การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด ต้านทานโรคพืชหลายชนิดในมะเขือเทศ

Marker Assisted Selection for Breeding Near Isogenic Tomato Lines Resistant to Multiple Diseases

รัตนา ลาสุข[1, 2] กมลสิริ เพชรบูรณ์[1, 2] ฉัฐพร คุ้นวงศ์[1] และ จุลภาค คุ้นวงศ์*[1, 3]

Rattana Lasuk[1, 2] Kamonsiri Petchaboon[1, 2] Chataporn Chunwongse[1] and Julapark Chunwongse*[1, 3]

Abstract

Tomato near isogenic lines (NILs) containing multiple disease resistances were constructed using DNA marker assisted selection. The NILs were derived from the crosses between the resistance donor cultivars 'TA 223' 'TA 230' 'L3708' and commercial susceptible cultivars 'P502' and 'Seedathip 3' to transfer genes resistant to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* race 2, late blight disease caused by *Phytophthora infestans, Tobacco Mosaic Virus* (TMV) and Root–knot nematode. After an initial cross, six generations of backcrossing with selection using DNA markers associated with disease resistances, i.e., S20, TG591, PrRuG248/249 and Mi2 were performed. Each of these NILs was inoculated with corresponding diseases and selected for resistant lines. These NILs were then crossed to each other and selected using markers to combine the disease resistant genes. We have constructed tomato NILs of 'P502' and 'Seedathip 3' containing multiple disease resistant genes.

Keywords : DNA marker, Tomato, Near isogenic lines, Disease resistance

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

[2] Center of Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

[3] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง: ธันวาคม 2553

*Corresponding author: julapark.c@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรคพืช และรวมยีนต้านทานโรคพืชในหลายๆ ลักษณะเข้าไว้ด้วยกันเป็นการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อโรคพืชชนิดต่างๆ ได้หลายชนิด ซึ่งในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคพืชในตำแหน่งต่างๆ ได้ เริ่มจากผสมเพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานจากมะเขือเทศสายพันธุ์ TA 223, TA 230 และ L3708 เข้าสู่มะเขือเทศสายพันธุ์การค้า 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 เพื่อให้มีลักษณะต้านทานโรคพืชลักษณะต่างๆ จำนวน 4 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* โรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* โรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) และโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม ทำการผสมกลับเข้ากับพันธุ์การค้าและคัดเลือกโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย S20 TG591 PrRuG248/249 และ Mi2 ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคพืชในแต่ละลักษณะ ตามลำดับ ร่วมกับการทดสอบโรคทุกรุ่นของการคัดเลือกจำนวน 6 ชั่วรุ่น จนได้เป็นสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรคชนิดต่างๆ จากนั้นนำสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้ในแต่ละลักษณะมาผสมเพื่อรวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ลักษณะเข้าไว้ในต้นเดียวกัน พบว่า การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกสามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ให้มีลักษณะต้านทานโรคพืชชนิดต่างๆ และสามารถช่วยในการรวมยีนต้านทานโรคพืชทั้ง 4 ลักษณะในมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีลักษณะต้านทานโรคเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่นักปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ความสนใจ โดยพบว่าปัญหาที่เกิดจากโรคพืชนั้นเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศลดลงอย่างมาก ส่งผลให้ผลผลิตไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค อีกทั้งคุณภาพของมะเขือเทศก็ลดต่ำลงด้วยเช่นกัน ซึ่งพันธุ์มะเขือเทศทางการค้าที่มีอยู่ส่วนใหญ่มักจะอ่อนแอต่อเชื้อโรคชนิดต่างๆ ได้แก่ เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย (Yoder, 1993) ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ความสนใจในการปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะต้านทานโรคเพิ่มมากขึ้น โดยพันธุ์มะเขือเทศที่มีการปลูกในประเทศไทยนั้นแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ มะเขือเทศบริโภคผลสด ได้แก่ พันธุ์สีดา, สีดา มก., เชอรี่ และมะเขือเทศอุตสาหกรรม ได้แก่ P502, VF-134-1-2, Roma VF (Hokawat, 1993)

พื้นที่ปลูกมะเขือเทศรับประทานสด ได้แก่ จังหวัดลำปาง นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา และลพบุรี ส่วนพื้นที่ปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม ได้แก่ จังหวัด บุรีรัมย์ อุดรธานี สุรินทร์ หนองคาย สกลนคร นครพนม กาฬสินธุ์ เชียงใหม่ เชียงราย และตาก (Department of Agricultural Extension, 2007) โดยพื้นที่ต่างๆ เหล่านี้มีรายงานว่ามีการระบาดของโรคมะเขือเทศหลายชนิดส่งผลทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศลดลง ได้แก่ โรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปมทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศเสียหายถึง 51 เปอร์เซ็นต์ (Sukhakul, 2006) โรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากเชื้อ TYLCV ทำให้ผลผลิตเสียหายตั้งแต่ 50-100 เปอร์เซ็นต์เป็นต้น (Chandrasrikul, 1993) และมีโรคพืชอีกหลายชนิดที่สามารถทำให้ผลผลิตมะเขือเทศลดลงในปริมาณมากเช่นกัน เช่น โรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) โรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* และโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum*

การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์การค้าให้มียีนต้านทานโรคพืช โดยใช้วิธีการผสมกลับ (backcross) เพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคพืชที่ต้องการเข้าสู่พืชพันธุ์ปลูกที่ขาดลักษณะต้านทานโรคพืช ในลักษณะนั้นๆ สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้โดยนำต้นพันธุ์ดีผสมกับต้นที่มียีนต้านทานโรค แล้วผสมกลับเข้ากับต้นพันธุ์ดีประมาณ 6-7 ครั้ง จนได้พืชสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic line: NIL) จัดเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ดีทำได้สะดวก รวดเร็ว และสามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายมา

ช่วยในการคัดเลือกได้ (Chunwongse, 2005) และการรวมยีนต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่งที่ได้จากการสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดให้อยู่ในต้นเดียวกัน เป็นการเพิ่มความสามารถในการต้านทานต่อโรคพืช และเป็นแนวทางการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคของมะเขือเทศที่มีอยู่มากมายได้

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อช่วยคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะต่างๆ ตามที่ต้องการ (Marker assisted selection: MAS) โดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคจะทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพ และลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากเป็นการคัดเลือกโดยอ้อมในระดับจีโนไทป์(genotype) ของพืช ทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ช่วงต้นๆ ของการเจริญพันธุ์ เช่น จากเมล็ด (Chunwongse *et.al*., 1993) หรือ ใบเลี้ยง คัดเลือกได้ทั้งที่เป็นลักษณะเด่นและลักษณะด้อยโดยไม่ต้องทำ testcross สามารถช่วยคัดเลือกลักษณะหลายลักษณะได้พร้อมๆ กัน เช่น การรวมยีนต้านทานโรคพืช และช่วยคัดเลือกลักษณะทางปริมาณที่สภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกได้ ทำให้ได้ต้นพืชที่มียีนที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง (Chunwongse, 2000)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ที่มียีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง โรคใบไหม้ โรคใบด่างลาย และโรครากปม โดยหลังจากสร้างสายพันธุ์คู่แฝดแล้วได้รวมยีนต้านทานโรคในแต่ละลักษณะเข้าด้วยกันเพื่อให้ได้สายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ที่มียีนควบคุมความต้านทานโรคในทุกลักษณะ

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด

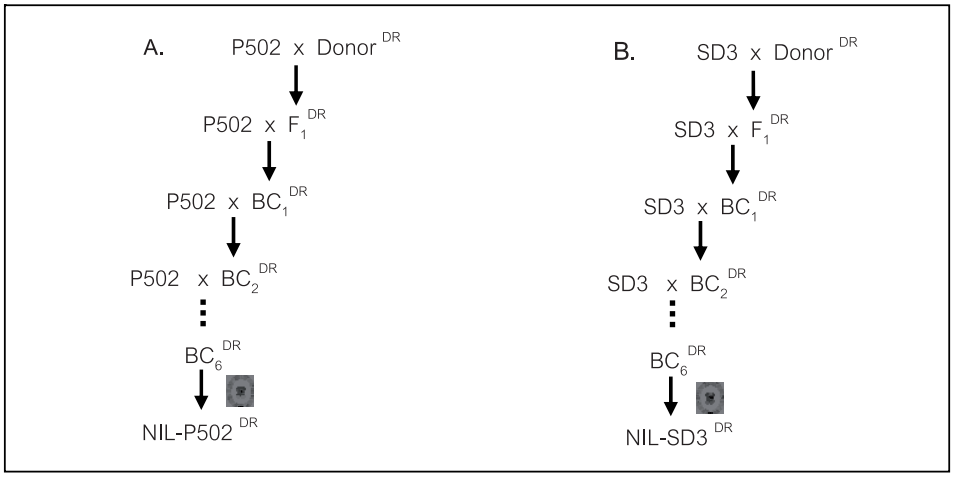
สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic line: NIL) ของพันธุ์ P502 และ สีดาทิพย์ 3 (SD3) ให้มียีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* โรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* โรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) และโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน และ ได้ทดสอบความต้านทานโรคในสายพันธุ์คู่แฝดที่พัฒนาได้

พันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

พันธุ์รับ (recurrent parents) ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าแต่มีลักษณะอ่อนแอต่อโรคพืช ได้แก่ พันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 (ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) ส่วนพันธุ์ให้ (donor parents) ได้แก่ มะเขือเทศที่มียีนต้านทานต่อโรคต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ TA 223 มียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรครากปม และโรคเหี่ยวเหลือง ได้แก่ ยีน *Mi* (โครโมโซม 6) และ *I2* (โครโมโซม 11) ตามลำดับ พันธุ์ TA 230 มียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคใบด่างลาย ได้แก่ ยีน *Tm2*^{a} (โครโมโซม 9) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Steven Tanksley มหาวิทยาลัยคอร์แนล ประเทศสหรัฐอเมริกาและ พันธุ์ L3708 มียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคใบไหม้ ได้แก่ ยีน *Ph3* (โครโมโซม 9) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Peter Hanson AVRDC ประเทศไต้หวัน

การสร้างสายพันธุ์คู่แฝด (Near Isogenic Line: NIL)

ผสมมะเขือเทศพันธุ์ P502 และ SD3 เข้ากับสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ แบบพบกันหมด ได้แก่ P502 x TA 223, P502 x TA 230, P502 x L3708, SD3 x TA 223, SD3 x TA 230 และ SD3 x L3708 แต่ละคู่ผสมคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นเฮเทอโรไซโกต แล้วนำมาผสมกลับเข้าหาพันธุ์การค้าจนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 6 (BC_6) จากนั้นนำต้นที่ได้มาผสมตัวเอง แล้วคัดเลือกให้ได้ต้นที่มีลักษณะโฮโมไซโกต และมียีนต้านทานโรคที่ต้องการเพื่อให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์คู่แฝดดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนผังการสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 โดยการนำยีนต้านทานโรคพืช ได้แก่ ยีน *I2, Ph3, Tm2*[a] และ *Mi* เข้าสู่พันธุ์รับด้วยวิธีการผสมกลับ (DR = Disease resistance)

การคัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์

ในแต่ละรุ่นของการผสมกลับ คัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) (Konieczny and Ausubel, 1993) เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอจากใบเลี้ยงมะเขือเทศที่มีอายุประมาณ 3-5 วัน โดยวิธีของ Fulton *et al.,* (1995) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ได้แก่ S20 (Sarfatti *et.al.*, 1989), TG591 (Chunwongse *et al.,* 2002), PrRuG248/249 (Sobir *et al.*, 2000) และ Mi2 (Messeguer *et.al.*, 1991) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน 2 % agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE ดังภาพที่ 2

การทดสอบความต้านทานโรค

การทดสอบความต้านทานโรคแต่ละโรค มีมะเขือเทศเพื่อใช้ทดสอบเปรียบเทียบ 2 ชุด ได้แก่ พันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 โดยแต่ละชุดมีสายพันธุ์ recurrent, donor และ NIL ทำการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรคเหี่ยวเหลือง นำสายพันธุ์คู่แฝดมาทดสอบระดับการเกิดโรคกับเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ KK1 KK2 KK3 และ KK4 โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อโรคเหี่ยวเหลืองจาก ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เปรียบเทียบกับพันธุ์ให้และพันธุ์รับ หลังจากทดสอบโรค 21 วัน นำมาตรวจสอบระดับความต้านทานโรค 5 ระดับ โดยเริ่มจากพืชไม่แสดงอาการของโรคถึงพืชแสดงลักษณะอ่อนแอ (1=พืชไม่แสดงอาการของโรค 2=ใบซีดและเหี่ยวเล็กน้อย ต้นแคระแกร็น 3=ใบซีดมากและเหี่ยว ต้นแคระแกร็น 4=ใบเหลืองเหี่ยวมาก ต้นแคระแกร็น 5=ต้นมะเขือเทศตาย) ตามวิธีของ AVRDC (AVRDC, 1999)

สำหรับมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ นำมาทดสอบระดับการเกิดโรคกับเชื้อ *P. infestans* สายพันธุ์ T030 (Petchaboon *et al.*, 2006) โดยให้คะแนนระดับการเกิดโรค 7 ระดับ (0=พืชไม่แสดงอาการของโรค 1=เกิดแผลขนาดเล็ก 2=เกิดแผลที่มีขอบเขต 3=โรคไม่ลามไปยังส่วนของลำต้น 4=เกิดแผลเล็กๆ บริเวณลำต้นเล็กน้อย 5=เกิดแผลขนาดใหญ่บริเวณลำต้น 6=เกิดการเสียหายกับลำต้นมากหรือต้นมะเขือเทศตาย) ตามวิธีของ AVRDC (AVRDC, 1999) ทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างจากเชื้อไวรัส TMV ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้ โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

(Charoen-Ame, 2009) ใช้แหล่งเชื้อไวรัสจากต้นยาสูบที่ได้ปลูกเชื้อไว้ โดยบดใบยาสูบ 1 กรัม ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงคาร์โบรันดัมลงในน้ำคั้น ผสมให้เข้ากัน นำไปทาลงบนใบมะเขือเทศ หลังจากปลูกเชื้อ 1 เดือน นำมาทดสอบและวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) ตามวิธีการของ Wongkaew (1993)

และสำหรับมะเขือเทศที่ปรับปรุงพันธุ์ให้มียีนต้านทานโรครากปมจากไส้เดือนฝอยรากปมนั้น ถูกนำมาทดสอบโดยใช้ไส้เดือนฝอย *M. incognita* ระยะ juvenile ที่ 2 ใส่ในต้นกล้า ตามวิธีการของ Hussey and Barker (1973) หลังจากนั้นดูแลรักษาตามปกติเป็นเวลา 3 เดือน วัดอัตราการเกิดปมตามมาตรฐานของ International Meloidogyne Project (IMP) โดยมีระดับคะแนนทั้งหมด 6 ระดับ (0=ไม่เกิดปม 1=เกิดปม 1-3 ปม 2=เกิดปม 4-10 ปม 3=เกิดปม 11-30 ปม 4=เกิดปม 31-100 5=เกิดปม >100) (Sukhakul and Sontirat, 1987)

การทดลองที่ 2 การรวมยีนต้านทานโรค

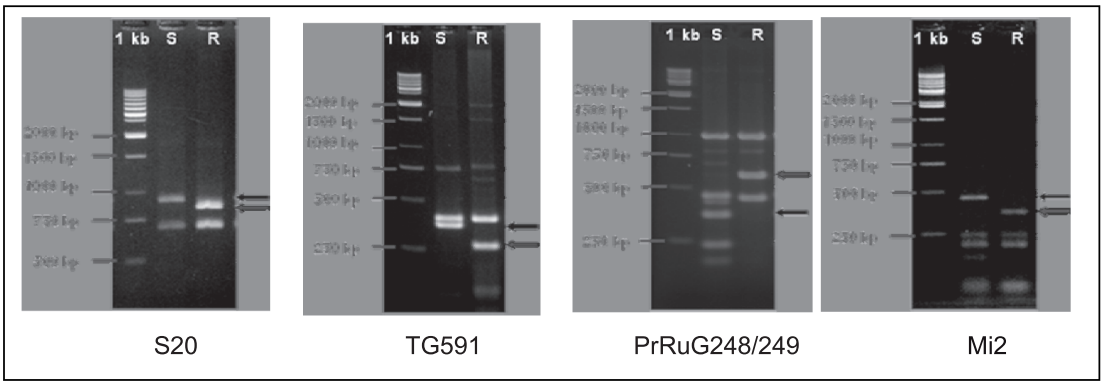
หลังจากได้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด ที่มียีนต้านทานโรคในแต่ละลักษณะ แล้วนำมาผสมเพื่อรวมยีนต้านทานโรคทุกลักษณะเข้าไว้ด้วยกัน

พันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

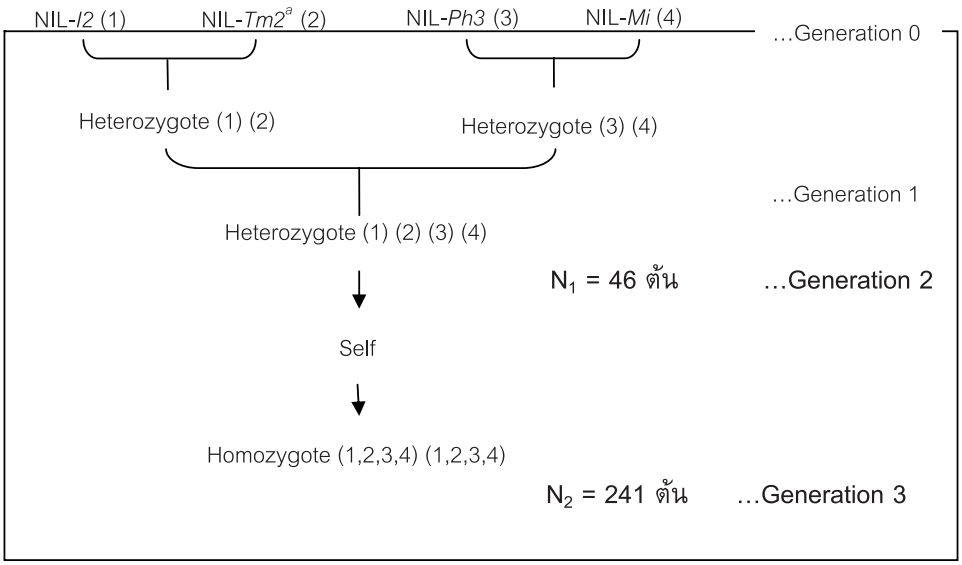
มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของ P502 ที่มียีนต้านทานโรคพืชชนิดต่างๆ ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ได้แก่ TOMAC 461 มียีน *Mi* ต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม TOMAC464 มียีน $Tm2^a$ ต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* TOMAC479 มียีน *I2* ต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* และ TOMAC482 มียีน *Ph3* ต้านทานโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของ SD3 ได้แก่ TOMAC 460 มียีน *Mi*, TOMAC462 มียีน *I2*, TOMAC463 มียีน $Tm2^a$ และ TOMAC476 มียีน *Ph3*

ตารางที่ 1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกยีนต้านทานต่อโรคพืชทั้ง 4 ชนิดในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรค

Diseases	Genes	Chromosomes	DNA markers	Restriction enzymes	References
Fusarium wilt race2	*I2*	11	S20	*Dra* I + *Hha* I	Sarfatti *et.al.*, 1989
Late blight race T1, T2	*Ph3*	9	TG591	*Hinf* I	Chunwongse *et al.*, 2002
TMV	$Tm2^a$	9	PrRuG248/249	*Acc* I	Sobir *et al.*, 2000
Nematode	*Mi*	6	Mi2	*Hinf* I	Messeguer *et.al.*, 1991



ภาพที่ 2 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด CAPS S20, TG591, PrRuG248/249 และ Mi2 ที่ปรากฏลักษณะ Susceptible (S) และ Resistant (R) genotypes ใน 2% agarose gel electrophoresis (1 kb = 1 Kb ladder, ลูกศร แสดงแถบดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทาน (R) และพันธุ์อ่อนแอ (S) ที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต)



ภาพที่ 3 การรวมยีนต้านทานโรคพืชในมะเขือเทศ (gene pyramiding) N คือ จำนวนต้นที่คัดเลือกในแต่ละรุ่น โดยคัดต้นที่ไม่มียีนทิ้งไปด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย เพื่อหาต้นมะเขือเทศที่มีลักษณะเป็นโฮโมไซโกตทั้ง 4 ยีน

การรวมยีนต้านทานโรคและการคัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์

รวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ได้แก่ *I2*, *Ph3*, *Tm2*^{a} และ *Mi* (ตารางที่ 1) โดยใช้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด (NIL) ของมะเขือเทศพันธุ์ P502 หรือ สีดาทิพย์ 3 ที่ได้ปรับปรุงพันธุ์และทดสอบความต้านทานโรคพืชแล้วจากการทดลองที่ 1 ผสมรวมกัน และ คัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมที่มียีนที่ต้องการโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายดังที่แสดงในตารางที่ 1 มาช่วยคัดเลือกจนได้ต้นมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ลักษณะรวมกันดังภาพที่ 3 จำนวนต้นที่ใช้ในการคัดเลือกทางทฤษฎีในขั้นตอนการรวมยีน (gene pyramiding) คำนวณจากสูตรที่ดัดแปลงจาก Witcombe and Virk (2001) โดยในรุ่นที่ 2 ของการผสม คัดเลือกต้นมะเขือเทศที่ยีนมีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีน ใช้การคำนวณจำนวนต้นจากสูตร N_1 = log (0.05) / log

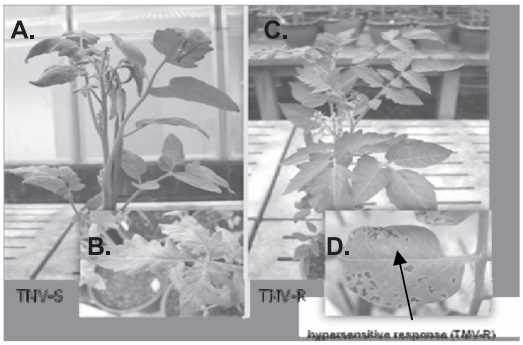
(1-1/2^n) เมื่อ N_1 = จำนวนต้นที่ต้องคัดเลือกทางทฤษฎีในรุ่นที่ 2 และ n = จำนวนคู่ของยีนที่เป็นเฮเทอโรไซกัส ส่วนการผสมในรุ่นที่ 3 จะคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน ใช้การคำนวณจำนวนต้นจากสูตร N_2 = log (0.05) / log (1-1/3^n) เมื่อ N_2 = จำนวนต้นที่ต้องคัดเลือกทางทฤษฎีในรุ่นที่ 3 และ n = จำนวนคู่ของยีนที่เป็นเฮเทอโรไซกัส

ผลและวิจารณ์

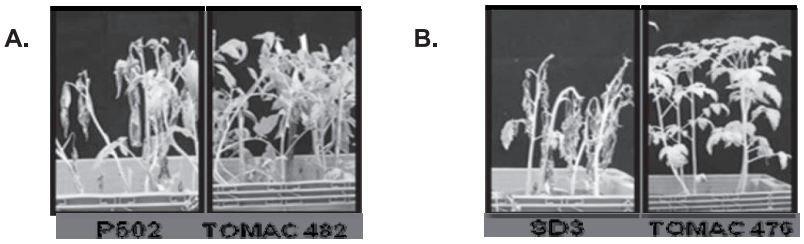
การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด

จากการสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายคัดเลือกสามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรคที่ต้องการในลักษณะโฮโมไซโกตได้ โดยจากการทดสอบความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศด้วยเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 ทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่า มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC479 และ TOMAC462 มีลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* race 2 มีระดับการเกิดโรคเป็นเท่ากับ 1 คือ ไม่มีการแสดงอาการของโรคเลย โดยมีการแสดงความต้านทานอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับมะเขือเทศพันธุ์ TA 223 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ ส่วนมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 มีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 5 โดยจะแสดงลักษณะอ่อนแอ ทำให้ต้นมะเขือเทศตาย ดังภาพที่ 4

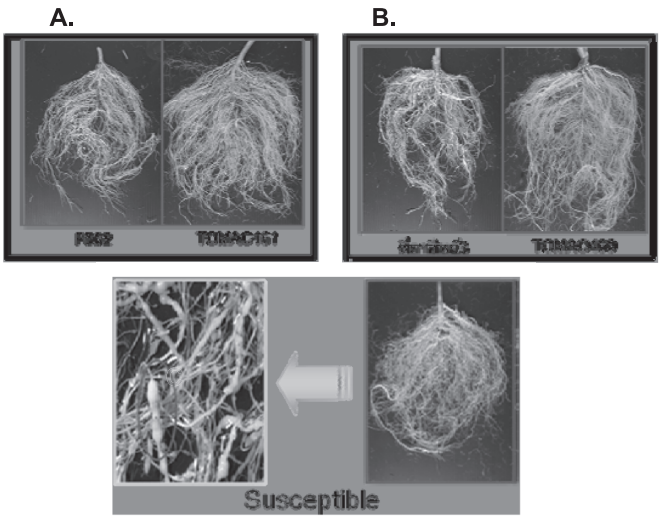
ภาพที่ 4 การทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศหลังจากการปลูกเชื้อ 3 สัปดาห์ A. ลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองของพันธุ์ต้านทาน 'TA 223' B. ความต้านทานโรคระหว่าง P502 และ ต้นสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC479 C. ความต้านทานโรคระหว่างสีดาทิพย์ 3 และ ต้นสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC462



ภาพที่ 5 การทดสอบความต้านทานของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด (P502) A. และ B. แสดงลักษณะมะเขือเทศพันธุ์ P502 ที่อ่อนแอ (TMV-S), C. และ D. แสดงสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC 464 ที่ต้านทาน (TMV-R) ต่อเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV)



ภาพที่ 6 การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบไหม้จากเชื้อ T030 A. ความต้านทานโรคใบไหม้ระหว่าง P502 และ ต้นสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC482 B. ความต้านทานโรคใบไหม้ระหว่างสีดาทิพย์ 3 และ ต้นสายพันธุ์คู่แฝดต้นสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC476



ภาพที่ 7 การทดสอบความต้านทานต่อโรครากปมหลังจากปลูกเชื้อ 3 เดือน A. ความต้านทานโรครากปมระหว่าง P502 และ ต้นสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC461 B. ความต้านทานโรคระหว่างสีดาทิพย์ 3 และ ต้นสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC460 C. ลักษณะรากมะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย

การตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส TMV ในต้นมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน ด้วยเทคนิค DAC-ELISA พบว่า มะเขือเทศพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 แสดงลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) ดังภาพที่ 5 A และ B ส่วนมะเขือเทศพันธุ์ TA 230 มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC463 และ TOMAC464 มีลักษณะต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) มีปริมาณเชื้อไวรัสในปริมาณที่ต่ำกว่าสายพันธุ์รับ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อให้อยู่ในวงจำกัดได้ โดยการเกิด necrosis ทำให้เซลล์บริเวณที่มีเชื้อไวรัสตายอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้เชื้อไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังภาพที่ 5 C และ D

การทดสอบความต้านทานโรคใบไหม้ของมะเขือเทศด้วย *P. infestans* โดยใช้เชื้อ T030 พบว่า มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC476 และ TOMAC482 มีลักษณะต้านทานโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *P. infestans* ซึ่งแตกต่างกับสายพันธุ์รับที่แสดงลักษณะอ่อนแอ ดังภาพที่

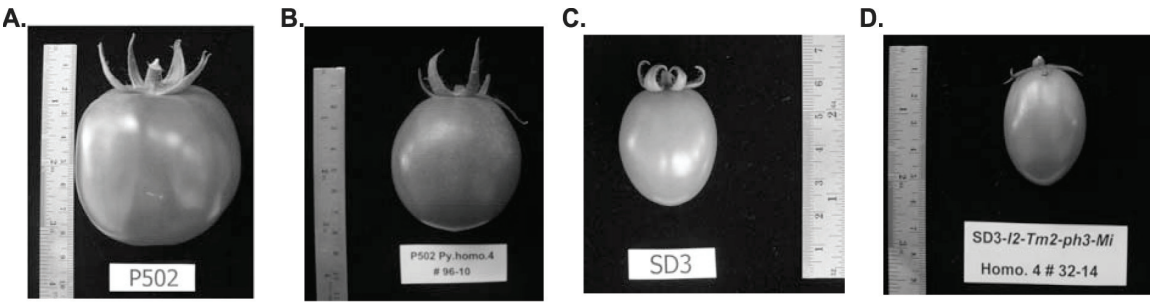
6 และการทดสอบระดับความต้านทานโรครากปมจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* พบว่า มะเขือเทศพันธุ์ TA 223 ที่เป็นพันธุ์ให้กับมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด TOMAC461 และ TOMAC460 นั้นมีระดับคะแนนเท่ากับ 0-1 ซึ่งแสดงลักษณะต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม ส่วนมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ที่เป็นสายพันธุ์รับแสดงลักษณะอ่อนแอ มีระดับคะแนนเท่ากับ 4 และ 5 ตามลำดับ ดังภาพที่ 7

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคพืชทั้ง 4 ชนิด พบว่า มะเขือเทศพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นแม่นั้นมีอาการของโรคที่นำมาทดสอบในระดับรุนแรง แสดงลักษณะอ่อนแอ ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อและ ต้นที่เป็นสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์มีการแสดงอาการของโรคเล็กน้อย และ เมื่อนำมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้มาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และลักษณะทั่วไป พบว่า มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดมีการเจริญเติบโต และ ลักษณะภายนอกไม่ต่างไปจากมะเขือเทศพันธุ์รับ คือ P502 และสีดาทิพย์ 3

การรวมยีน (pyramiding gene) ต้านทานโรค

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อรวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ลักษณะไว้ในต้นเดียวกัน พบว่า สามารถคัดเลือกมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรคพืชทั้ง 4 ชนิดได้ในรุ่นที่ 3 และ 4 ของการผสมกลับ โดยในรุ่นที่ 2 ของการผสมที่คัดเลือกเพื่อหาต้นมะเขือเทศที่ยีนมีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีนนั้น ได้ทำการคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์ P502 ทั้งหมด 125 ต้น พบต้นที่มีลักษณะดังกล่าวทั้งหมด 2 ต้น ส่วนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 คัดเลือกทั้งหมด 108 ต้น พบต้นที่มีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีนจำนวนทั้งหมด 2 ต้น และ เมื่อนำจำนวนต้นที่ทำการคัดเลือกจริงในรุ่นที่ 2 เปรียบเทียบกับจำนวนต้นทางทฤษฎีในแผนผังการรวมยีนดังภาพที่ 3 พบว่า จำนวนต้นที่ใช้คัดเลือกจริงทั้งมะเขือเทศพันธุ์ P502 และพันธุ์สีดาทิพย์ 3 มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนต้นทางทฤษฎี ในรุ่นที่ 3 ที่คัดเลือกให้ได้ต้นมะเขือเทศที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน ทำการคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์ P502 ทั้งหมด 244 ต้น พบต้นที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต 3 ยีน เฮเทอโรไซโกต 1 ยีน จำนวน 8 ต้น และ ที่เป็นโฮโมไซโกต 4 ยีน จำนวน 1 ต้น มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 คัดเลือกทั้งหมด 254 ต้น พบต้นที่เป็นโฮโมไซโกต 3 ยีน เฮเทอโรไซโกต 1 ยีน จำนวน 2 ต้น แต่ยังไม่พบต้นที่มีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน ดังนั้นจึงนำต้นที่มีลักษณะโฮโมไซโกต 3 ยีน เฮเทอโรไซโกต 1 ยีน ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ทั้ง 2 ต้นมาผสมตัวเองและคัดเลือกหาต้นที่มีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีนในรุ่นที่ 4 โดยคัดเลือกทั้งหมด 52 ต้น สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะตามต้องการจำนวน 12 ต้น เมื่อนำจำนวนต้นที่คัดเลือกจริงเปรียบเทียบกับจำนวนต้นที่ต้องทำการคัดเลือกทางทฤษฎี พบว่า มะเขือเทศพันธุ์ P502 สามารถคัดเลือกลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน ได้ในรุ่นที่ 3 ของการผสม ส่วนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ในรุ่นที่ 3 ที่ยังไม่พบลักษณะที่ต้องการ สามารถนำมาผสมและคัดเลือกเพิ่มในรุ่นที่ 4 หรือทำการคัดเลือกเพิ่มเติมจากรุ่นที่ 3 เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะตามต้องการ ทั้งนี้จำนวนต้นที่ใช้คัดเลือกจริงในแต่ละรุ่นมีมากกว่าค่าทางทฤษฎีนั้นอาจเนื่องมาจากในการรวมยีนมียีนต้านทานโรคใบด่างจากเชื้อ TMV และโรคใบไหม้ ที่ต่างอยู่บนโครโมโซม 9 ทำให้การคัดเลือกต้นโฮโมไซโกตที่มีทั้ง 2 ยีนให้มาอยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกัน จำเป็นต้องคัดเลือกจำนวนต้นมากกว่าตามที่คำนวณได้จากสูตรคำนวณของ Witcombe and Virk (2001)

เมื่อทำการศึกษารูปทรงผล และลักษณะทั่วไปของมะเขือเทศหลังจากทำการรวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน พบว่า ในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 มีลักษณะของผลเป็นทรงกลม สีผลส้ม-แดง ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับพันธุ์รับ ส่วนมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 พบต้นที่มีลักษณะผลกลม รี และสีผลแตกต่างกันไป ซึ่งผลที่ได้อาจเกิดจากในต้นสายพันธุ์คู่แฝดที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของพันธุ์สีดาทิพย์ 3 มีบางสายพันธุ์ที่มียีนที่ควบคุมลักษณะผลแป้น-กลม หรือผลมีสีส้ม – แดง ติดมา ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้เกิดจากการลากติดมาของยีนอื่นที่ไม่ต้องการ หรือที่เรียกว่า Linkage drag ดังนั้นในการคัดเลือกควรทำการคัดเลือกจำนวนต้นให้มากเพื่อหาต้นที่



ภาพที่ 8 ลักษณะผลมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ A. ลักษณะผลมะเขือเทศพันธุ์ P502 B. ลักษณะผลมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 ที่รวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน ได้แก่ ยีน *I2 Tm2*^{a} *Ph3* และ *Mi* C. ลักษณะผลมะเขือเทศพันธุ์ SD3 D. ลักษณะผลมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ SD3 ที่รวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน

เกิดรีคอมบิเนชัน เอาส่วนของยีนที่ไม่ต้องการออกไป (Chunwongse, 2005) นอกจากนี้ควรจะคัดเลือกลักษณะทางการค้าต่างๆ ของมะเขือเทศในแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายด้วยเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานโรค และลักษณะทางการค้าอื่นๆ ตรงตามที่ตลาดต้องการ

สรุป

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยวิธีผสมกลับร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกนั้น สามารถช่วยปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ ให้ต้านทานโรคได้ และยังคงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนต้นแม่จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้นั้นมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคพืชได้เท่ากับพันธุ์ที่ให้ยีนต้านทานโรค ซึ่งแต่แตกต่างจากพันธุ์รับที่อ่อนแอต่อโรคพืช

การรวมยีนต้านทานโรคพืช 4 ลักษณะของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 และ SD3 โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกสามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน ในสภาพโฮโมไซโกต 4 ยีน ได้ในรุ่น 3 และ 4 ของการคัดเลือก ได้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีนสำหรับมะเขือเทศพันธุ์ P502 จำนวน 4 สายพันธุ์ และ SD3 จำนวน 12 สายพันธุ์ มะเขือเทศที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในการผลิตมะเขือเทศในพื้นที่ต่างๆ ที่มีปัญหาของโรคทั้ง 4 ชนิดได้ อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับลักษณะอื่นต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย และทุนค่าใช้จ่ายบัณฑิตศึกษาสำหรับ น.ส. รัตนา ลาสุข ขอขอบคุณดร.พิสวรรณ เจียมสมบัติ และนายทศพล เจริญเอมสำหรับการทดสอบโรคใบด่างผศ.สมชาย สุขะกุล สำหรับการทดสอบความต้านทานไส้เดือนฝอย รศ.ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ สำหรับเชื้อโรคเหี่ยวเหลือง ขอขอบคุณศูนย์วิจัย และพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ และโรงเรือน

เอกสารอ้างอิง

AVRDC. 1999. AVRDC report. 1998. Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua. Tainan. Taiwan.

Chandrasrikul, A. 1993. Family Solanaceae: Tomato. pp. 6-14. *In* Some diseases and pests of vegetables and its control. (6th eds.). Thai Watana Panich Publishing Co. Ltd., Bangkok. (in Thai)

Charoen-Ame, T. 2009. Selection of backcross lines of tomato cv. P 502 resistant to tobacco mosaic virus using DNA marker. Undergraduate special problem. Division of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture-KPS, Kasetsart University. 22p. (in Thai)

Chunwongse, J. 2000. Marker Assisted Selection in Tomato. pp. 80-88. *in* the 13th Plant Breeding and Multiplication Conference. Plant Breeding and Multiplication Association of Thailand. Bangkok. (in Thai)

Chunwongse, J. 2005. Plant Breeding, biotechnology and genetic diversity. pp. 79-88. *In* Thebtaranonth, Y. and K. Kirtikara (eds) Rice-Cassava-Shrimp: Produces for the Thais. National Science and Technology Development Agency. Bangkok. (in Thai)

Chunwongse, J., C. Chunwongse, L. Black and P. Hanson. 2002. Molecular mapping of *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato. J. Hort. Sci. Biotechnol. 77: 281-286.

Chunwongse, J., G.B. Martin, and S.D. Tanksley. 1993. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. Theor. and Appl. Genet. 86: 694-698.

Department of Agricultural Extension. 2007. Tomato Growing Area in Year 2007. Source: http://www.doae.go.th/plant/tomato.htm, 4 November 2008. (in Thai)

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocal for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plants Mol. Biol. Reporter 13 (3): 207-209.

Hokawat, S. 1993. Diseases of pepper and tomato. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen. (in Thai)

Hussey, R.S. and R.K. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique, *Plant Disease Reporter* 57 (1973), p. 1025–1028.

Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutation co-dominant ecotype specific PCR-based markers. Plant J. 4: 403-410.

Messeguer, R., M. Ganal, M.C. Devicente, N.C. Young, H. Bolkan and S.D. Tanksley. 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. Theor. Appl. Genet. 82: 529–36.

Petchaboon, K., P. Pongam, and J. Chunwongse. 2006. Characterization of the Phytophthora infestans collected from tomato and potato in Tak and Chiang Mai provinces. Agricultural Sci. J. 37(2): 125-135. (in Thai)

Sarfatti, M., j. Katan, R. Fluhr and D. Zamir. 1989. An RFLP marker in tomato linked to the *Fusarium oxysporum* resistant gene *I2*. Theor. Appl. Genet . 78: 755-759.

Sobir, T, O. M. Murata and F. Motoyoshi. 2000. Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the *Tm-2* locus of the genus *Lycopersicon*. Theor. and Appl. Genet. 101: 64–69.

Sukhakul, S. 2006. Tomato nematode: Example of resistant cultivars of economic crops. pp. 158-171 *in* Nematode Plant Pest and its control. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture-KPS, Kasetsart University, Nakhon Pathom. (in Thai)

Sukhakul, S. and S. Sontirat. 1987. Control of root-knot nematodes, Meloidogyne incognita, on vegetables by soil amendments. pp. 16. *In* Kasetsart University Research Report. Kasetsart University Reasearch and Development Institute. Bangkok. (in Thai)

Witcombe, J.R. and D.S. Virk. 2001. Number of crosses and population size for participatory and classical plant breeding. Euphytica 122: 451-462.

Wongkaew, S. 1993. Peanut viruses in Thailand. Oil crop group, Field Crop Extension Division, Department of Agricultural Extension, Ministry of Agriculture and Cooperation. 44p. (in Thai)

Yoder, J.I. 1993. Molecular Biology of Tomato. Technomic Publishing Company. Pennsylvania. 314p.