคทีเรียแขวนลอยลงบนแผลทันที ใช้เชื้อ 10 ไมโครลิตรต่อก้าน ทำการทดลองไอโซเลทละ 4 ต้น

Stem inoculation technique ใช้เข็ม 5 เล่มมัดเป็นกลุ่มจิ้มทำแผลที่เหนือซอกตาของใบที่ 3 นับจากยอด หยดแบคทีเรียแขวนลอยลงบนแผลใช้เชื้อละ 10 ไมโครลิตรต่อต้น

Micropipette technique ใช้ micropipette tip ขนาด 10 ไมโครลิตร ดูดแบคทีเรียแขวนลอยแล้วปักลงในต้นที่ตำแหน่งเหนือซอกตาของใบที่ 3 ปลด micropipette tip ที่มีแบคทีเรียแขวนลอยที่เสียบคาไว้ ปล่อยให้พืชดูดซึมเข้าไปเองจนหมด ซึ่งใช้เวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง จากนั้น จึงดึง micropipette tip ออก

3) การปลูกทดสอบเพื่อดูลักษณะเบื้องต้น ของพันธุ์มะเขือเทศจาก AVRDC

สายพันธุ์มะเขือเทศที่ทดสอบ ได้แก่

1) CL 5915-153 D4 –3-3-0
2) CL 5915 – 206 D4-2-5-0
3) CL5915 – 22304-2-1-0
4) CLN 2116B
5) CLN294BC1F2-31-18
6) CLN294BC1F2-2-6-0

พันธุ์และสายพันธุ์ต่างๆที่กล่าวนี้ได้ปลูกทดสอบในสภาพเรือนกระจก ที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ ใน ช่วง เดือน พ.ย. 2548 ร่วมกับพันธุ์ สีดาทิพย์ 4 ของประเทศไทย พืชที่ปลูกออกดอก ติดผล ประมาณเดือน ก.พ. 2549 เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตโดยทั่วไป ไม่มีการใช้แผนการทดลองหรือ จัดให้มีซ้ำ ได้บันทึกภาพ ของต้นและผล ในระหว่างการเจริญเติบโต ดังภาพในผนวกภาพที่ 26-34

4) การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น

การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยชั่วรุ่น (generation mean analysis) ซึ่งเป็นวิธีการที่เสนอโดย Hayman (1958) วิธีการโดยย่อคือ การสร้างประชากรชั่วรุ่นต่างๆ จาก การผสมระหว่างพันธุ์ 2 พันธุ์ เรียกทั่วไปว่า เป็นพันธุ์ พ่อ –แม่ หรือ ชั่วรุ่น P_1 และ P_2 ชั่วรุ่นต่างๆที่เกิดจากการผสมระหว่าง P_1 และ P_2 คือ

F_1 เป็นชั่วรุ่นที่ 1 จากการผสมระหว่าง $P_1 X P_2$

F_2 เป็นชั่วรุ่นที่ 2 จากการผสมระหว่าง $P_1 X P_2$, เกิดจาก การผสมตัวเองของF_1

BC_1 เป็นลูกที่เกิดจากการผสมระหว่าง F_1 X P_1

และ BC_2 เป็นลูกที่เกิดจากการผสมระหว่าง F_1 X P_2

นำประชากรทั้ง 4 ชั่วรุ่น รวมทั้งพันธุ์พ่อ แม่ รวม 6 ชั่วรุ่น มาปลูก พร้อมกัน การปลูกทดสอบทั้ง 6 ชั่วรุ่นจะปลูกในกระถางและจัดวางไว้ในโรงเรือน ขนาดของหน่วยทดลองจะแตกต่างกันระหว่าง

ชั่วรุ่นกล่าวคือ ชั่วรุ่น P_1 , P_2 , F_1 ใช้ประมาณ20 ต้นต่อซ้ำ BC_1 และ BC_2 ใช้ประมาณ 20 ต้น ต่อซ้ำ และ F_2 ใช้ประมาณ 100 ต้น ต่อ ซ้ำ

พันธุ์ที่จะใช้เป็นพันธุ์แม่ (P_1) คือพันธุ์ที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมภาคใต้ ได้ดีและมีคุณสมบัติตรงกับความต้องการของตลาด ในการวิจัยนี้ใช้ พันธุ์ สีดาทิพย์ 1

ส่วนพันธุ์ที่จะใช้เป็นพันธุ์พ่อ(P_2) จะเลือกพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรค เหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย คือ พันธุ์ CLN2026 D ข้อมูลที่ได้จากการปลูกทดสอบ 6 ชั่วรุ่น ของแต่ละคู่ผสม จะต้องนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อทดสอบว่ามีความแตกต่างระหว่างชั่วรุ่น หรือไม่ โดยใช้ F- test เมื่อพบว่าลักษณะที่ศึกษามี ความแตกต่างระหว่างชั่วรุ่น ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น (Generation Mean Analysis)

ตามโมเดลที่เสนอโดย Hayman (1958) ค่าเฉลี่ยของแต่ละชั่วรุ่นสามารถคาดหมายหรืออธิบายได้ด้วย ค่าพารามิเตอร์ เพียง 6 ค่า คือ m , [d] , [h] , [i] , [j] และ [l] โดย

m : mean ; ซึ่งคือค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น F2

[d] : additive

[h] : dominance

[i] : additive x additive interaction

[j] : additive x dominance interaction

[l] : dominance X dominance interaction

ถ้าความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเป็นผลที่เกิดจากอิทธิพลของยีนหลายๆตำแหน่ง เราสามารถคาดหมายค่าที่จะวัดได้ ในแต่ละชั่วรุ่น จาก สมการ ที่มี เพียง 3 พารามิเตอร์ หากยีน ต่างตำแหน่งไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ดังนี้

$P_1 = m + d –(½)[h]$

$P_2 = m – d –(½)[h]$

$F_1 = m + (½)[h]$

$F_2 = m$

$BC_1 = m + (½)[d]$

$BC_2 = m - (½)[d]$

และหากมี ปฏิสัมพันธ์ ระหว่างยีนที่อยู่ ต่างตำแหน่งกัน (digenic interaction) ค่าคาดหมายของ 6 ชั่วรุ่นที่กล่าว จะมีค่าคาดหมาย ที่ขึ้นอยู่กับ 6 พารามิเตอร์

$P_1 = m + d –(½)[h] + [i] – [j] + (¼)[l]$

$P_2 = m – d –(½)[h] + [i] + [j] + (¼)[l]$

$F_1 = m + (½)[h] + (¼)[l]$

$F_2 = m$

$BC_1 = m + (½)[d] + (¼)[i]$

$BC_2 = m - (½)[d] + (¼)[i]$

ในการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น มักใช้เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีนที่ควบคุมลักษณะการเกิดโรคต่างๆในพืช ซึ่งจะเลือกเอาพันธุ์ พ่อ - แม่ที่แตกต่างกัน อย่างชัดเจน มาผสมกัน และสร้างชั่วรุ่นต่างๆ ขึ้นมา 6 ชั่วรุ่น หรือ มากกว่า 6 ชั่วรุ่น แล้วจึงประมาณหาค่า พารามิเตอร์ของโมเดล ในการวิเคราะห์ จำเป็นจะต้องตรวจสอบว่า ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่นมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เสียก่อน จึงจะ วิเคราะห์ ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่นได้

ผลการทดลอง

1)การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

จากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่า เชื้อที่ได้จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ใหม่จำนวน 17 ไอโซเลท สามารถทำให้เกิดโรคในระดับ 3-4 ส่วนเชื้อที่คัดเลือกจากการเก็บรักษาจำนวน 41 ไอโซเลท มีเพียง 3 ไอโซเลท ที่ทำให้เกิดโรคระดับ 4 ส่วนที่เหลือบางไอโซเลทไม่ทำให้เกิดโรค และทำให้เกิดโรคในระดับ 2 จึงคัดเชื้อส่วนนี้ออกไป และทำการแยกเชื้อใหม่ (re-isolate) จากมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคระดับ 4 จำนวน 20 ต้น พบว่าได้เชื้อชนิดเดิม จึงใช้ในการศึกษา ต่อไป

2)การคัดเลือกวิธีการปลูกเชื้อและความรุนแรงในการเกิดโรค

ผลและวิเคราะห์อิทธิพลของวิธีการใส่เชื้อกับชนิดของเชื้อไอโซเลทต่างๆที่แยกมาจากกระเพรา มะเขือเทศ และ พริกชี้ฟ้า ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 จากผลการทดลอง พบว่า บลอก (block) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วิธีการปลูกเชื้อ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่เชื้อทั้ง 20 ไอโซเลทรวมทั้งชุดควบคุม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง วิธีการกับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางผนวกที่ 1) ค่า ดัชนีการเกิดโรคอยู่ ระหว่าง 20-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ ใส่เชื้อด้วยวิธี ตัดใบ และฉีดด้วยไมโครปิเป็ต และ จะมีดัชนีการเกิดโรคระหว่าง 20 -90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้วิธี ใส่เชื้อที่ต้น ผลของไอโซเลทที่ใส่ให้พืช พบว่าไอโซเลทที่ 15 (KP 02) เป็นไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุด โดยมีระดับการเกิด โรค 83.75 เปอร์เซนต์เมื่อใช้วิธีตัดใบและเมื่อใส่เชื้อที่ต้น หากใช้ไมโครปิเปต จะทำให้เกิดโรคได้สูงถึง 88.75 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ในการทดสอบกับพันธุ์ในชั่วรุ่นต่างๆ จึงเลือกใช้ เชื้อ ไอโซเลทนี้ และ เลือกใช้วิธีการ ตัดใบ เพราะทำได้รวดเร็วกว่า โดยที่ให้ผลดี เท่ากับวิธีการอื่นๆ

ตารางที่ 1 ดัชนีการเกิดโรคเหี่ยว(%) เมื่อมีการใช้วิธีการใส่เชื้อต่างกัน และ ใช้ไอโซเลทของเชื้อต่างๆ 20 ไอโซเลท

ไอโซเลท	วิธีการใส่เชื้อ			เฉลี่ย (%)
	Leaf Clipping	Micropipette Injection	Stem Inoculation	
1	42.5	42.5	50.0	45.0
2	53.75	56.25	48.75	52.92
3	55.0	42.5	55.0	50.83
4	20.0	23.75	22.5	22.08
5	20.0	20.0	20.0	20.00
6	20.0	20.0	20.0	20.00
7	62.5	70.0	66.25	66.25
8	75.0	76.25	78.75	76.67
9	72.5	77.5	85.0	78.33
10	20.0	20.0	20.0	20.00
11	38.75	41.25	25.0	35.00
12	20.0	21.25	20.0	22.08
13	41.25	41.25	35.0	39.17
14	40.0	41.25	52.5	44.58
15	83.75	88.75	83.75	85.42
16	82.5	87.50	77.5	82.5
17	40.0	21.25	26.25	29.17
18	42.5	38.75	36.25	39.17
19	50.0	53.75	57.5	53.75
20	41.25	43.75	35.0	40.0
ชุดควบคุม	0.0	0.0	0.0	0.0
เฉลี่ย (%)	43.87	44.17	43.57	43.95
เฉลี่ยไม่รวมชุดควบคุม	46.06	46.38	45.75	46.15

3) การปลูกทดสอบเพื่อดูลักษณะเบื้องต้น ของพันธุ์มะเขือเทศจาก AVRDC

พันธุ์และสายพันธุ์ต่างๆจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ปลูกทดสอบในสภาพเรือนกระจก ที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ ใน ช่วง เดือน พ.ย. 2548 ร่วมกับพันธุ์ สีดาทิพย์ 4 ของประเทศไทย พืชที่ปลูกออกดอก ติดผลประมาณเดือน ก.พ. 2549 เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตโดยทั่วไป ได้บันทึกภาพ ของต้นและผล ในระหว่างการเจริญเติบโต ดังภาพในผนวกภาพที่ 23-34

4) การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น

เมื่อวิเคราะห์ ลักษณะ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ที่คิดจากสัดส่วนต้นที่เป็นโรค ต่อต้นทั้งหมด และคูณด้วย 100 ผลการวิเคราะห์ จากข้อมูล 2 ซ้ำ โดยใช้ แผนการวิเคราะห์ แบบ Randomized Complete Block Design การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) เฉพาะ6 ชั่วรุ่น ในคู่ผสม ระหว่าง สีดาทิพย์ 1 กับ CLN2026D (ไม่รวมพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 ในการวิเคราะห์) พบว่า มีความแตกต่างระหว่าง บลอก (Block) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีความแตกต่าง ระหว่างชั่วรุ่น (ตารางผนวกที่ 2) เมื่อ ได้แปลงข้อมูล เพื่อให้ข้อมูลซึ่งเป็นค่า เปอร์เซ็นต์ เป็นค่า อาร์คซายน์ ผลการ วิเคราะห์ ความแปรปรวน ก็ให้ผลอย่างเดิม (ตารางผนวก ที่ 3) เนื่องจากไม่มีความแตกต่างระหว่างชั่วรุ่น จึงไม่ทำการวิเคราะห์ผลของยีน โดยวิธีการของ Hayman (1958) ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในชั่วรุ่นต่างๆ ได้แสดงไว้ในตาราง ที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น ในลักษณะ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%) แสดงข้อมูลแต่ละซ้ำ และใช้พันธุ์ สีดาทิพย์ 3 เป็นพันธุ์ ตรวจสอบ ในทั้งสองซ้ำ

Generation	Diseased plants (%)		
	Block1	Block2	Mean
P_1(SD1)	100.0	53.22	76.61
P_2(CLN2026D)	57.14	37.93	47.54
F_1	71.73	5.36	42.68
F_2	85.71	4.38	45.05
BC_1	96.29	25.86	61.08
BC_2	100.0	13.64	56.82
Control (SD3)	100.0	100.00	100.00

อภิปรายผลการทดลอง

ในการทดสอบการเกิดโรคกับชั่วรุ่นต่างๆ 6 ชั่วรุ่น ในแต่ละซ้ำของการทดลองจะเห็นว่า มีการตอบสนองต่อการปลูกเชื้อต่างกัน ในซ้ำที่ 1 การเกิดโรคมีความรุนแรงมากที่สุดกับพันธุ์สีดาทิพย์ 1 ซึ่ง มีการเกิดโรคในอัตราที่สูงกว่า พันธุ์ CLN2026D โดย ชั่วรุ่น F_1 จะมีการเกิดโรคอยู่ระหว่าง พันธุ์ พ่อ –แม่ ค่อนไปทางพันธุ์ CLN2026D เล็กน้อยในขณะที่ F_2 มีความรุนแรงในการเกิดโรคมากกว่า F_1 ทำนองเดียวกัน BC_1 และ BC_2 แสดงการเกิดโรค ที่สูงใกล้เคียงกับพันธุ์ สีดาทิพย์ 1 ในซ้ำที่ 2 สีดาทิพย์ 1 และ CLN2026D ต่างก็เกิดโรคน้อยลง โดยที่สีดาทิพย์ 1 ยังคงเกิดโรคสูงกว่า CLN2026D ในขณะที่ F1 และF2 มีอัตราการเกิดโรคที่ค่อนข้างต่ำ BC_1 และ BC_2 ต่างก็เกิดโรคน้อยลง กว่าซ้ำที่ 1 เวลาในการทดสอบเชื้อ ทั้งสองซ้ำ เป็นเวลาที่แตกต่างกัน แต่ใช้ต้นพืชที่มีอายุเท่าๆกัน ซ้ำที่ 1 ทดสอบในเดือน กุมภาพันธ์ 2553 ซึ่งอากาศจะมีความชื้นน้อย แต่ ได้ปลูกเชื้อให้กับต้นพืชในเรือนพลาสติกใสที่ล้อมรอบต้นพืชที่ทดสอบ และ มีการฉีดพ่นด้วยน้ำสะอาดเพื่อให้มีสภาพความชื้นสูงในเรือนทดสอบ ใน การทดสอบซ้ำแรกนี้ สีดาทิพย์3 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ ตรวจสอบ จะมีอัตราการเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบอีกด้านหนึ่งก็คือการใช้พืชในแต่ละชั่วรุ่น ทดสอบกับน้ำเปล่าแทนการใส่เชื้อ พบว่า ต้นพืชในชั่วรุ่นต่างๆ ที่ใส่น้ำเปล่าแทนเชื้อ จะไม่เป็นโรค แสดงว่า สภาพแวดล้อม เหมาะสมพอควรสำหรับการเกิดโรค ในการทดสอบซ้ำที่2 ทำการปลูกเชื้อให้กับพืชในเดือน มิถุนายน 2553 ในสภาพโรงเรือนที่คลุมมิดชิดด้วยพลาสติกใส และฉีดพ่นน้ำในโรงเรือนเช้าและบ่ายเพื่อให้ภายในโรงเรือนทดสอบมีสภาพความชื้นสูง ในการทดสอบซ้ำที่สองนี้ พันธุ์ สีดาทิพย์ 3 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ ตรวจสอบ มีอัตราการเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์และ การตรวจสอบต้นพืชที่ใส่น้ำเปล่าแทนการปลูกเชื้อก็ไม่เกิดโรค แสดงว่าสภาพการทดสอบเหมาะสมดี เช่นเดียวกับซ้ำที่ 1 ในทั้งสองซ้ำ ค่า อุณหภูมิ ในโรงเรือนที่ทดสอบ จะมีค่าอุณหภูมิ สูงสุด ที่ 36 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิต่ำสุดที่ 26 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าจะพยายามควบคุมสภาพแวดล้อมของการทดสอบ ให้ใกล้เคียงมากเพียงใด ความแตกต่าง ระหว่างซ้ำทั้งสอง ก็เกิดอย่างชัดเจน การวิเคราะห์จึงเลือกที่จะวิเคราะห์โดยให้ ซ้ำเป็นบล็อก หรือ วิเคราะห์ในแผนการทดลองแบบ สุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) ซึ่งผลของการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างระหว่างบลอก (ซ้ำ) แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่าง ชั่วรุ่น และเนื่องจากข้อมูลที่วัดเป็นค่าที่วัดเป็นเปอร์เซ็นต์ ที่เกิดจากการคำนวณมาจากสัดส่วนต้นพืชที่เป็นโรค ข้อมูลชนิดนี้ มักจะมีปัญหาจาก การที่ ค่าความแปรปรวนของแต่ละทรีตเมนต์ ไม่เท่ากัน หรือ ข้อมูลไม่มีการกระจายแบบปกติ ซึ่งเป็นข้อตกลงพื้นฐานเบื้องต้นในการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อตรวจสอบความแตกต่าง ด้วยเหตุนี้ จึงได้แปลงข้อมูล เป็นค่า อาร์คซายน์ ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ ซึ่ง ยังไม่พบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่นเช่นเดียวกับข้อมูลที่ไม่ได้แปลง ปัญหาที่พบในการทดลองครั้งนี้คือ เกิดปฏิสัมพันธ์ ระหว่าง ชั่วรุ่น กับ บล็อก สูง

ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ การมีจำนวนบล็อกน้อย เพียง 2 บล็อก ยังผลให้ค่าความคลาดเคลื่อนในการทดลองค่อนข้างสูง การเกิดปฏิสัมพันธ์ ระหว่างพันธุ์ และสภาพแวดล้อม ในลักษณะเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวนี้ ได้เคยมีรายงานโดย Hanson *et al.*(1998) ซึ่งพบว่าสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุณหภูมิ จะมีผลต่อการเกิดโรคเหี่ยว ในขณะที่ Mew and Ho (1976) รายงานไว้ก่อนนี้ว่า การเกิดโรครุนแรงต่างกันเนื่องจาก วิธีการในการปลูกเชื้อ หรือ เนื่องจาก ความเข้มข้นของเชื้อ และ ที่รายงานโดย Krausz and Thurston (1975) ที่รายงานว่า อุณหภูมิและความยาวของเวลากลางวัน จะมีผลต่อการเกิดโรค

Falconer (1981) เรียกลักษณะที่ สามารถแยกแยะออกได้เป็น 2 กลุ่ม เช่นการเกิดโรค และการไม่เกิดโรค แต่มีสัดส่วนของการแสดงออกที่วัดได้เป็นค่าเปอร์เซ็นต์ ว่าเป็น Threshold character ซึ่ง ค่าที่เราวัดเป็นเปอร์เซ็นต์ มักจะไม่เหมาะต่อการนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์ปริมาณ เนื่องจาก ในการวิเคราะห์จะมีเงื่อนไข และข้อกำหนดอยู่มาก ที่อาจจะไม่สอดคล้องกับข้อมูล เขาแนะนำว่าหาก มีค่าที่วัดเป็นตัวแปรต่อเนื่องในทางใดทางหนึ่งที่สะท้อนให้เห็นถึงความต้านทานหรือความอ่อนแอ เช่น ระยะเวลาที่พืชยังไม่เกิดอาการ (time of survival) หรือสามารถวัดระดับความรุนแรงของอาการได้ เป็นระดับคะแนน จะทำให้ การศึกษาด้วยพันธุศาสตร์ปริมาณมีความเหมาะสมมากขึ้น ในการทดลองนี้ การเกิดโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วภายใต้สภาพปลูกเชื้อ พืชจะเหี่ยวตายภายใน 2-3 วัน จึง ไม่ได้วัดเป็นระดับความรุนแรง และด้วยเหตุที่มีจำนวนต้นพืชในแต่ละ ชั่วรุ่นเป็นจำนวนมาก การให้ คะแนนการเกิดโรค จึง ไม่สะดวกในทางปฏิบัติ Monma *et al.* (1997) ได้ศึกษาความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย โดยทดสอบในสภาพแปลงโดยให้มีการเพิ่มจำนวนเชื้อในดินโดยการราดน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียลงในดิน และวัดความต้านทานของพืชจาก จำนวนวันที่พืชอยู่รอด และ คะแนนความต้านทาน เขารายงานว่า F_1 มีค่าความต้านทาน ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อ-แม่ ลักษณะความต้านทานจึงเป็นลักษณะด้อย หรือทิศทางของการข่มไปในด้านพ่อ-แม่ที่อ่อนแอ และรายงานว่าการคัดเลือกลูกในชั่วรุ่นF_2 จะ ได้ลูกที่มีความต้านทานสูงขึ้น

สรุป

จากการวิจัยที่ได้ดำเนินมา ได้พบว่า เชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับมะเขือเทศ โดยพบความรุนแรงในการเกิดโรคกับพืชในชั่วรุ่นต่างๆ ระหว่าง 4.38 - 100.00 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความแปรปรวนระหว่างบลอก ซึ่งมีสาเหตุอิทธิพลของสภาพแวดล้อมแฝงอยู่ด้วยมีค่าสูง ทำให้ไม่อาจตรวจพบความแตกต่างระหว่างพืชในชั่วรุ่นต่างๆได้ ดังนั้นจึงไม่อาจศึกษาอิทธิพลของยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้ อย่างไรก็ดี ลักษณะการเกิดโรค จะมี คุณลักษณะเป็นแบบ Threshold Character กล่าวอย่างสรุปก็คือ เป็นลักษณะที่มีการแสดงออกชนิดที่เป็นลักษณะคุณภาพ (Qualitative characters) แต่มีความต่อเนื่องของค่าที่

แสดงออก เมื่อวัดเป็นสัดส่วน หรือเปอร์เซ็นต์ ลักษณะเช่นที่กล่าวนี้ จะยากต่อการวิเคราะห์ด้วยพันธุศาสตร์ไบโอเมตริก (Biometrical Genetics) ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า การ ปลูกเชื้อให้กับมะเขือเทศ ในระยะช่วงอายุ 30 วัน จะก่อให้เกิด โรคได้ดี และวิธีการปลูกเชื้อโดยวิธีการตัดใบ จะก่อให้เกิดโรค ได้ดี เท่ากับ วิธี ใช้เข็มฉีดยา และวิธีตัดต้นพืช ทั้ง สาม วิธีนี้ จะก่อให้เกิดโรคได้ 43.86 , 44.16 และ 43.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อ เฉลี่ย จากเชื้อ 20 ไอโซเลท และก่อให้เกิดโรคได้สูงถึง 83.75 , 88.75 และ 83.75เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้ไอโซเลทที่รุนแรงที่สุด คือ KP02 การเกิด โรค จะรวดเร็ว ภายใน 2-3 วัน หลังปลูกเชื้อ และพบว่า สภาพแวดล้อมมีผลต่อการ เกิดโรค เป็นอย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร และ นุชนารถ จงเลขา .2542. การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมะเขือเทศโดย ใช้เชื้อแบคทีเรียปรปักษ์ ใน: เอกสารเสนอในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 4. 27-29 ตุลาคม 2512. โรงแรม แอมบาสเดอร์ซิตี้ จอมเทียน. ชลบุรี

กรุง สีตะธนี. 2536. การผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ. ใน : การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก. เอกสารเผยแพร่โครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์ผักภายใต้ความช่วยเหลือจาก FAO/ DANIDA .กองขยายพันธุ์พืช. กรมส่งเสริมการเกษตร.

บุปผา คงสมัย 2538. การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวจากบักเตรีในมะเขือเทศ.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณีฉัตร นิกรพันธุ์ .2542. การผลิตเมล็ดพันธุ์ผักลูกผสม. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 132 หน้า.

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และ ศักดิ์ สุนทรสิงห์ .2538. การทดสอบพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 29: 435-444.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์ .2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุรัจฉทา กสิกรรมไพบูลย์. 2534. ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากและดินปลูกมะเขือเทศในการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Falconer, D.S. 1981. Introduction to Quantitative Genetics. 2nd Edition. Longman Inc., New York.

Hanson, P.M., Wang , J.F., Licardo, O., Hanudin, Mah, S. Y., Hartman, G.L. ,Lin, Y.C. ,and Chen , J.T. 1996. Variable reaction of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. HortScience 31 :143-146.

Hanson, P.M. Licardo, O. H. Wang , J.F. and Chen , J.T. 1998. Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. Plant Disease 82:74-78.

Hayman, B.I. 1958. The separation of epistatic from additive and dominance variation in generation means. Heredity 12:371-390.

Krausz, J.P. and Thurston, H.D. 1975.Breakdown of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato.Phytopathology 65:1272-1274.

Mohamed, M.E. Umaharan, P. and Phelps, R.H. 1997. Genetic nature of bacterial wilt resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) accession LA1421. Euphytica 96:323326.

Mew ,T.W. and Ho, W.C. 1976. Varietal resistance to bacterial wilt in tomato.Plant Disease Report 60:264-268.

Monma, S., Sakata , Y and Matsunaga, H. 1997. Inheritance and selection efficiency of bacterial wilt resistance in Tomato. JARQ 31:195-204.

Wang, J ,Hanson, P.M. and Barnes, J.A. 1996. World wide evaluation of international resistance sources to bacterial wilt in tomatoes: preliminary results. TVIS Newsletter.1: 10-13.

Winstead, N.N. and Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 42:628-634.

ตารางผนวก ที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ลักษณะ ดัชนีการเกิดโรค เมื่อ ใช้วิธีการปลูกเชื้อต่างกัน และ ใช้เชื้อไอโซเลทต่างๆ 20 ไอโซเลทร่วมกับ ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า)

SOV	Df	SS	MS	F
Block	3	71.7262	23.9087	0.53 ns
Methods	2	14.8810	7.4405	0.16 ns
Error(a)	6	273.2143	45.5357	
Isolates	20	134700.5952	6735.0298	172.91**
Methods X Isolates	40	3630.9524	90.7738	2.33**
Error(b)	180	7011.3095	38.9517	
Total	251	145702.6786		

: ns = not significant ($P > 0.05$) ; ** highly significant ($P \leq 0.01$)

C.V. .(a) = 15.38 %

C.V. .(b) = 14.23 %

ตารางผนวก ที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ลักษณะ การเป็นโรค ในหน่วย เปอร์เซ็นต์

SOV	df	SS	MS	F
Block	1	11954.29	11954.29	36.75**
Generation	5	1627.62	325.53	1.0ns
Error	5	1626.47	325.29	
Total	11	15208.39		

: ns = not significant ($P > 0.05$) ; ** = highly significant ($P \leq 0.01$)

C.V. = 32.82 %

ตารางผนวก ที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ลักษณะ การเป็นโรค ในหน่วย arcsine

SOV	df	SS	MS	F
Block	1	1.943	1.943	34.64**
Generation	5	0.410	0.082	1.46ns
Error	5	0.280	0.056	
Total	11	2.633		

: ns = not significant ($P > 0.05$) ; ** = highly significant ($P \leq 0.01$)

C.V. = 27.04 %

ภาคผนวก

ภาพผนวกที่ 1 มะเขือเทศชั่วรุ่นต่างๆ ในโรงเรือนทดสอบด้วยการปลูกเชื้อ โรงเรือนนี้ ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า (Control)

ภาพผนวกที่ 2 การทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อให้กับพืชในชั่วรุ่นต่างๆ การทดลองในซ้ำที่ 2 พืชจะถูกปลูกเชื้อด้วยวิธีตัดใบ

ภาพผนวกที่ 3 มะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ แสดงอาการเป็นโรค อย่างรุนแรง ในขณะที่ F2 ซึ่งอยู่ใกล้เคียง ไม่แสดง การเกิดโรค

ภาพผนวกที่ 4 ต้นมะเขือเทศที่เกิดโรค จะแยกออกมานับ และแยกออกจากกลุ่มที่ยังไม่เกิดโรค อาการเหี่ยวจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงไม่มีการให้คะแนนการเกิดโรค ภาพจากการทดสอบ ในซ้ำที่ 2

ภาพผนวกที่ 5 สีดาทิพย์ 3 ซึ่งอ่อนแอ อยู่ด้านหน้า และ F2 ซึ่งไม่แสดงการเกิดโรค จาก การทดสอบในซ้ำที่ 2

