การรวมยีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานโรคไวรัส

Gene Stacking in Transgenic Tomato Resistance to Viral Diseases

ปณิธิ ผลบังเกิด[1,2], สุจินต์ ภัทรภูวดล[1,2,3] และ สุพัฒน์ อรรถธรรม[1,2,3]
Paniti Polbungkerd[1,2], Sujin Patarapuwadol[1,2,3] and Supat Attathom[1,2,3]

Abstract

Virus diseases are considered one of the most important factors affecting tomato production in Thailand. Virus resistant tomatoes derived from genetic transformation have been tested with limited success due to virus specificity. Gene stacking is therefore, an alternative approach to develop tomato lines with multiple viral resistance. This study aimed to stack two genes in transgenic tomato lines, the CMV defective replicase gene in Seedathip 3 and CaCV nucleocapsid protein gene in Seedathip 4. Reciprocal crossings of transgenic tomatoes between Seedathip 3 and Seedathip 4 varieties resulted in transgenic segregation of transgenes in progeny seedlings as detected by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for these both genes. Out of 685 tomato lines (F_1) derived from crossing, 247 lines (36.06%) contained both transgenes, 172 lines (25.11%) contained single transgene of defective replicase or nucleocapsid protein genes and 266 lines (38.83%) were without transgenes.

Keywords: transgenic tomatoes, replicase gene, nucleocapsid protein gene, reciprocal crossing, gene stacking

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom,73140,Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology : (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2555

Corresponding author : agrspa@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โรคไวรัสจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดประการหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตมะเขือเทศ การทดลองใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานโรคไวรัสในการควบคุมโรคไวรัสได้ผลดีระดับหนึ่ง แต่มีปัจจัยจำกัดเนื่องจากความจำเพาะเจาะจงของไวรัสแต่ละชนิด การรวมยีนต้านทานไวรัสที่มากกว่า 1 ยีนเข้าด้วยกันจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาพันธุ์มะเขือเทศในการควบคุมโรคไวรัส การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางการรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคไวรัสในมะเขือเทศ โดยการผสมสลับพ่อแม่ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของไวรัสใบด่างแตง (*Cucumber mosaic virus*-CMV) กับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของไวรัสสาเหตุโรคยอดไหม้ (*Capsicum chlorosis virus*-CaCV) ผลการตรวจสอบมะเขือเทศลูกผสม (F_1) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนทั้งสอง พบว่า จากมะเขือเทศลูกผสม 685 ต้น มียีนทั้งสองอยู่ด้วยกัน 247 ต้น (36.06%) ตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์หรือยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนอย่างใดอย่างหนึ่ง 172 ต้น (25.11%) และไม่พบยีนดังกล่าว 266 ต้น (38.83%)

คำนำ

มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และอุตสาหกรรมชนิดหนึ่งของประเทศไทย ประกอบด้วยมะเขือเทศส่งโรงงานอุตสาหกรรมและมะเขือเทศสำหรับรับประทานผลสด นอกจากนำมะเขือเทศมาใช้ในการประกอบอาหารแล้วยังถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้อีกหลากหลายชนิด ในประเทศไทย ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ด้วยความร่วมมือกับศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (AVRDC) ดำเนินการปรับปรุงมะเขือเทศพันธุ์รับประทานสดให้เป็นพันธุ์ทนร้อนสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปีมีลักษณะผลตรงตามความต้องการของตลาด เช่น มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 1-4 และพันธุ์ลูกผสมสีดาทิพย์ 91 (Sitadhani *et al*., 1994)

ปัญหาสำคัญของการปลูกมะเขือเทศ คือ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่สร้างความเสียหายอย่างมาก โดยทำให้ผลิตลดลง หรือคุณภาพของผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน และการป้องกันกำจัดทำได้ยากโรคไวรัสสำคัญที่พบในประเทศไทย ได้แก่ โรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่เกิดจาก *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Attathom *et al*.,1990; Attathom *et al*., 1994; Rochester *et al*.,1994) โรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแตงที่เกิดจาก *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Attathom *et al*.,2005) โรคใบด่างที่เกิดจาก *Tobacco mosaic virus* หรือ *Tomato mosaic virus* (Sutabutra, 1989) และโรคยอดไหม้ที่เกิดจาก *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ซึ่งพบแพร่ระบาดอย่างมากในมะเขือเทศที่ปลูกในสภาพโรงเรือนและแปลงปลูก (Chiemsombat *et al*., 2006; Chiemsombat and Adkins, 2008 ; Hanssen *et al*., 2010; Seepiban *et al*., 2011)

การควบคุมและป้องกันกำจัดโรคไวรัสมีหลายวิธีด้วยกัน วิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง คือ การสร้างพืชต้านทานไวรัส โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมหรือการถ่ายยีน (Powell-Abel *et al*., 1986; Slater *et al*., 2003) เนื่องจาก การปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานไวรัสแบบดั้งเดิมนั้นมีข้อจำกัด คือ แหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานไวรัสในพืชเองนั้นมีน้อยมากหรือไม่มีเลย และยีนต้านทานส่วนใหญ่มักไม่แสดงออก ในกรณีที่พืชถูกเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงเข้าทำลาย (Khetarpal *et al*.,1998) การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมนั้นมีการนำยีนหรือสารพันธุกรรมที่ได้จากจีโนมของเชื้อไวรัสมาสร้างความต้านทานให้แก่พืช (pathogen-derived resistance) เช่น ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) แซทเทลไลท์อาร์เอ็นเอ (satellite RNA) ยีนโปรตีนเคลื่อนย้ายอนุภาค (movement protein) ยีนเรพลิเคส (replicase) หรือยีนอื่นๆ ของไวรัส เป็นต้น (Walsh, 2000; Attathom, 2009)

ในประเทศไทย มีรายงานการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อเชื้อ TYLCV เป็นครั้งแรกโดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (Attathom *et al*., 1992) พบการแสดงออกของยีนและสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ (Piamjit, 2000) หรือการใช้ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (Tiratanakul, 2004; Supapanyapong, 2006) ที่สามารถถ่ายทอดยีนได้ถึงรุ่นที่ 6 และ ต้านทานต่อเชื้อ TYLCV ได้ดี (Charoen-aom, 2009) สำหรับเชื้อ CMV มีการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (truncated) เข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 (Bhunchoth, 2001; Tiratanakul, 2004) สามารถถ่ายทอดยีนสู่รุ่นลูกได้จนถึงรุ่นที่ 3 และสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ CMVได้ดีเช่นกัน (Ritpitakphong, 2010)

แม้ว่าการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจะมีประสิทธิภาพสูง ในการป้องกันและควบคุมโรคไวรัส แต่พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสเพียงชนิดเดียวที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ (Yie and Tien, 1998) ขณะที่ในพื้นที่ปลูกจริงนั้นมักพบการระบาดของเชื้อไวรัสแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ หรือมีการระบาดของเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป (viral mixed infection) การใช้พืชต้านทานไวรัสที่ได้รับยีนมากกว่า 1 ยีนขึ้นไป (gene stacking หรือ gene pyramiding) จะทำให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากชนิดขึ้น (Halpin, 2005)

การรวมยีน (gene stacking) คือ การเพิ่มยีนที่ถ่ายให้กับพืช (transgenes) ตั้งแต่สองยีนขึ้นไปเข้าสู่จีโนมของพืช เพื่อให้พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้นั้นมีการแสดงออกของหลายลักษณะตามที่ต้องการ การรวมยีนถูกนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น ควบคุมแมลงศัตรูพืช วัชพืช และเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งรวมไปถึงเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชด้วย การผลิตพืชให้มียีนต้านทานไวรัสมากกว่า 1 ยีนนั้นอาจทำได้จากการผสมข้ามระหว่างพืชที่ได้รับการถ่ายยีน การถ่ายยีนซ้ำ (re-transformation) ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีน หรือการถ่ายยีนที่มียีนมากกว่า 1 ยีนในครั้งเดียว (co-transformation) (Francois *et al*., 2002; Taverniers *et al*., 2008; Douglas and Halpin, 2010)

การวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางการรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคไวรัส ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของไวรัสใบด่างแตงที่เกิดจากเชื้อ CMV (Tiratanakul, 2004) และมีการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV ในมะเขือเทศรุ่น R_1-R_3 (Ritpitakphong, 2010) โดยวิธีการผสมข้ามกับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV

อุปกรณ์และวิธีการ

มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่นำมาใช้ ในการทดลองประกอบด้วยมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของไวรัสใบด่าง แตงที่เกิดจากเชื้อ CMV (rep. gene) และได้ทำการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV ถึงรุ่น R_3 ซึ่งพบว่ามีความต้านทานถึง 100% (Tiratanakul, 2004; Ritpitakphong, 2010) และมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของโรคยอดไหม้ ที่เกิดจากเชื้อ CaCV (N gene) รุ่น R_2 ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายใต้โครงการการผลิตมะเขือเทศภายใต้สภาพโรงเรือนในประเทศไทย ของโครงการความร่วมมือระหว่างไทย-เยอรมัน (NRCT-DFG) ซึ่งยังไม่ได้ทำการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CaCV โดยนำเมล็ดมะเขือเทศแต่ละสายพันธุ์ มาเพาะในกระบะเพาะกล้า เมื่อต้นกล้ามีอายุ 14 วัน ย้ายปลูกในกระถางขนาด 6 นิ้ว เก็บไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดลองศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพและความปลอดภัยทางชีวภาพมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

การผลิตมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

คัดเลือกพันธุ์พ่อและแม่ จากมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ด้วยการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากเชื้อ CMV และมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่มียีนนิวคลี

โอแคปซิดโปรตีนที่ได้จากเชื้อ CaCV ผสมข้ามโดยใช้ทั้งสองสายพันธุ์ เป็นทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (Reciprocal crossing) กำจัดเกสรเพศผู้ด้วยมือ (emasculation) ในต้นที่ใช้เป็นแม่ คัดเลือกให้ได้อย่างน้อย 20-25 คู่ผสม ในแต่ละคู่ผสมมีจำนวนต้นที่ใช้ในการทดสอบ 25-30 ต้น ต่อหนึ่งคู่ผสม เก็บเมล็ดที่ได้คู่ผสมละ 30-50 เมล็ด เพาะเมล็ดมะเขือเทศรวมยีนที่ได้ในกระบะเพาะกล้า หลังจากย้ายปลูก 14 วัน นำชิ้น ส่วนใบมาตรวจสอบยีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในทุกคู่ผสม

การตรวจสอบยีนบนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม และการหาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดยีน

ตรวจสอบยีนบนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมและมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยวิธี CTAB (Fulton *et al.*, 1995) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบ (template) (100 นาโนกรัม) ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (ตารางที่ 1)

ตรวจสอบยีนเรพลิเคสโดยกำหนดปฏิกิริยาดังนี้ ปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer (500 mM KCl ,100 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM $MgCl_2$ และ 1% Triton X-100) 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 0.5 mM, dNTPs 0.8 mM, RepCMV-F และ RepCMV-R primers อย่างละ 0.3 µM และ Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.5 units อุณหภูมิที่ใช้สำหรับ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที extention 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extention 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer (Ritpitakphong, 2010)

ตรวจสอบยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนโดยกำหนดปฏิกิริยาดังนี้ ปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer (500 mM KCl ,100 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM $MgCl_2$ และ 1% Triton X-100) 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 0.375 mM, dNTPs 0.533 mM, N-CaCV-F และ N-CaCV -R primers อย่างละ 0.2 µM และ Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.5 units อุณหภูมิที่ใช้สำหรับ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที extention 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extention 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ด้วย 2.0% agarose gel electrophoresisใน 0.5x TBE buffer

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน

primer	primer sequence (5' → 3')	product size
CMV-replicase gene specific primers		
RepCMV-F	5'-TATCGGATCCATGGCTTTCCCTG CCC-3'	
RepCMV-R	5'-ACGAGGATCCTCAGACTGGGTAAC-3'	2.48 kb.
CaCV-Nucleocapsid protein gene specific primers		
N-CaCV-F	5'-CACTGACGTA AGGGATGACGCAC-3'	
N-CaCV-R	5-'GG CCCTCCAATGCATAGC ATCAT-3'	422 bp.

ตรวจสอบยีนทั้งสอง นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งสองปฏิกิริยามารวมกัน นำมาวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer

อัตราการถ่ายทอดยีนของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการผสมทั้งหมดในรุ่นลูก คำนวณได้จากสมการดังนี้ (Tiratanakul, 2004)

อัตราการถ่ายทอดยีน(%)

$$= \frac{\text{จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

การเปรียบเทียบอัตราการถ่ายทอดยีนระหว่างการใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นแม่พันธุ์และมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นแม่พันธุ์

ทดสอบทางสถิติโดยวิธี T-test ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 ระหว่างกลุ่มที่ใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นต้นแม่พันธุ์ และกลุ่มที่ใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นต้นแม่พันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการถ่ายทอดยีนทั้งสองเมื่อใช้ต้นแม่พันธุ์ที่แตกต่างกันด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป *R*-program version 2.10.1 (Veneble *et al.*, 2009)

การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

คำนวณหาค่าความถี่ของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนจากอัตราการถ่ายทอดยีนที่คำนวณได้ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม ที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์จากสมการดังนี้ (Samphantharak, 2003)

$$p^2(AA)+2pq(Aa)+q^2(aa)=1$$

จากค่าความถี่ที่ได้นำมาคำนวณหาอัตราส่วนของพันธุกรรมหรือค่าคาดหมาย (expectation data) เปรียบเทียบค่าคาดหมายกับค่าสังเกต(observation data) ซึ่งได้มาจากผลการตรวจสอบยีนทั้งสองในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 ด้วยวิธีการทดสอบทางสถิติ chi square (χ^2–test) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป *R*-program version 2.10.1 (Veneble *et al.*, 2009)

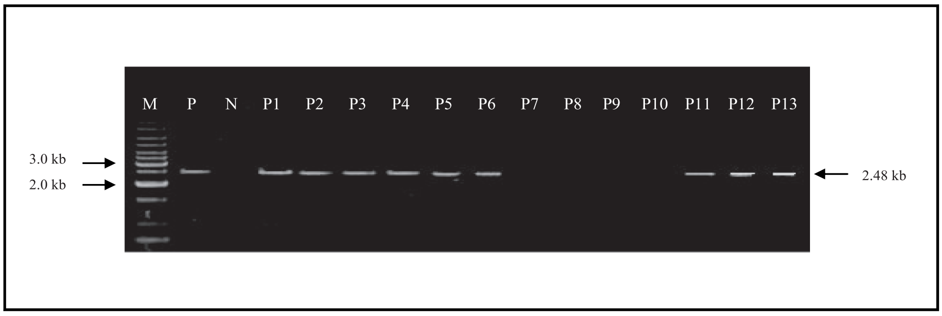
ผลการทดลอง

การคัดเลือกพ่อและแม่พันธุ์ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากเชื้อ CMV

ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 รุ่น R_4 พบว่า มะเขือเทศ line CMV L13-x-47 จำนวนทั้งหมด 23 ต้น ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.48 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่พบในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 (positive control) ทั้งหมด 14 ต้น (ภาพที่ 1) คิดเป็นอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อ-แม่ สู่รุ่นลูก 60.87% นำมะเขือเทศ 2 สายพันธุ์ คือ CMV L 13-x-47-6 และ CMV L 13-x-47-22 มาใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์

การคัดเลือกพ่อและแม่พันธุ์ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่มียีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนที่ได้จากเชื้อ CaCV

ผลการตรวจสอบยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 พบว่า จากการปลูกมะเขือเทศที่ทำการทดสอบทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CaCV L 2, 3, 6, 7 และ 8 จำนวน 14, 18, 16, 21 และ 23 ต้น ตามลำดับ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 (positive control) แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 2) โดย line CaCV L 3, 6 และ 7 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 14, 14 และ 8 ต้น มีอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อ-แม่ สู่รุ่นลูก คือ 44.4% , 87.5% และ 66.6% ตามลำดับ ในขณะที่ line CaCV L2 และ L8 นั้นตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 และ6 ต้น มีอัตราการถ่ายทอดยีนสู่รุ่นลูกเพียง 35.71% และ 26.09% เท่านั้น คัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line L3-9 (จากL3) L6-1, L6-4, L6-6 (จากL6) และ L7-2, L7-6 (จากL7) มาใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์



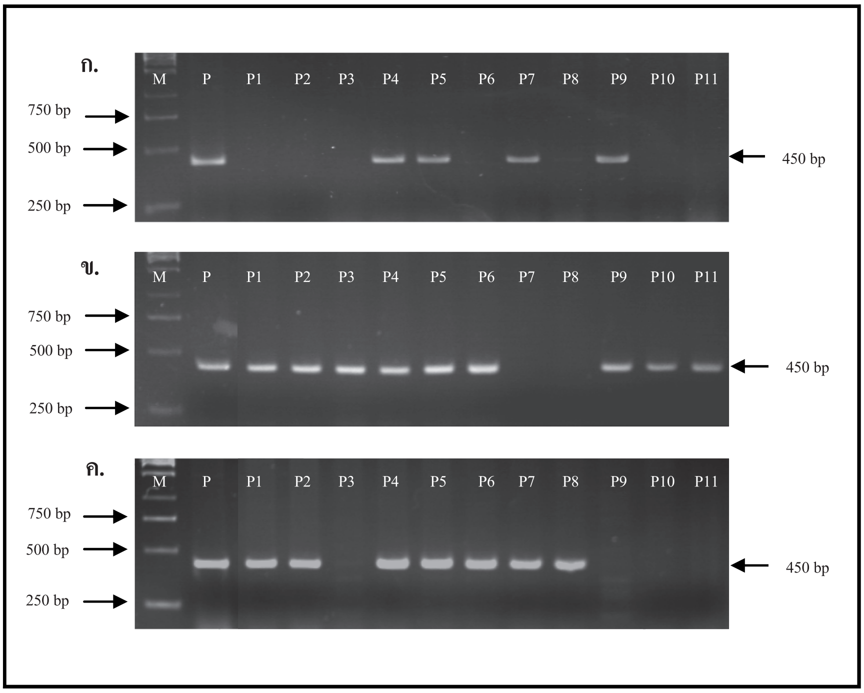
ภาพที่ 1 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 รุ่น R_4 ด้วยเทคนิค PCR

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder marker (Fermentas)

P : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 (positive control)

N : มะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P_{1-13} : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CMV L13-x-47 ต้นที่ 1-13



ภาพที่ 2 ผลการตรวจหายีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 รุ่น R_2 บางสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR (M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder marker (Fermentas), P : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1)

ก. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 3 ต้นที่ 1-11

ข. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 6 ต้นที่ 1-11

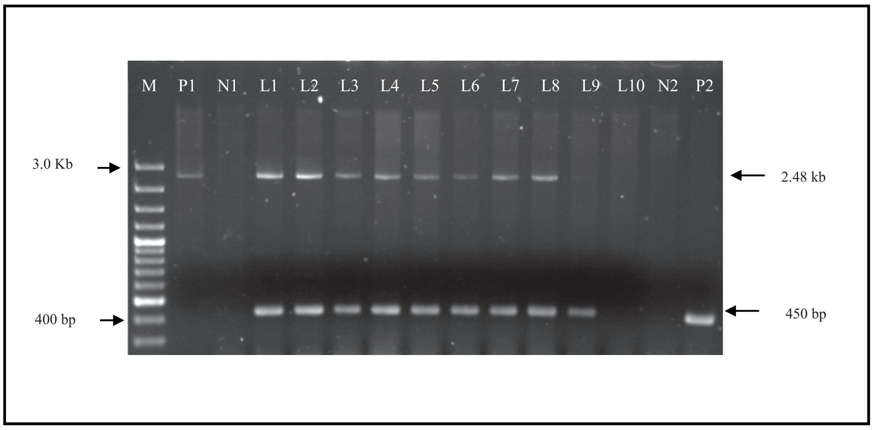
ค. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 7 ต้นที่ 1-11

การตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

ผลการนำมะเขือเทศที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อ CMV จำนวน 2 lines และมะเขือเทศที่มียีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของเชื้อ CaCV จำนวน 6 lines มาผสมสลับพ่อแม่ได้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรวมยีนทั้งหมด 24 คู่ผสม จากการตรวจสอบยีนมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมในคู่ผสมต่าง ๆนั้น พบว่า มีการถ่ายทอดยีนแตกต่างกันไป โดยพบทั้งต้นที่ไม่มียีน มีเพียงยีนเดียว และมีทั้งสองยีน (ภาพที่ 3)

เมื่อตรวจสอบผลของการรวมยีน โดยวิธีการผสมข้ามในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 685 ต้น ที่ได้จากทุกคู่ผสม พบว่า มีต้นมะเขือเทศที่ตรวจไม่พบยีน (transgene) จำนวน 266 ต้น คิดเป็น 38.83% ตรวจพบเพียงยีนเดียว เป็นยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์จำนวน 14 ต้น คิดเป็น 2.04% และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนจำนวน 158 ต้น คิดเป็น 23.07% รวมเป็นเปอร์เซ็นต์การตรวจพบยีนเดียว 25.11% และพบทั้งสองยีนจำนวน 247 ต้น คิดเป็น 36.06% (ตารางที่ 2)

