ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงพันธุ์กุหลาบต้านทานโรคใบจุดดำจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ

ผู้เขียน นางสาวธัญลักษณ์ ปาลี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. ประสาทพร สมิตะมาน

บทคัดย่อ

กุหลาบ (*Rosa hybrida.*) เป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่ปลูกกระจายตามภาคต่าง ๆ ทั้งในประเทศและทั่วโลก สำหรับประเทศไทยมีการปลูกกุหลาบในหลายพื้นที่ แต่พบว่ายังไม่เพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ เนื่องจากขาดกุหลาบสายพันธุ์ดี รวมทั้งมีปัญหาการระบาดของโรคและแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบจุดดำ ที่เกิดจากเชื้อรา *Marssonina rosae.* (Perfect stage : *Diplocarpon rosae* Wolf.) ที่ทำให้คุณภาพของดอกตกต่ำลงได้มาก การป้องกันกำจัดโรคในปัจจุบันส่วนใหญ่ใช้วิธีพ่นสารเคมีเป็นหลัก จึงทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อสาเหตุ อีกทั้งเป็นมลพิษต่อเกษตรกร ดังนั้นในการพัฒนากุหลาบต้านทานต่อโรคใบจุดดำจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการลดมลพิษ จากการใช้สารเคมี และลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อราสาเหตุโรค

ผลการสำรวจและแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดดำ โดยวิธีแยกสปอร์เดี่ยวบนอาหาร PDA จำนวน 21 isolates จาก 5 อำเภอ (อ. ฝาง อ. สันกำแพง อ. เมือง อ. แม่วาง และ อ. จอมทอง ตามลำดับ)ในจังหวัดเชียงใหม่ การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา จำนวน 6 สูตร ได้แก่ MEA V8 CA PCA PYA และ PDA พบว่าเชื้อราสามารถเจริญและสร้างเส้นใยได้ดีที่สุดบนอาหาร PYA ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 °C อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อนำชิ้นเนื้อเยื่อใบกุหลาบมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบไปด้วยสารเร่งการเจริญ BAP ความเข้มข้น 1.5-3.0 mg/l และ NAA ความเข้มข้น 0.3-3.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี เมื่อนำแคลลัสดังกล่าว มาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ผสมสารสกัดหยาบของเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราในอาหารเหลวอาหาร PYB ที่ความเข้มข้น 100 และ300 µl. แคลลัสรอดชีวิต 70 %และ50 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามลำดับ เมื่อนำแคลลัสที่รอดชีวิตดังกล่าวในพันธุ์ Dallus และ Double Delight พบว่าอาหาร MS ที่ประกอบไปด้วยสารเร่งการเจริญ BAP ความเข้มข้น 0.5 mg/l NAA ความเข้มข้น 0.01-0.5 mg/l ที่เติมซิลเวอร์ไนเตรท 3.0 mg/ml และ อาหาร MS ที่ประกอบไปด้วยสารเร่งการเจริญ BAP ความเข้มข้น 1.0 mg/l และ GA_3 ความเข้มข้น 0.1mg/l สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากแคลลัสของทั้งสองพันธุ์ ตามลำดับ เมื่อนำต้นอ่อนมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใบจุดดำ isolate Ak4 Sk4 และ P2 (ที่แยกจาก อ .ฝาง อ. สันกำแพง. และ อ. เมือง ตามลำดับ) ด้วยวิธี Detached leaf โดยฉีดพ่นสปอร์ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ภายใต้สภาพที่เอื้อต่อการเกิดโรค พบว่ากุหลาบสายต้นที่ต้านทานต่อเชื้อรา isolate Ak4 ได้แก่ สายต้น DD103T DD301T DD502T DS501T และ DS1003T สายต้นที่ต้านทานต่อเชื้อรา isolate Sk4 ได้แก่ สายต้น DD105T DD103T DD301T DS1301T และ DS1003T ส่วนสายต้น DD103T DD301T DD501T และ DS303T ต้านทานต่อเชื้อราใน isolate P2 โดยทุกสายต้นที่ต้านทานต่อเชื้อมีความแตกต่างจากต้นเดิมอย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อ *M. rosae* ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ใน จังหวัดเชียงใหม่จำนวน 21 isolates เมื่อนำมาสกัดดีเอนเอตามวิธีของ Lee and Talor (1990) และ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ primer ขนาด 10 เบส จำนวน 53 ชนิด พบว่ามี 7 ชนิด คือ OPA13 OPC02 OPC11 OPC15 OPC16 OPC19 และ OPD13 ที่ให้แถบปฏิกิริยากับเชื้อที่ทดสอบทั้ง 21 isolates และสามารถจำแนกความแตกต่างได้ดีที่สุด จากการวิเคราะห์ด้วยค่า Jaccard's coefficient similarity เพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ความคล้ายคลึงกัน 90% พบว่าเชื้อราทั้ง 21 isolates มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Improvement of Black Spot Resistant Rose from Leaf Disc Culture