ภาพผนวกที่ 6 ต้นมะเขือเทศ ในชั่วรุ่นต่างๆ จะ วางใน โรงเรือนคลุมพลาสติก รวม 4 โรงเรือน โดย 1 โรงเรือน จะเป็น การปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า (ในภาพได้ถอดพลาสติกคลุมออกแล้ว หลังสิ้นสุดการนับต้นที่เป็นโรค)

ภาพผนวกที่ 7 พันธุ์ CLN2026D เกิดโรค น้อยกว่า พันธุ์ สีดาทิพย์ 1 และ สีดาทิพย์ 3 ภาพ จาก การทดสอบในซ้ำที่ 2

ภาพผนวกที่ 8 พันธุ์ สีดาทิพย์ 1 ที่ปลูกเชื้อ เริ่มแสดงอาการเกิดโรค

ภาพผนวกที่ 9 หลัง การนับครั้งสุดท้าย จะเห็นต้นที่อยู่รอด บางส่วน ทางซ้ายมือ เป็น ต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า ภาพการทดลองซ้ำที่ 2

ภาพผนวกที่ 10 ต้นมะเขือเทศที่ปลูก เพื่อ การผสมระหว่างพันธุ์ ผสมกลับ และ ผสมตัวเอง ภายในเรือนกระจก คณะทรัพยากรธรรมชาติ (9 พฤษภาคม 2551)

ภาพผนวกที่ 11 มะเขือเทศที่ปลูกในเดือน พฤษภาคม 2551 ในระยะ ออกดอก และติดผล

ภาพผนวกที่ 12 ผลมะเขือเทศจาก ต้น F1 คู่ผสม CLN2026D X สีดาทิพย์ 1

ภาพผนวกที่ 13 ผลของมะเขือเทศจากต้น F1 คู่ผสม CLN2026D X สีดาทิพย์ 3

ภาพผนวกที่ 14 ผลของมะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 เป็นผลที่เก็บรวมจากหลายต้น

ภาพผนวกที่ 15 ผลของสีดาทิพย์ 1 หลังเก็บเกี่ยว

ภาพผนวกที่ 16 อาการเป็นโรคที่เกิดขึ้นเองในพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ปลูกในเรือนกระจกโดย ไม่มีการปลูกเชื้อ

ภาพผนวกที่ 17และ 18 การทดสอบเชื้อพร้อมๆกัน 3 ซ้ำ ภาพต่อเนื่องส่วนหน้าและส่วนหลังของเรือนกระจก

ภาพผนวกที่ 19 การทดสอบเชื้อกับพืชในชั่วรุ่นต่างๆ 3 ซ้ำ 23 กรกฎาคม 2552

ภาพผนวกที่ 20 ต้นกล้าที่เพาะในถาดเพาะชำก่อนย้ายลงกระถางปลูก

ภาพผนวกที่ 21 ต้นกล้ามะเขือเทศที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ใหม่(re-isolation)

ภาพผนวก ที่ 22 มะเขือเทศพันธุ์ CLN2026D

ภาพผนวกที่ 23 มะเขือเทศ พันธุ์ สีดาทิพย์ 1

ภาพผนวกที่ 24 มะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 4 ปลูกเพื่อดูลักษณะทั่วๆไป

ภาพผนวกที่ 25 สภาพภายในเรือนกระจก ที่มีการปลูกทดสอบเบื้องต้นพันธุ์ ต่างๆ

ภาพผนวกที่ 26 มะเขือเทศพันธุ์ CL 5915-153 D4 –3-3-0

ภาพผนวกที่ 27 มะเขือเทศสายพันธุ์ CL 5915-223 D4-2-1-0

ภาพผนวกที่ 28 มะเขือเทศพันธุ์ CLN2026D

ภาพผนวกที่ 29 มะเขือเทศพันธุ์ CLN2116 B

ภาพผนวกที่ 30 มะเขือเทศพันธุ์ CL5915-206D4 2-5-0

ภาพผนวกที่ 31 มะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3

ภาพผนวกที่ 32 มะเขือเทศพันธุ์ CLN2026D

ภาพผนวกที่ 33 มะเขือเทศพันธุ์ CL5915-223 D4 2-1-0

ภาพผนวกที่ 34 มะเขือเทศพันธุ์ CL294 BC1 F2 31-18