ในการผสมสลับพ่อแม่นั้น เมื่อใช้มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 (replicase gene) เป็นต้นแม่พันธุ์ เปรียบเทียบทางสถิติกับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 (nucleocapsid protein gene) ที่ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์เช่นกันที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 22 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่า การใช้ต้นแม่พันธุ์ทั้งสอง ให้อัตราการรวมยีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นอัตราการถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ที่ใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นต้นแม่พันธุ์ ให้ผลการถ่ายทอดยีนแตกต่างจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 ด้วยเทคนิค PCR

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA ladder marker (Fermentas)

P_1 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์รุ่นพ่อ-แม่

N_1 : มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P_2 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนรุ่นพ่อ-แม่

N_2 : มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

L_{1-10} : มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม คู่ผสมระหว่าง line CMV L 13-x-47-22 กับ CaCV L7-2 ต้นที่ 1-10

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

Crosses	No. of plant	without transgene	transgene		
			rep.*	N**	rep.+N
L3-9 × L13-x-47-6	24	17	1	6	0
L3-9 ×L13-x-47-22	29	10	4	10	5
L6-1 × L13-x-47-6	29	29	0	0	0
L6-1 × L13-x-47-22	30	0	0	6	24
L6-4 × L13-x-47-6	21	20	0	1	0
L6-4 × L13-x-47-22	28	1	0	3	24
L6-6 × L13-x-47-6	25	24	0	1	0
L6-6 × L13-x-47-22	30	0	0	2	28
L7-2 × L13-x-47-6	27	0	0	13	14
L7-2 × L13-x-47-22	28	28	0	0	0
L7-6 × L13-x-47-6	30	5	0	11	14
L7-6 × L13-x-47-22	29	29	0	0	0
L13-x-47-6 × L3-9	29	12	2	12	3
L13-x-47-6 × L6-1	30	0	0	3	27
L13-x-47-6 × L6-4	29	0	0	8	21
L13-x-47-6 × L6-6	30	19	0	10	1
L13-x-47-6 × L7-2	30	0	0	17	13
L13-x-47-6 × L7-6	30	1	1	17	11
L13-x-47-22 × L3-9	30	13	5	11	1
L13-x-47-22 × L6-1	30	1	1	7	21
L13-x-47-22 × L6-4	28	28	0	0	0
L13-x-47-22 × L6-6	30	25	0	5	0
L13-x-47-22 × L7-2	30	3	0	4	23
L13-x-47-22 × L7-6	29	1	0	11	17
รวม	685	266(38.83)	14 (2.04)	158(23.07)	247 (36.06)

(_) แสดงเปอร์เซ็นต์

* rep. = ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์

** N = ยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบอัตราการถ่ายทอดยีนระหว่างการใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นแม่พันธุ์และมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นแม่พันธุ์

Crosses	No. of plant	Without transgene	Transgene		
			rep.	N	rep. + N
SD4 **× SD3*	330	163	5	53	109
mean	27.5	13.58	0.42	4.42	9.08
variable		149.35	1.35	22.08	123.9
SD3* × SD4**	355	103	9	105	138
mean	29.58	8.58	0.75	8.75	11.5
variable		110.08	2.2	28.02	103.9
t- test		0.5547^{NS}	2.1206***	0.6119^{NS}	-1.0753^{NS}

* SD3 = มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3

**SD4 = มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4

ตารางที่ 4 แสดงความถี่ของการถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์

	Transgenes			
	CACV* nucleocapsid protein gene		CMV** replicase gene	
line	A	a	B	b
47	-	-	0.375	0.635
6	0.647	0.353	-	-
7	0.423	0.577	-	-
3	0.262	0.738	-	-

* A=present target CACV band, a = absent target CACV band

** B=present target CMV band, b= absent target CMV band

การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 รุ่น R_4 ใน line CMV L 13-x-47 ที่มีอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อ-แม่ สู่รุ่นลูก 60.87% คำนวณหาค่าความถี่ของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (B) ได้ 0.375 และค่าความถี่ที่ตรวจไม่พบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (b) ได้ 0.635 ตรวจสอบยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 รุ่น R_2ใน line CaCV L 3, 6 และ 7 ที่มีอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อ-แม่ สู่รุ่นลูก คือ 44.4% , 87.5% และ 66.6% คำนวณหาค่าความถี่ของยีน

นิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (A) ได้ 0.262, 0.647 และ 0.423 ตามลำดับ และค่าความถี่ที่ตรวจไม่พบยีน

นิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (a) ได้ 0.738, 0.353 และ 0.577 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และจากค่าความถี่ที่ได้นำมาคำนวณหาอัตราการกระจายตัวของยีน (expectation data) ได้ดังตารางที่ 5

เปรียบเทียบค่าสังเกตที่ได้ จากผลของการตรวจสอบยีนทั้งสองในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 พบว่า ค่า chi square ที่ได้จากคู่ผสมทั้งสามแบบมีค่าเท่ากับ 0.651, 0.582 และ 0.314 มีค่าน้อยกว่า 7.82 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 3 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่า ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมมีการกระจายตัวของยีนทั้งสอง ในคู่ผสมทั้งสามแบบไม่แตกต่างจากอัตราการกระจายตัวของยีน จากค่าคำนวณได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น ไม่ว่าจะใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 lines ใดก็ตามเป็นคู่ผสมต่างให้ผลการกระจายตัวของยีนเหมือนกับอัตราการกระจายตัวของยีนที่ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่

สรุป

Ritpitakphong (2010) ได้ทำการประเมินความต้านทานมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต่อเชื้อ CMV ถึงรุ่นที่ R_3 โดยพบว่า มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CMV L13 ตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ด้วย PCR ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกต้น คิดเป็น 100% และคัดเลือกต้นที่ตรวจพบยีนได้ถึงรุ่นที่ R_3 คาดว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้เป็นสายพันธุ์แท้ แต่ในการทดลองนี้ได้นำมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CMV L 13-x-47 มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์พบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นที่ R_4 เท่ากับ 60.87% คาดว่า line CMV L 13-x-47 ไม่ได้เป็นสายพันธุ์แท้ เนื่องจากการตรวจสอบยีนด้วย PCR นั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้ (homozygous genotype) กับต้นที่ไม่ใช่สายพันธุ์แท้ (hemizygous genotype) ได้เหมือนเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีการข่มร่วมกัน (codominant marker) สามารถแยกต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้กับต้นไม่ใช่สายพันธุ์แท้ออกจากกันได้แต่การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพดี อีกทั้งมีกระบวนการยุ่งยาก ใช้เวลานาน และให้ผลแปรปรวนในแต่ละครั้ง (Peyachoknagul, 2009) จึงไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในตัวอย่างพืชที่มีปริมาณมากเช่นการทดลองนี้

ตารางที่ 5 แสดงการกระจายตัวของยีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 จากผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และค่าคาดหมายทางสถิติ

Crosses	Frequency of F_1 type* ob(ex)**				Chi	*P*-
(line)	AB	Ab	aB	ab	square	value
47×6 and 6×47	0.429(0.243)	0.003(0.132)	0.135(0.404)	0.433(0.221)	0.651	0.885
47×7 and 7×47	0.395(0.159)	0.004(0.216)	0.313(0.264)	0.288(0.361)	0.582	0.901
47×3 and 3×47	0.081(0.098)	0.107(0.277)	0.348(0.164)	0.464(0.461)	0.314	0.957

* A= present target CACV band, a = absent target CACV band, B=present target CMV band, b= absent target CMV band

**ob= observation data, ex= expectation data

การตรวจสอบพบยีนเรพลิเคส ที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CMV L 13-x-47 รุ่นที่ R_4 ที่พบเพียง 60.87% นั้นคาดว่าเกิดจากการคัดเลือกในรุ่นที่ R_1 ที่เป็นการคัดเลือกแบบกลุ่ม (family selection) โดยเก็บผลผลิตที่ได้ในรุ่นแรกแบบไม่แยกต้นจึงอาจทำให้เกิดการปะปนระหว่างเมล็ดที่เป็นสายพันธุ์แท้ เมล็ดที่ไม่ใช่สายพันธุ์แท้ และเมล็ดที่ไม่มียีน เมื่อคัดต้นที่ตรวจไม่พบยีนทิ้งไปด้วยเทคนิค PCR มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ที่เหลือเพื่อใช้เป็นต้นแม่จึงเป็นทั้งแบบ homozygous และ hemizygous แม้การผสมตัวเองในรุ่นถัดไปจะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่เป็น homozygous และ hemizygous ได้ก็ตาม แต่การคัดเลือกในครั้งนี้ เกิดจากการผสมตัวเองตามธรรมชาติ ไม่มีการกำจัดเกสรเพศผู้ แม้มะเขือเทศจะเป็นพืชผสมตัวเองโดยธรรมชาติ แต่สามารถเกิดการผสมข้ามได้ หากมะเขือเทศที่เป็นสายพันธุ์แท้ผสมกับมะเขือเทศที่ไม่ใช่สายพันธุ์แท้ จะสามารถตรวจพบยีนได้ทั้งหมดในมะเขือเทศรุ่นถัดไป แต่ในรุ่นต่อมาก็จะเกิดการกระจายตัวของยีนอีกครั้งดังผลที่แสดงให้เห็นในการตรวจสอบยีนในรุ่นที่ R_4 การคัดเลือกแบบแยกต้น (line selection) โดยคัดเลือกแต่ละต้นแยกจากกันในแต่ละรุ่น (Samphantharak, 2003) และมีขั้นตอนการกำจัดเกสรเพศผู้ร่วมด้วยนั้นจะเพิ่มค่าความถี่ของต้นที่เป็นชนิดพันธุ์แท้มากขึ้น และเข้าสู่สายพันธุ์แท้ในที่สุด

การรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในต้นมะเขือเทศสามารถดำเนินการได้หลายวิธี แต่การทดลองในครั้งนี้เลือกวิธีการรวมยีนแบบผสมข้ามเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด (Francois *et al*., 2002) ส่วนการถ่ายยีนซ้ำ (re-transformation) หรือการถ่ายยีนหลาย ๆ ยีนพร้อมกันเพียงครั้งเดียว (co-transformation) อาจไม่จำเป็นในกรณีที่มีพ่อและแม่พันธุ์เป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมอยู่แล้ว และมะเขือเทศเป็นพืชที่ผสมข้ามได้ ต่างจากพืชบางชนิดที่ไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด อีกทั้งในบางกรณีพบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังที่พบในการรวมยีนเรพลิเคสของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและไวรัสใบด่างแตงในครั้งเดียวแบบหลายพลาสมิด (multiple-plasmid co-transformation) ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ซึ่งมีมะเขือเทศรวมยีนในอัตรา 32.26% (Tiratanakul, 2004)

อย่างไรก็ดี การผสมข้ามเพื่อรวมยีนหากพ่อแม่พันธุ์มีพันธุกรรมที่แตกต่างกันมาก ลูกผสมที่ได้แม้จะมียีนที่ต้องการซึ่งได้จากทั้งต้นพ่อและต้นแม่ แต่ผลที่เกิดจาก linkage effect จะทำให้ลูกผสมเหล่านั้นได้ยีนที่มีลักษณะที่ไม่ต้องการติดมาด้วย และถ้าหากจำนวนยีนที่ต้องการรวบรวมมีมากขึ้นและพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้แตกต่างกัน ลูกผสมที่ได้ ก็จะมีลักษณะที่ไม่ต้องการติดมามากขึ้นด้วยเช่นกัน (Halpin, 2005;Douglas and Halpin, 2010)แต่ในการรวมยีนแบบผสมข้าม ระหว่างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 นั้น เนื่องจากได้รับการพัฒนาพันธุ์จากพ่อและแม่พันธุ์กลุ่มเดียวกัน จึงไม่มีปัญหาในเรื่องของการผสมติด การพัฒนาของผลและเมล็ด และการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ อีกทั้งเป็นมะเขือเทศพันธุ์การค้าที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน ลักษณะที่ผู้บริโภคไม่ต้องการจึงถูกคัดทิ้งตั้งแต่เริ่มมีการพัฒนาสายพันธุ์ (Sitadhani *et al*., 1994) หากสามารถรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้มากขึ้นกว่าเดิมจะได้สายพันธุ์มะเขือเทศที่เป็นประโยชน์ตรงตามความต้องการของตลาด

ผลการรวมยีนมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้นำไปวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของยีนด้วยวิธีทางสถิติพบว่า เป็นไปตามค่าคาดหมาย การกระจายตัวของยีนทั้งสองในรุ่นลูก (F_1) เป็นไปตามค่าความถี่ของการถ่ายทอดยีนในรุ่นพ่อแม่ อย่างไรก็ดีการกระจายตัวของยีนที่ได้นั้นไม่ตรงตามอัตราส่วนของเมนเดล (ตารางที่ 5) โดยหากพ่อและแม่พันธุ์เป็นสายพันธุ์แท้ ลูก (F_1) ที่ได้จะมีจีโนไทป์เพียงแบบเดียว คือ AB ซึ่งเป็นจีโนไทป์แบบ hemizygous เมื่อตรวจสอบยีนทั้งสองด้วย PCR จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอในรุ่นลูกทุก ๆ ต้น (Datta *et al*., 2002) แต่จีโนไทป์ที่ได้จากการผสมข้ามในครั้งนี้มีถึงสี่แบบ คือ AB, Ab, aB และ ab ทั้งนี้เนื่องจาก มะเขือเทศที่ใช้เป็นทั้งพ่อและแม่พันธุ์ นั้นไม่ได้เป็นสายพันธุ์แท้ แต่มีลักษณะเป็นแบบ hemizygous ซึ่งในพืชดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิดพบการกระจายตัวของยีนทั้งที่เป็นไปตามกฎและไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล โดยมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง ทั้ง

ปัจจัยหลัก คือ ตำแหน่งที่ชิ้นส่วนยีนแทรกอยู่ และปัจจัยอื่นๆ เช่น จำนวนชุดของยีน (copy number) วิธีการถ่ายยีน รวมไปถึงความไม่คงตัวของชิ้นส่วนยีนเอง (Yin *et al.*,2004)

การทดลองในครั้งนี้สามารถรวมยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากเชื้อ CMV กับยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนที่ได้จากเชื้อ CaCV โดยวิธีการผสมข้ามของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 จากรุ่นพ่อ-แม่สู่มะเขือเทศรุ่นลูกได้ ในอัตราการถ่ายทอดทั้งสองยีนที่ 36.06% โดยไม่พบความแตกต่างของอัตราการถ่ายทอด ทั้งสองยีนเมื่อผสมสลับพ่อและแม่พันธุ์ อย่างไรก็ดีการรวมยีนในครั้งนี้ ได้ทดสอบในมะเขือเทศรุ่นที่ 1 เท่านั้น การคัดเลือกแบบต้นเดี่ยว ในรุ่นถัดไปพร้อมทั้งการตรวจสอบยีนทั้งสองด้วยวิธี PCR และการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด (bioassay) ควบคู่กันไป จะทำให้ได้มะเขือเทศรวมยีนที่เข้าสู่สายพันธุ์แท้ในที่สุด การทำ Southern hybridization จะทำให้ทราบถึงการกระจายตัวของยีนทั้งสองในรุ่นลูก จำนวนชุดของยีน และหาตำแหน่งของยีนที่สอดแทรกบนจีโนมได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และ International Service for the Acquisition for Agri-biotec Applications (ISAAA) ที่ให้งบประมาณและสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Attathom, S., P. Chiemsombat, T. Sutabutra and R. Pongpanitanond. 1990. Characterization of nucleic acid of *Tomato yellow leaf curl virus*. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 24 (5) : 1-5.

Attathom, S., P. Chiemsombat, T. Attathom, W. Kositratana, T. Sutabutra, P. Siriwonge and N. Sae-ung.1992. Production of disease resistant tomato by gene transfer technique. *In* Proceeding of the 30th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok,Thailand.p.193-200.(in Thai)

Attathom, S., P. Chiemsombat, W. Kositratana and N. Sae-ung.1994.Complete nucleotide sequence and genome analysis of bipartite tomato yellow leaf curl virus in Thailand. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 28 : 632-639.

Attathom, S., A. Boonchot, C. Pitaksutheepong and P. Chiemsombat.2005. Yield loss assessment of tomatoes infected with *Cucumber mosaic virus*. Agricultural Sci. J. 36 (5-6) : 337-341. (in Thai)

Attathom, S. 2009. Virus diseases of plants. Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 216p. (in Thai)

Bhunchoth, A. 2001. Transformation of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with the Defective Replicase Gene of *Cucumber Mosaic Virus*. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Charoen-aem, T.2009. Establishment of Homozygous Line in Transgenic Tomato Resistant to *Tomato Yellow Leaf Curl Thailand Virus*. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Chiemsombat, P., O. Gajanandana, R. Hongprayoon, W. Seetou, A. Bhunchoth, N. Warin , P. Petchsoongnern and C. Seepiban. 2006. Diversity of tospoviruses in Thailand and their potential thrips vectors. *In* Proceeding of the 44th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand. p.42-48. (in Thai)

Chiemsombat, P. and S. Adkins. 2008. Tospovisuses. pp. 1-37. *In* G.P. Rao, P.L. Kumar and R.J. Holguin-Pena (*eds*). Characterization, Diagnosis & Management of Plant Viruses. Studium Press LLC, Texas, USA.

Datta, K., N. Baisakh, K. Maung Thet, J. Tu and S.K. Datta. 2002. Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight. Theor. Appl. Genet. 106 : 1-8.

Douglas, E. and C. Halpin. 2010. Gene stacking. pp. 613-629. *In* S.M. Jain and D.S. Brar (*eds*). Molecular techniques in crop improvement. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.

Francois, I. E.J.A., W.F. Broekaert, and B. P.A. Cammue. 2002. Different approaches for multi-transgene-stacking in plant. Plant Science. 163 : 281-295.

Fulton, T.M., J. Chunwongs and S.D. Tanksley. 1995. Miniprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Mol. Biol. Rep. 13(3) : 207-209.

Hanssen, I.M., M. Lapidot and B.P.H.J. Thomma. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. MPMI. 23(5) : 539-548.

Halpin, C. 2005. Gene stacking in transgenic plants: the challenge for 21st century plant biotechnology. Plant Biotechnol. J. 3: 141-155.

Khetarpal, R.K., B. Maisonneuve, Y. Maury, B. Chalhoub, S. Dinant, H. Lecoq and A. Varma. 1998. Breeding for resistance to plant viruses. pp. 14-32. *In* A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (*eds*). Plant Virus Disease Control. The American Phytopathological Society, USA.

Peyachoknagul, S. 2009. DNA markers : basic of knowledge to application. Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok. 269p. (in Thai)

Piamjit, P. 2000. Inheritance of *Tomato yellow leaf curl virus* coat protein gene in transgenic tomato. M.S. Thesis, Kasetsart University.

Powell-Abel, P., R.S. Nelson, B. De, N. Hoffman, N.G. Rogers, R.T. Fraley and R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science. 232 : 738-743.

Ritpitakphong, U. 2010. Evaluation of Transgenic Tomato for *Cucumber mosaic virus* Resistance. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Rochester , D.E., J. J. De Paulo, C.M. Fauquet and R.N. Beachy. 1994. Complete nucleotide sequence of the geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus*, Thailand isolate. J. Gen. Virol. 75 : 477-485.

Samphantharak, K. 2003. Plant breeding : basic of knowledge, method and idea. Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok. 237p. (in Thai)

Seepiban, C., O. Gajanandana, T. Attathom and S. Attathom. 2011. *Tomato necrotic ringspot virus*, a new tospovirus isolated in Thailand. Arch. Virol. 156 : 263-274.

Sitadhani, K., T. Krutrungsit, T. Kasirawat, C. Duangta, D. Chirasanchai, P. sema, T. Bupphaprasert and W. Saswittaya. 1994. Improvement on heat tolerant tomato small fruit size pink color for fresh market. *In* the 2nd Symposium on Vegetable and Legume Research. Tropical Vegetable Research Center, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. p. 1-12. (in Thai)

Slater, A., N. Scott, and M. Fowler. 2003. Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants. Oxford University Press Inc., New York, USA.

Supapanyapong, P. 2006. Tomato Transformation with Rep Gene of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* Using ipt-type MAT Vector. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Sutabutra, T. 1989. Virus and virus-like diseases of economic crops in Thailand. Funny publishing, Bangkok. 310p. (in Thai)

Taverniers, I., N. Papazova, Y. Bertheau, M. De Loose and A. Holst-Jensen. 2008. Gene stacking in transgenic plants: towards compliance between definitions, terminology, and detection within the EU regulatory framework. Environ. Biosafety Res. 7 : 197-218.

Tiratanakul, V. 2004. Transformation of Seedathip 3 Tomato with Replicase Genes from *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* and *Cucumber Mosaic Virus*. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Veneble, W.N., D.N. Smith and The R Development Core Team. 2009. An Introduction to R : A programming environment for data Analysis and Graphic Version 2.10.1 Bistol Network Theory Ltd.

Walsh, J.A. 2000. Transgenic approaches to disease resistant plants as exemplified by viruses. pp. 218-252. *In* M. Dickinson and J. Beynon (*eds*). Molecular Plant Pathology. Sheffield Academic Press Ltd, England.

Yie, Y. and P. Tien. 1998. Controlling mosaic virus diseases under field conditions using multiple gene strategies in transgenic plants. pp. 129-141. *In* A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa (*eds*). Plant Virus Disease Control. The American Phytopathological Society, USA.

Yin, Z., W. Plader and S. Malepszy. 2004. Transgene inheritance in plants. J. Appl. Genet. 45(2) : 127-144.