Author Miss Thanyalak Palee

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Assoc. Prof Dr. Prasartporn Smitamana

Abstract

Rose (*Rosa hybrida.*) is an important cut flower and widely grown in every part of Thailand as well as worldwide. Though rose is extensively cultivated in Thailand, but it does not meet the demand of the local market due to lack of real suitable varieties and losses caused by insect pests and diseases. Black spot disease caused by *Marssonina rosae.* (Perfect stage: *Diplocarpon rosae* Wolf.) is counted as the most important one which degrading flower quality. For controlling the black spot, many kinds of chemicals are applied but with only limited success. Moreover, using chemicals also creates the chemical resistant pathogens as well as pollutes the environment especially in the watershed areas where the major rose production lands located. Therefore, this experiment is set up in order to develop the black spot resistant rose lines from which could help minimizing of the chemical application in the production areas as well as solving the chemical tolerant problem in the pathogen population.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Twenty one isolates of the *M. rosae* are collected from major rose production areas 5 districts (from Fang, Sankamphaeng, Muang, Maewang and Jomthong Districts, respectively.) in Chiang Mai using single-spore isolation method on PDA. Suitable media formulation tested fungi growth on MEA, V8 CA, PCA, PYA and PDA, respectively. The fungal colony is significantly developed on PYA under $25 \pm 2^{\circ}$ C than other tested media. Rose cultivars, Dallus and Double Delight, are used in all experiments. Leaf callus formation for both tested cultivars is well formed on MS medium supplemented with 1.5-3.0 mg/l BAP and 0.3-3.0 mg/l NAA. Crude extraction of the pathogen grown in the PYB is added to the same callus culture medium in concentration 100 and 300 µl callus survived from the treatment 75 and 50 percent, respectively. Plant regeneration is performed on the MS plus 1.0 mg/l BAP, 0.01-0.5 mg/l NAA and 3.0 mg/l $AgNO_3$ and MS supplemented with 1.0 mg/l BAP, 0.1mg/l. GA_3 for survived calli of Dallus and Double Delight cultivars respectively. Screening for the resistant lines are done by the Detached leaf technique sprayed with the fungal isolates Ak4, Sk4 and P2, (from Fang, Sankamphaeng and Muang Districts, respectively) at the concentration of 1×10^5 spores/ml. The results show that clones: DD103T, DD301T, DD502T, DS501T and DS1003T are resisted to Ak4 isolate; DD105T, DD103, DD301T, DS1301T, and DS1003T are resisted to Sk4 isolate and DD103T, DD301T, DD501T and DS303T are resisted to P2. All of the resistant clones are highly significant different from the original parent lines.

Biodiversity study of *M. rosae* collected from Chiang Mai Province is investigated. DNA from twenty - one pathogen isolates are isolated followed the method described by Lee and Taylor (1990). The random amplified sets of 53

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

random 10-mers primers are tested and only seven sets: OPA13, OPC02, OPC11, OPC15, OPC16, OPC19 and OPD13 are found to be the suitable primers. Genetic distance between each isolates is calculated and cluster analysis is used to generate a dendrogram showing relationship between the isolates which shows that 21 isolates of the pathogen genetic are different by at the 90 % level using Jaccard's coefficient similarity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved