



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การรวมยีนต้านทานโรคไวรัสในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม

Gene Stacking for Virus Resistance in Transgenic Tomatoes

นามผู้วิจัย นายปณิธิ ผลบังเกิด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์สุพรรณ อรรถธรรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สุจินต์ ภัทรภูวดล, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การรวมยีนต้านทานโรคไวรัสในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

Gene Stacking for Virus Resistance in Transgenic Tomatoes

โดย

นายปณิธิ ผลบังเกิด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปณิธิ ผลบังเกิด 2555: การรวมยีนต้านทานโรคไวรัสในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
ศาสตราจารย์สุวัฒน์ อรรถธรรม, Ph.D. 82 หน้า

โรคไวรัสเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศลดลง การใช้มะเขือเทศ
ดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานโรคไวรัสจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจมาใช้ในการควบคุมโรค
ไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามก็ยังมีมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์หนึ่งจะสามารถ
ต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้เพียงหนึ่งชนิดเท่านั้น มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสที่
ได้รับยีนมากกว่าหนึ่งยีนขึ้นไปสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด
การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางการรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคไวรัส
ในมะเขือเทศ โดยการผสมสลับพ่อแม่ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีน
เรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของไวรัสใบด่างแฉก (*Cucumber mosaic virus-CMV*) กับมะเขือเทศพันธุ์
สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของไวรัสสาเหตุโรคยอดไหม้ (*Capsicum
chlorosis virus-CaCV*) ผลการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ
เจาะจงต่อยีนทั้งสอง พบว่า จากมะเขือเทศลูกผสม 685 ต้น มียีนทั้งสองอยู่ด้วยกัน 247 ต้น
(36.06%) ตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์หรือยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนอย่างใดอย่างหนึ่ง
172 ต้น (25.11%) และไม่พบยีนดังกล่าว 266 ต้น (38.83%) แสดงให้เห็นว่าการผสมสลับพ่อแม่
สามารถรวมยีนที่ถ่ายให้มะเขือเทศในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมได้ ต้นมะเขือเทศรวมยีน
ดัดแปลงพันธุกรรมมีลักษณะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากมะเขือเทศดัดแปลง
พันธุกรรมชนิดยีนเดี่ยวและมะเขือเทศสายพันธุ์เดิม

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Paniti Pornbungkerd 2012: Gene Stacking for Virus Resistance in Transgenic Tomatoes. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Professor Supat Attathom, Ph.D. 82 pages.

Virus diseases are one of the important limiting factors in tomato production. Genetically modified tomatoes can be used to effectively control viral infections. However resistance in transgenic tomato is shown to be virus specific. Gene stacking is an alternative approach to develop tomato lines with multiple viral resistance. This study was aimed to stack two genes, the CMV replicase and CaCV nucleocapsid protein conferring resistance to CMV and CaCV, respectively, into cultivated tomato. These two genes were previously transformed to Seedathip 3 and Seedathip 4 varieties, respectively, by *Agrobacterium*. Reciprocal crossing between transgenic Seedathip 3 and Seedathip 4 tomatoes resulted in transgenic segregation in progeny seedlings as detected by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for 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 and 266 lines (38.83%) were without transgene. This study showed that stacking of transgenes in tomatoes can be successfully accomplished by reciprocal crossing. Tomato lines with stacking genes showed no significance difference on horticultural characters as compared with singly transformed lines and original parental lines.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.สุวัฒน์ อรรถธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร.สุจินต์ ภัทรภูวดล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร ตั้งกิจโชติ ประธานการสอบ และดร.ปาริชาติ เบิร์นส ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต และผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณชาญณรงค์ ศรีภิบาล และคุณอัญญรัตน์ ฤทธิ์พิทักษ์พงศ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ เสมอมา

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และขอขอบคุณ International Service for the Acquisition for Agri-biotech Applications (ISAAA) ที่ให้งบประมาณและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณทุกคนในครอบครัวที่ช่วยสนับสนุนทุนในการศึกษา และเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา ขอขอบคุณความช่วยเหลือและกำลังใจจากทุกๆคนที่มีส่วนสำคัญที่ทำให้การศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ปณิธิ ผลบังเกิด

ตุลาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	26
ผลการทดลอง	26
วิจารณ์ผลการทดลอง	54
สรุปและข้อเสนอแนะ	61
สรุป	61
ข้อเสนอแนะ	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	63
ภาคผนวก	74
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน	19
2	ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (rep gene) และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (N gene) ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR	31
3	ผลการเปรียบเทียบอัตราการถ่ายทอดยีนระหว่างการใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นแม่พันธุ์กับมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นแม่พันธุ์	32
4	แสดงความถี่ของการถ่ายทอดยีนทั้งสองในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์	33
5	แสดงการกระจายตัวของยีนทั้งสองในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F ₁	34
6	ผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV และ CaCV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F ₁	47
7	แสดงลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม	53
ตารางผนวกที่		
1	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ด้วยเทคนิค ELISA	75
2	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F ₁ ภายหลังจากปลูกเชื้อ CaCV สายพันธุ์ KK ด้วยเทคนิค ELISA	76
3	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F ₁ ภายหลังจากปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS ด้วยเทคนิค ELISA	77
4	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV และ CMV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F ₁ ด้วยเทคนิค ELISA	78

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลการตรวจหาชิ้นเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 รุ่น R ₄ ด้วยเทคนิค PCR	27
2	ผลการตรวจหาชิ้นนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม พันธุ์สีดาทิพย์ 4 รุ่น R ₂ บางสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR	28
3	ผลการตรวจหาชิ้นเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และชิ้นนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนใน มะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F ₁ ด้วยเทคนิค PCR	30
4	ผลการตรวจหาชิ้นนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม พันธุ์สีดาทิพย์ 4 line CaCV L6 ด้วยเทคนิค PCR	35
5	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ด้วยเทคนิค ELISA	36
6	ผลการตรวจหาชิ้นเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และชิ้นนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนใน มะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F ₁ ที่ทำการทดสอบความต้านทานโดย การปลูกเชื้อ CaCV , CMV และทั้งสองชนิดพร้อมกันด้วยเทคนิค PCR	38
7	อาการของต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ CaCV สายพันธุ์ KK เป็นเวลา 14 วัน	39
8	อาการของต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 21 วัน	40
9	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วันใน มะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA	42
10	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 21 วันใน มะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA	43
11	ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV และ CMV หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 และ 21 วันในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA	44
12	ต้นมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ CaCV สายพันธุ์ KK เป็นเวลา 14 วัน	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ต้นมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูก เชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 21 วัน	46
14	ผลการตรวจหา ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนใน มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (bulk) บางตัวอย่างที่ทำการทดสอบ ลักษณะประจำพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR	49
15	รูปร่างผลของมะเขือเทศแบบต่างๆ ที่พบในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3, 4 และในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม	51
16	เปรียบเทียบสีผลของมะเขือเทศที่พบในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3, 4 และในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม	52
ภาพผนวกที่		
1	ตัวอย่าง parameter file ที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักผลเฉลี่ย (กรัม) และขนาด ผล(shape index; Z) ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม	79

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

aa	=	amino acid
anti-CMV	=	antibody ต่อเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i>
bp	=	base pair
CaCV	=	<i>Capsicum chlorosis virus</i>
CaCV L 3-9	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₂ ต้นที่ 9 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-3 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน
CaCV L 6-1	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₂ ต้นที่ 1 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน
CaCV L 6-4	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₂ ต้นที่ 4 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน
CaCV L 6-6	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₂ ต้นที่ 6 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน
CaCV L 7-2	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₂ ต้นที่ 2 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-7 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน
CaCV L 7-6	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₂ ต้นที่ 6 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-7 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน
CMV	=	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CMV L 13-x-47-6	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₄ ต้นที่ 6 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L 13-x-47 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ (ต่อ)

CMV L 13-x-47-22	=	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₄ ต้นที่ 22 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดที่ได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L 13-x-47 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์
CTAB	=	cetyl trimethylammonium bromide
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
F ₁	=	the first filial generation from a cross mating of different parental types
kb	=	kilobase
MYSV 6	=	antibody ต่อเชื้อ <i>Melon yellow spot virus</i>
N gene	=	nucleocapsid protein gene
nm	=	nanometer
rep gene	=	replicase gene
OD 405nm	=	optical density at 405 nanometer wavelength
PCR	=	polymerase chain reaction
R ₁	=	the first filial generation from self-pollination
R ₂	=	the second filial generation from self-pollination
R ₃	=	the third filial generation from self-pollination
R ₄	=	the fourth filial generation from self-pollination
SD3	=	มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3
SD4	=	มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
χ^2	=	Chi-square test

การรวมยีนต้านทานโรคไวรัสในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

Gene Stacking for Virus Resistance in Transgenic Tomatoes

คำนำ

มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย นอกจากนำมาใช้ในการประกอบอาหารแล้วมะเขือเทศยังถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้อีกหลากหลายชนิด มีการปรับปรุงมะเขือเทศพันธุ์รับประทานสดให้เป็นพันธุ์ทนร้อนสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี มีลักษณะผลตรงตามความต้องการของตลาด ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 1-4 และพันธุ์ลูกผสมสีดาทิพย์ 91 (กรุง และคณะ, 2537)

ปัญหาสำคัญของการปลูกมะเขือเทศ คือ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่สร้างความเสียหายอย่างมาก โดยทำให้ผลผลิตลดลงหรือคุณภาพของผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน และการป้องกันกำจัดทำได้ยาก โรคไวรัสสำคัญที่พบในประเทศไทย ได้แก่ โรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่เกิดจาก *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Attathom *et al.*, 1990; Attathom *et al.*, 1994; Rochester *et al.*, 1994) โรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดงที่เกิดจาก *Cucumber mosaic virus* (CMV) (สุพัฒน์ และคณะ, 2548) โรคใบด่างที่เกิดจาก *Tobacco mosaic virus* หรือ *Tomato mosaic virus* (ธีระ, 2532) และโรคยอดไหม้ที่เกิดจาก *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ซึ่งพบแพร่ระบาดอย่างมากในมะเขือเทศที่ปลูกในสภาพโรงเรือนและแปลงปลูก (พิศสุวรรณ และคณะ, 2549; Chiemsombat and Adkins, 2008 ; Hanssen *et al.*, 2010; Seepiban *et al.*, 2011)

การควบคุมและป้องกันกำจัดโรคไวรัสมีหลายวิธีด้วยกัน วิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง คือ การสร้างพืชต้านทานไวรัสโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมหรือการถ่ายยีน (Powell-Abel *et al.*, 1986; Slater *et al.*, 2003) เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานไวรัสแบบดั้งเดิมมีข้อจำกัดคือ แหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานไวรัสในพืชเองนั้นมีน้อยมากหรือไม่มีเลย และยีนต้านทานส่วนใหญ่มักไม่แสดงออกในกรณีที่พืชถูกเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงเข้าทำลาย (Khetarpal *et al.*, 1998) การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมมีการนำยีนหรือสารพันธุกรรมที่ได้จากจีโนมของเชื้อไวรัสมาสร้างความต้านทานให้แก่พืช (pathogen-derived resistance) เช่น ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) แซทเทลไลท์ อาร์เอ็นเอ (satellite RNA) ยีนโปรตีนเคลื่อนย้ายอนุภาค (movement protein) ยีนเรพลีเคส (replicase) หรือยีนอื่นๆ ของไวรัส เป็นต้น (สุพัฒน์, 2552; Walsh, 2000)

ในประเทศไทยมีรายงานการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างมะเขือเทศคัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อเชื้อ TYLCV เป็นครั้งแรกโดยใช้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (สุพัฒน์ และคณะ, 2535) พบการแสดงออกของยีนและสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ (Piamjit, 2000) หรือการใช้ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (วรพงศ์, 2547; ภัทรพร, 2549) ที่สามารถถ่ายทอดยีนได้ถึงรุ่นที่ 6 และต้านทานต่อโรคได้ดี (ทศพล, 2552) สำหรับเชื้อ CMV มีการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์เข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 (อัญญา, 2544; วรพงศ์, 2547) สามารถถ่ายทอดยีนสู่รุ่นลูกได้จนถึงรุ่นที่ 3 และสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสได้ดีเช่นกัน (อัญญรัตน์, 2553)

แม้ว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจะมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันและควบคุมโรคไวรัส แต่พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสเพียงชนิดเดียวที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ (Yie and Tien, 1998) ขณะที่ในแปลงปลูกมักพบการระบาดของเชื้อไวรัสแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ หรือมีการระบาดของเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป (mixed viral infection) การใช้พืชต้านทานไวรัสที่ได้รับยีนมากกว่าหนึ่งยีนขึ้นไป (gene stacking) จะทำให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากชนิดขึ้น (Halpin, 2005)

การรวมยีน (gene stacking) คือ การเพิ่มยีน (transgenes) ที่ถ่ายให้กับพืชตั้งแต่สองยีนขึ้นไปเข้าสู่จีโนมของพืช เพื่อให้พืชคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้มีการแสดงออกของหลายลักษณะตามที่ต้องการ การรวมยีนถูกนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น ควบคุมแมลงศัตรูพืช วัชพืช และเชื้อสาเหตุโรคพืช รวมไปถึงเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชด้วยการผลิตพืชให้มียีนต้านทานไวรัสมากกว่าหนึ่งยีนได้จาก การผสมข้ามระหว่างพืชที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว การถ่ายยีนซ้ำ (re-transformation) หรือการถ่ายยีนที่มียีนมากกว่าหนึ่งยีนในครั้งเดียว (co-transformation) (Francois *et al.*, 2002; Taverniers *et al.*, 2008; Douglas and Halpin, 2010)

การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางการรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคไวรัสในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของไวรัสใบด่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV (วรพงศ์, 2547) และผ่านการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV ในมะเขือเทศรุ่นที่ R₁-R₃ (อัญญรัตน์, 2553) โดยวิธีการผสมข้ามกับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวเคลีโอแคปซิดโปรตีนของโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาแนวทางการรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคไวรัสในมะเขือเทศโดยวิธีการผสมข้ามของมะเขือเทศสองสายพันธุ์จากรุ่นพ่อ-แม่สู่มะเขือเทศรุ่นลูก
2. ประเมินความต้านทานของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการรวมยีนต่อโรคใบค่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV และ โรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV
3. ประเมินผลของการรวมยีนที่มีต่อลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศเปรียบเทียบกับมะเขือเทศที่ไม่มียีนทั้งสอง

การตรวจเอกสาร

ลักษณะของมะเขือเทศ

มะเขือเทศ เป็นพืชในวงศ์ Solanaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum lycopersicon* เป็นพืชล้มลุกอายุ 1 ปี เติบโตเร็ว รากเป็นระบบรากแก้ว ลำต้นมีขนปกคลุม มีกลิ่นเฉพาะตัว ใบหยักเว้า ลักษณะเป็นใบรวมประกอบด้วยใบอ่อน 7-9 ใบ ดอกสีเหลือง รูปดาว ผลเป็นแบบเบอร์รี่ ผลอาจมีรูปร่างกลมหรือรี สีเหลือง ส้ม หรือแดงซึ่งเกิดจากเม็ดสีจำพวก lycopene และ carotene (ส่วนวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ ธนาคารกสิกรไทย, 2531; สมภพ, 2530) มะเขือเทศเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ มะเขือเทศผลส่งโรงงานอุตสาหกรรม และมะเขือเทศผลรับประทานสด (สุกัลักษณ์, 2536; กรุง, 2543) พันธุ์มะเขือเทศผลส่งโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักจะเป็นพันธุ์ที่ส่งเข้ามาจากต่างประเทศ ส่วนพันธุ์มะเขือเทศผลเล็ก สีส้มพุ่มกึ่งนิยมในการบริโภคสด พันธุ์มะเขือเทศที่มีแพร่หลายที่เป็นชนิดผลเล็ก สีส้มพุ่ม ได้แก่ พันธุ์สีดา สีดาทิพย์ สีดาห้านฉัตร และสีดาห้วยทราย เป็นต้น

สำหรับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์นั้นเป็นมะเขือเทศที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ให้มีลักษณะทนต่ออากาศร้อนในประเทศไทยเพื่อแก้ไขปัญหาการไม่ติดผลของมะเขือเทศ พันธุ์มะเขือเทศทนร้อนที่มีลักษณะผลสีชมพูคล้ายพันธุ์สีดามีทั้งพันธุ์แท้ คือ สีดาทิพย์ 1, สีดาทิพย์ 2, สีดาทิพย์ 3, สีดาทิพย์ 4 และพันธุ์ลูกผสมสีดาทิพย์ 92 ซึ่งมีลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างกัน (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2551)

มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นมะเขือเทศพันธุ์ผลสดเปิด ลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเลื้อย ผลรูปไข่ สีส้มพุ่ม ผลไม่แตก ขนาดผลโดยเฉลี่ยประมาณ 20-22 กรัม ทนอากาศร้อนได้ดีมาก สำหรับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นมะเขือเทศพันธุ์แท้เช่นกัน ลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเลื้อย ผลรูปไข่ให้ผลขนาดใหญ่กว่าพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และผลสวยกว่าพันธุ์สีดาทิพย์ 2 สีส้มพุ่ม ขนาดผลโดยเฉลี่ยประมาณ 25 กรัม ทนอากาศร้อนได้ดีกว่าพันธุ์สีดาทิพย์ 2 (กรุง และคณะ, 2537)

โรคไวรัสที่สำคัญบางชนิดของมะเขือเทศ

การปลูกมะเขือเทศยังคงพบปัญหาการรบกวนจากโรคและแมลงศัตรูมะเขือเทศ โดยเฉพาะโรคไวรัส โรคมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อไวรัสเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกและการผลิตมะเขือเทศมากหากเปรียบเทียบกับโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากมะเขือเทศเป็นพืชที่ค่อนข้างอ่อนแอ ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชได้เกือบทุกชนิด (ศักดิ์, 2537) โรคมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อไวรัสป้องกันและรักษาได้ยากเนื่องจากมีการถ่ายทอดของโรคผ่านแมลงพาหะ โรคไวรัสที่สำคัญของมะเขือเทศที่พบในประเทศไทย เช่น โรคใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจาก *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) โรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดงที่เกิดจาก *Cucumber mosaic virus* (CMV) และโรคยอดไหม้ที่เกิดจาก *Tospovirus* serogroup IV เป็นต้น

1. โรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดง

1.1 ลักษณะอาการของโรค

โรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดงที่เกิดจาก *Cucumber mosaic virus* (CMV) เป็นโรคสำคัญของมะเขือเทศที่ปลูกในเขตร้อนทั่วไป การเกิดโรคนี้เกิดขึ้นกับมะเขือเทศทุกระยะการเจริญเติบโตโดยเฉพาะระยะต้นกล้าซึ่งเป็นระยะที่อ่อนแอที่สุด (ศักดิ์, 2537) มะเขือเทศที่ปลูกเป็นการค้าทั่วไปมักถูก CMV เข้าทำลาย โดยเฉพาะมะเขือเทศพันธุ์สีดา พันธุ์ L22 และพันธุ์วีเอฟ 145 (ธีระ, 2532)

โรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดง ลักษณะอาการที่พบโดยทั่วไป มะเขือเทศจะแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบลดขนาดกว่าปกติ ถ้าพืชแสดงอาการรุนแรงใบจะมีลักษณะเรียวยาว เหลือแต่เส้นกลางใบทำให้มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายหรือเชือกผูกกรองเท้า (fern leaf หรือ shoe string) (ธีระ, 2532; ศุภลักษณ์, 2536) ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 จะเกิดอาการต่างที่ใบยอดใบย่อยจะแสดงอาการลดรูปบิดเบี้ยวจนมีลักษณะเรียวยาวเช่นกัน ต่อมาต้นจะแคระแกร็นทำให้ลักษณะของต้นเป็นพุ่มเตี้ย (สุพัฒน์ และคณะ, 2548) ในต้นแก่อาการจะไม่รุนแรงเท่าที่เกิดในต้นอ่อนและต้นที่อยู่ในช่วงกำลังเจริญเติบโต โดยต้นที่แสดงอาการของโรคยังคงออกดอก

แต่ช่อดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกลดขนาดกว่าปกติ นอกจากนี้ยังส่งผลให้ผลผลิตลดลงกว่าปกติ 2.4 ถึง 3.4 เท่าเมื่อคิดน้ำหนักผลต่อต้น (ศักดิ์, 2537; สุพัฒน์ และคณะ, 2548)

1.2 เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดง

Cucumber mosaic virus (CMV) จัดอยู่ในวงศ์ Bromoviridae สกุล *Cucumovirus* เชื้อไวรัสชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้างมาก พบว่ามีพืชมากกว่า 9 วงศ์ รวมกว่า 800 ชนิดที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุนี้ เช่น พืชในวงศ์ Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae-Papilionoideae และ Solanaceae เป็นต้น (plant viruses online, 2008) อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 29 นาโนเมตร รูปร่างทรงกลม ไม่มีเยื่อหุ้ม (no envelope) มีสารพันธุกรรมเป็นแบบ single-stranded RNA สายบวก ขนาดจีโนมประมาณ 8,621 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ชิ้นส่วน RNA 1 ขนาด 3,389 นิวคลีโอไทด์ ชิ้นส่วน RNA 2 ขนาด 3,035 นิวคลีโอไทด์ และชิ้นส่วน RNA 3 ขนาด 2,197 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังประกอบด้วย subgenomic RNA ได้แก่ RNA 4 และ RNA 4A จีโนมไวรัสสามารถแปลรหัสให้ทั้งโปรตีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนหุ้มอนุภาคและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่กับโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (Brunt *et al.*, 1990; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2008) ชิ้นส่วน RNA1 แปลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์เรพลีเคส ชิ้นส่วน RNA2 แปลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์เรพลีเคสและโปรตีน 2b ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ subgenomic RNA 4A และกระบวนการยับยั้งการเกิด gene silencing ของพืช และชิ้นส่วน RNA3 แปลรหัสโปรตีน 3a ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และโปรตีนหุ้มอนุภาค (coat protein) รวมถึงการแสดงออกของ subgenomic RNA 4 (Brunt *et al.*, 1990; Brunt *et al.*, 1996; Morrioni *et al.*, 2008) นอกจากนี้จากการศึกษาโดยอาศัยความรู้ด้านชีววิทยา ชีวเคมี และคุณสมบัติด้านชีวโมเลกุล สามารถแบ่ง CMV ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ subgroup I และ subgroup II (Morrioni *et al.*, 2008)

CMV สามารถถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีการหรือการสัมผัส เมล็ดพันธุ์และแมลงพาหะในวงศ์ Aphididae มากกว่า 60 ชนิดรวมทั้งเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) และเพลี้ยอ่อนถั่ว (*Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*) โดยความสัมพันธ์ของเชื้อกับแมลงพาหะเป็นแบบ non-persistent (ธีระ, 2532; Brunt *et al.*, 1996)

2. โรคยอดไหม้

2.1 ลักษณะอาการของโรค

โรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อทอสปอไวรัสเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญกลุ่มหนึ่งซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตพืชหลายชนิด เชื้อไวรัสกลุ่มนี้มีพืชอาศัยที่ค่อนข้างกว้างและส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ในปัจจุบันเชื้อทอสปอไวรัสส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ใน serogroup IV โดยเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) พบทั้งในพริก มะเขือเทศ และถั่วลิสง (สุรศักดิ์, 2550)

มะเขือเทศที่เป็นโรคจะแสดงอาการทั้งที่ใบและช่วงที่ดอกบานรวมทั้งทำให้ใบและดอกเจริญผิดปกติร่วงไป พืชจะแสดงอาการไหม้ (necrosis) ใบซีดเหลือง (chlorosis) หรือเหี่ยว (wilting) อาการที่เกิดบนใบพืชสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ใบพืชแสดงอาการใบไหม้ (necrosis) ใบซีดเหลือง (chlorosis) และจุดแผล (local lesion) เส้นใบใส (vein clearing) นอกจากนี้ยังแสดงอาการใบด่าง (mosaic หรือ mottle) เส้นสีขีดหรือสีน้ำตาลเฉพาะบริเวณ (streak) หรือเป็นวงซ้อนกัน (ring spot) ดอกจะแสดงอาการสีดอกไม่สม่ำเสมอ (color breaking) และสีดอกเปลี่ยนสีไป (ICTV, 2008) จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อทอสปอไวรัสในประเทศไทยพบเชื้อ tospovirus serogroup IV จำแนกได้ 3 สปีชีส์ด้วยกัน ได้แก่ *Tomato necrotic spot virus* (TNSV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) และ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) (พิศสุวรรณ และคณะ, 2549) โดยในปัจจุบันพบเชื้อทอสปอไวรัสใหม่ในประเทศไทยอีกหนึ่งสปีชีส์ คือ เชื้อ *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV) (Seepiban *et al.*, 2011) สำหรับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ที่เข้าทำลายมะเขือเทศจะแสดงอาการใบจุดวงแหวนสีขีดหรือเป็นจุดสีน้ำตาล ใบไหม้ ส่วนยอดพบแผลสีน้ำตาล และแคะแกระ็น ผลเป็นจุดสีขีด หรือมีบริเวณสีแดงหรือเขียวล้อมรอบด้วยวงแหวนสีเหลือง มีแผลเป็นจ้ำสีน้ำตาลหรือมีลักษณะเป็นวงซ้อนกัน (Green and Kim, 1991)

2.2 เชื้อไวรัสสาเหตุโรคยอดไหม้

Capsicum chlorosis virus (CaCV) จัดอยู่ในวงศ์ *Bunyaviridae* สกุล *Tospovirus* อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80-110 นาโนเมตร รูปร่างทรงกลม มีเยื่อหุ้ม (envelope)

สารพันธุกรรมเป็นแบบ tripartite single-stranded RNA (L, M และ S RNAs) ชนิดสายลบ (Chen *et al.*, 2007) L RNA มีขนาด 8,912 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ RNA-dependent RNA-polymerase (2,877 amino acid) M RNA มีขนาด 4,823 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย open reading frames 2 ส่วน แพลรหัสให้โปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (NSm) (308 aa) และ viral glycoprotein precursors (Gn/Gc) (1,121 aa) ถูกแยกด้วยส่วนที่ไม่ใช่ยีนขนาด 433 นิวคลีโอไทด์ และ S RNA มีขนาด 3,477 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย open reading frames 2 ส่วน แพลรหัสให้โปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (NSm) (439 aa) และ Nucleocapsid (N) protein (275 aa) ถูกแยกด้วยส่วนที่ไม่ใช่ยีนขนาด 1,202 นิวคลีโอไทด์ (Knierim *et al.*, 2006)

ทอสปอไวรัสสามารถสามารถถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีการโดยการปลูกเชื้อ (inoculation) แต่จะไม่ถ่ายทอดจากการสัมผัสกันระหว่างพืช ผ่านเมล็ด และผ่านละอองเกสรตัวผู้ (Brunt *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านแมลงพาหะในอเดอร์ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ สกุล *Thrips*, *Frankliniella*, *Scirtothrips* และสปีชีส์ *Ceratotripoides* สำหรับเชื้อ CaCV พบว่า *Thrips palmi*, *Frankliniella schultzei* และ *Frankliniella occidentalis* เป็นแมลงพาหะของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในแปลงปลูกของเกษตรกรในประเทศออสเตรเลีย (Jones, 2005) แต่ในประเทศไทยพบว่าเชื้อ CaCV ถ่ายทอดโรคผ่านเพลี้ยไฟ *Ceratotripoides claratris* ในมะเขือเทศ (Knierim *et al.*, 2006; Premachandra *et al.*, 2005)

การควบคุมและป้องกันกำจัดโรคไวรัส

การควบคุมโรคไวรัสพืชมีความแตกต่างจากโรคพืชซึ่งเกิดจากเชื้อชนิดอื่นๆ หลายประการ เช่น ไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสที่อยู่ในต้นพืชได้โดยตรง โดยเฉพาะการใช้สารเคมีจัดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคไวรัส ในปัจจุบันการฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพาหะมักจะได้รับการต่อต้านจากผู้บริโภคซึ่งมีความต้องการสินค้าเกษตรที่ปลอดภัย ปราศจากสารพิษตกค้าง หรือการปนเปื้อนของสารเคมี อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต และลดความสามารถในการแข่งขันกับผู้ค้ารายอื่นๆ ปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลให้มีการปรับปรุงและพัฒนาวิธีการควบคุมโรคไวรัสพืชให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยการป้องกันกำจัดโรคไวรัสมีหลักที่สำคัญ 3 ประการ ได้แก่ การใช้พืชหรือท่อนพันธุ์พืชที่ปราศจากเชื้อไวรัส การป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัส และการใช้พันธุ์พืชที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส (สุพัฒน์, 2552)

การป้องกันโรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV ไม่ให้แพร่ระบาดในแปลงปลูกมะเขือเทศนั้นในอดีตทำได้โดยการทำลายต้นที่เป็นโรคทิ้ง (ศักดิ์, 2537) กำจัดวัชพืชที่เป็นพืชอาศัยทั้งในและนอกแปลงปลูก หรือปลูกมะเขือเทศให้ห่างจากพืชอาศัยชนิดอื่น เช่น พริก หรือพืชตระกูลแตง เป็นต้น (ศุภลักษณ์, 2536) การฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเพลี้ยอ่อนที่เป็นแมลงพาหะสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้ระดับหนึ่ง แต่มักไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากควบคุมได้เฉพาะแมลงพาหะที่อยู่ในแปลงปลูกเท่านั้น และไม่สามารถป้องกันการถ่ายทอดไวรัสในลักษณะ stylet borne ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคด้วยวิธี cross protection สามารถควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้ แต่มีข้อจำกัดในการใช้อยู่มาก

การป้องกันโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อทอสปอไวรัสสามารถทำได้โดยการควบคุมเพลี้ยไฟซึ่งเป็นแมลงพาหะ การกำจัดพืชอาศัยอื่นๆ เช่น หญ้า หรือวัชพืช ภายในแปลงปลูก รวมถึงการเกษตรกรรม การทำระบบการจัดการแบบผสมผสานวิธีการเหล่านี้จะสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การใช้พันธุ์พืชต้านทานทั้งจากพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) และพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (transgenic resistance) ร่วมกันก็สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ (Adkins *et al.*, 2005)

การใช้พันธุ์พืชต้านทานไวรัสที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ (crop improvement) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสพืช อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่มีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น เกษตรกรสามารถเลือกพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสพืชชนิดหนึ่งๆ ที่ระบาดในพื้นที่นั้นๆ ได้ ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีปริมาณมากในการควบคุมแมลงพาหะ ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม เป็นต้น (Khetarpal *et al.*, 1998)

การปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานไวรัสในปัจจุบันได้ทั้งจากการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) และการปรับปรุงพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานไวรัสแบบดั้งเดิมนั้นมีข้อจำกัด คือ แหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานไวรัสของพืชเองมีน้อยมากหรือไม่มีเลย และยีนต้านทานส่วนใหญ่ยังไม่แสดงออกในกรณีที่พืชถูกเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงเข้าทำลาย (Khetarpal *et al.*, 1998) แต่ด้วยความก้าวหน้าด้านชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) ทำให้การปรับปรุงพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสามารถหลีกเลี่ยงข้อจำกัดเหล่านี้ได้

การถ่ายยีนให้กับมะเขือเทศเพื่อสร้างความต้านทานต่อเชื้อไวรัส

การถ่ายยีน (transformation) ต้านทานไวรัสให้กับพืชสามารถทำได้ทั้งการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยตรงด้วยการใช้เครื่องยิงอนุภาค (biolistic หรือ particle bombardment) และทางอ้อมโดยการใส่เชื้อ *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated gene transfer) ด้วยการใส่ Ti plasmid ซึ่งมีอยู่ในเชื้อ *Agrobacterium* (Slater *et al.*, 2003) สำหรับยีนต้านทานไวรัสส่วนใหญ่มาจากสารพันธุกรรมของไวรัสอาจได้จาก satellite RNA ของไวรัส หรือ coat protein ของไวรัส (Chawla, 2002) อย่างไรก็ตามก็ตีจากการศึกษาพบว่า การใช้ยีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ป้องกันการเข้าทำลายของไวรัสได้ดีกว่าการใช้ยีน satellite RNA (Baulcombe *et al.*, 1987) การถ่ายยีน coat protein ของไวรัสเข้าสู่พืชถูกรายงานครั้งแรกในปี 1985 โดย Beven และคณะ ทำการถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบเป็นพืชชนิดแรก และในปี 2532 พบว่ามีการถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ที่ได้จาก *Tomato yellow leaf curl virus* ให้กับมะเขือเทศเพื่อให้ต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลืองเป็นครั้งแรกในประเทศไทย (สุพัฒน์ และคณะ, 2535)

อัญญา (2544) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์การค้า 2 พันธุ์ คือ สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134-1-2 ด้วยการใส่เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL 1 คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความต้านทานต่อไวรัส โดยใช้ยีนเรพลีเคสที่ไม่สมบูรณ์ (defective replicase gene, rep gene) ของ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เป็นกลไกในการสร้างความต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจาก CMV พบว่า ไม่สามารถเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วในอาหารคัดเลือกได้ จากการตรวจสอบยีน rep ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction และ Southern hybridization ในโครโมโซมของมะเขือเทศพันธุ์วีเอฟ 134-1-2 ที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงให้เห็นว่ามียีน rep จำนวน 1-2 ชุดในโครโมโซมของมะเขือเทศจำลองพันธุ์ line ต่างๆ ทำการทดสอบความต้านทานโรคโดยการปลูกเชื้อ CMV ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การถ่ายยีน rep เข้าสู่มะเขือเทศสามารถปรับปรุงพันธุ์วีเอฟ 134-1-2 ให้ต้านทานต่อ CMV ได้

Numome *et al.* (2002) ทำการถ่ายยีนเรพลีเคสบนชิ้นส่วน RNA 2 ที่ถูกตัดให้สั้นลงจากเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) สายพันธุ์ GT กลุ่มย่อยที่ II โดยยีนเรพลีเคสนี้จะไม่มีส่วนบริเวณ C-terminal ซึ่งประกอบไปด้วยชุดกรดอะมิโน GDD และ NTP ที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งจดจำและกระตุ้นการทำงานของ RNA-dependent RNA polymerase ถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* คัดเลือกมะเขือเทศที่ได้รับยีนจำนวน 137 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์นำไปประเมิน

ความต้านทานต่อเชื้อ CMV พบว่า ประมาณ 10% ของมะเขือเทศที่คัดเลือกไว้มีความต้านทานสูง ในขณะที่อีก 90% ที่เหลือมีความต้านทานปานกลางและอ่อนแอต่อโรค คัดเลือก 15 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานสูงนำมาทดสอบการเพิ่มปริมาณของเชื้อ CMV พบมะเขือเทศที่ไม่แสดงอาการของโรคทั้งในใบที่ทำการปลูกเชื้อ และใบใหม่ที่เกิดขึ้น จำนวน 3 สายพันธุ์ ทำการตรวจสอบยีนและประเมินความต้านทานต่อในรุ่น T_1 ต่อ ได้มะเขือเทศที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV หลายสายพันธุ์ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อเชื้อ CMV ได้ในอนาคต

De Haan *et al.* (1996) ทำการถ่ายยีนนิวคลีโอโปรตีน (Nucleoprotein gene) ที่ได้จากเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ลงในมะเขือเทศสายพันธุ์ ATV847 พบว่ามะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน 45% มีการแสดงออกของยีนนิวคลีโอโปรตีนซึ่งได้รับการทดสอบด้วยวิธี ELISA และ Western blot analysis จากนั้นหาจำนวนชุดของโครโมโซมด้วย flow cytometry โดยมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนกว่า 60% มีชุดโครโมโซมเป็น diploid เมื่อนำมาผสมตัวเองแล้วจึงนำรุ่นลูกที่ได้ (S_1) มาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ TSWV และตรวจสอบจำนวนชุดของยีน โดยวิธี Southern blot analysis นำมาผสมตัวเองอีกครั้งแล้วนำรุ่นลูก (S_2) ที่พบจำนวนชุดของยีนน้อยมาผสมข้ามกับมะเขือเทศสายพันธุ์อื่นเพื่อให้ได้มะเขือเทศลูกผสมเพื่อรับประทานผลสด รวมไปถึงผสมตัวเองเพื่อให้ได้รุ่นลูกที่มีความนิ่งของสายพันธุ์ (S_3) นำทั้งลูกผสมและรุ่นลูก (S_3) ที่ได้ไปทดสอบความต้านทานอีกครั้ง พบมะเขือเทศรุ่นลูกที่ต้านทานต่อเชื้อ TSWV ได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีจำนวนชุดของยีนเพียง 2 ชุดเท่านั้น (สายพันธุ์ 815 และ 888) ในขณะที่มะเขือเทศลูกผสมมีความต้านทานในระดับปานกลาง คัดเลือกมะเขือเทศลูกผสม 6 สายพันธุ์ มาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ TSWV ในระดับแปลงปลูก พบว่าลูกผสมที่ได้จากสายพันธุ์ 815 และ 888 นั้นมีความต้านทานในระดับสูง ในขณะที่ลูกผสมอื่นๆมีความต้านทานในระดับปานกลางเท่านั้น จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีนนิวคลีโอโปรตีนสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อเชื้อ TSWV ได้

Fedorowicz *et al.* (2005) ทำการถ่ายยีนนิวคลีโอโปรตีน (Nucleoprotein gene) ที่ได้จากเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ลงในมะเขือเทศและยาสูบด้วยการใช้เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ GV3101:MP90 ตรวจสอบชิ้นส่วนยีนในมะเขือเทศทั้ง 12 ต้น และยาสูบ 141 ต้น ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วย Southern blot analysis พบมะเขือเทศ 8 ต้น และยาสูบ 103 ต้น ที่มีการแทรกของยีนแบบลูกทิกทาง เกือบเมล็ดรุ่น R_1 และ R_2 ที่ได้นำมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ TSWV 2 สายพันธุ์ พบทั้งพืชที่แสดงความต้านทานสูงไม่พบอาการของโรคเลย แสดงอาการเฉพาะจุด แสดงอาการในช่วงแรกแล้วกลับ ไปเป็นปกติ แสดงอาการล่าช้า และแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน นำต้นพืช

ส่วนหนึ่งมาทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับ RNA และ โปรตีนด้วยเทคนิค Northern blot analysis และ Double-antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) พบทั้งที่ไม่มีการแสดงออกในระดับ RNA และ โปรตีน และมีการแสดงออกทั้งในระดับ RNA และ โปรตีน ในต้นพืชที่แสดงลักษณะต้านทานที่แตกต่างกัน โดยคาดว่าความต้านทานที่ได้เกิดจากทั้งความต้านทานที่เกี่ยวข้องกับ โปรตีน (protein-mediated resistance) และความต้านทานที่เกี่ยวข้องกับ RNA (post-transcriptional gene silencing)

การผลิตพืชตัดแปลงพันธุกรรมต้านทานโรคไวรัสโดยวิธีการรวมยีน

แม้ว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมจะมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันและควบคุมโรคไวรัส แต่พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเพียงยีนเดียวจะสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสเพียงหนึ่งชนิดที่จำเพาะต่อยีนนั้น (Yie and Tien, 1998) ในขณะที่ในสภาพแปลงปลูกจริงมักพบการระบาดของเชื้อไวรัสแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ หรือในพื้นที่นั้นอาจพบการระบาดของเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป (mixed viral infection) การใช้พืชต้านทานไวรัสที่ได้รับยีนมากกว่าหนึ่งยีน (gene stacking หรือ gene pyramiding) ทำให้พืชมีโอกาสต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด การผลิตพืชให้มียีนต้านทานไวรัสมากกว่าหนึ่งยีนอาจทำได้จากการผสมข้ามระหว่างพืชที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว การถ่ายยีนซ้ำ (re-transformation) ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว หรือการถ่ายยีนที่มียีนมากกว่าหนึ่งยีนในครั้งเดียว (co-transformation) (Francois *et al.*, 2002; Halpin, 2005)

การรวมยีน (gene stacking) คือ การเพิ่มยีน (transgenes) ตั้งแต่สองยีนขึ้นไป เข้าสู่สารพันธุกรรมหรือจีโนมของพืชตัดแปลงพันธุกรรม (Transgenic plant หรือ Genetically modified plant) เพื่อให้พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้มีการแสดงออกของหลายลักษณะตามที่ต้องการ โดยความหมายแล้วคล้ายกับการรวมยีน “gene pyramiding” ที่ถูกนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิมช่วยให้พืชมีลักษณะพิเศษเพิ่มขึ้น เช่น ต้านทานแมลงศัตรูพืช เชื้อสาเหตุโรคพืช วัชพืช และการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น รวมไปถึงการควบคุมลักษณะใดลักษณะหนึ่งแต่มีหลายกลไกหรือหลายยีนที่เกี่ยวข้อง (Douglas and Halpin, 2010)

วรวงศ์ (2547) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เพื่อสร้างความต้านทานต่อไวรัส 2 ชนิด คือ ยีนเรพลีเคส (replicase gene) ที่ควบคุมการจำลองตัวของจีโนมไวรัสใบหงิก เหลืองมะเขือเทศ (TYLCV) และยีนเรพลีเคสที่ไม่สมบูรณ์ของไวรัสใบด่างแดง (CMV) โดยการใส่เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL1 ที่บรรจุพลาสมิดพาหะสำหรับถ่ายยีนเรพลีเคสของไวรัสแต่ละชนิดและนำมาถ่ายยีนพร้อมกันในคราวเดียว ตรวจสอบมะเขือเทศรุ่น R_0 ด้วยเทคนิค PCR พบยีนเรพลีเคสของ TYLCV และ CMV ในมะเขือเทศต้นเดียวกันในอัตรา 32.26% ของมะเขือเทศทั้งหมดที่ได้รับการถ่ายยีน พบยีนเรพลีเคสของ TYLCV ชนิดเดียว 3.22% และพบยีนเรพลีเคสของ CMV ชนิดเดียว 16.13% เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern hybridization พบว่ามียีนเรพลีเคสของ CMV เชื่อมต่อในโครโมโซมมะเขือเทศจำนวน 2 ชุด ตรวจพบยีนเรพลีเคสของ TYLCV และ CMV ในมะเขือเทศรุ่น R_1 line 9 และ 11 ด้วยเทคนิค PCR ในอัตรา 13.3% และ 16.6% ของต้นมะเขือเทศที่นำมาทดสอบ แสดงให้เห็นว่าสามารถถ่ายยีน 2 ยีนเข้าสู่โครโมโซมของมะเขือเทศในคราวเดียวกันได้เป็นผลสำเร็จ ยีนทั้งสองสามารถดำรงอยู่และถ่ายทอดจากมะเขือเทศรุ่น R_0 ไปสู่รุ่น R_1 ได้

Tricoll *et al.* (1995) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่สควอช (squash) ด้วยการใช้เชื้อ *Agrobacterium* ถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Watermelon mosaic virus 2* (WMV 2) หรือ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) แล้วทดสอบความต้านทานโรคในสภาพแปลงปลูก พบว่า พืชที่ได้รับการถ่ายยีนส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการของโรค บางส่วนแสดงอาการเพียงเล็กน้อย มีเพียงส่วนน้อยที่ไม่แสดงลักษณะต้านทาน พืชที่ได้รับการถ่ายยีนเพียงยีนเดียวจำนวน 40-95% ของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมดแสดงลักษณะต้านทาน แต่พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 2 ยีน แสดงลักษณะต้านทานในสควอช line ZW-20 และพืชที่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 3 ยีน แสดงลักษณะต้านทานต่อไวรัสทั้งสามชนิดในสควอช line CZW-3 ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถนำมาพัฒนาเพื่อผลิตพืชต้านทานไวรัสหลายชนิดในเชิงการค้าได้

Gonsalves *et al.* (1996) ทำการถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาค (nucleocapsid protein) ที่ได้จากเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV-BL) สายพันธุ์ที่พบในผักกาดหอมลงในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) สายพันธุ์ Geneva 80 ด้วยการใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ผสมตัวเองในรุ่น R_0 แล้วนำเมล็ดที่ได้ไปเพาะเพื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ TSWV-BL พบว่ามะเขือเทศ line T13-1 ต้านทานต่อเชื้อ TSWV-BL ทั้งหมด (100%) ผสมตัวเองอีกครั้งและนำมะเขือเทศรุ่นลูกที่ได้ไปทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ TSWV-BL พร้อมกับ เชื้อทอสปอไวรัสสายพันธุ์ TSWV-91 และ GRSV-BR พบว่า มะเขือเทศรุ่น R_2 ที่ได้ยังคง

ต้านทานต่อเชื้อ TSWV-BL ทั้งหมด ต้านทานต่อเชื้อทอสปอไวรัสสายพันธุ์ TSWV-91 และ GRSV-BR คิดเป็น 84% และ 52% คัดเลือกมะเขือเทศรุ่น R_2 ที่ได้จากต้นที่ต้านทานต่อเชื้อ TSWV-BL ไปผสมข้ามกับมะเขือเทศคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ที่ได้จากเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV-China) โดยรุ่นลูกที่ได้ต้านทานทั้งต่อเชื้อ TSWV-BL และ CMV-China

Scorza *et al.* (1998) ทำการศึกษาการถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ในต้นพลัมคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการผสมข้ามให้ต้านทานต่อเชื้อ *Plum pox virus* (PPV) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากในทวีปยุโรป ผสมพลัมคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาคที่ได้จากเชื้อ *Plum pox virus* (PPV) กับต้นพลัมคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาคที่ได้จากเชื้อ *Papaya ring spot virus* (PRSV) ตรวจสอบยีนด้วยเทคนิค PCR ปลุกเชื้อ PPV โดยวิธีต่อยอดกับต้นต่อที่ได้รับการปลุกเชื้อ PRSV ด้วยเปลี้ยอ่อนแมลงพาหะ และวัดผลการเข้าทำลายของเชื้อด้วยเทคนิค ELISA จากผลที่ได้ ลูกผสมที่ได้ทั้ง 7 ต้นนั้น มีอย่างละ 2 ต้นที่มียีน PPV-CP และ PRV-CP เพียงยีนเดียว อีก 3 ต้นที่เหลือนั้นตรวจพบทั้งสองยีน และเมื่อตรวจสอบความต้านทานต่อเชื้อ PPV แล้ว พบว่า ต้นพลัมที่มียีน PPV-CP เท่านั้นที่ต้านทานต่อเชื้อ PPV ทั้งจากพลัมลูกผสมคัดแปลงพันธุกรรม และพลัมที่ได้จากการผสมตัวเองเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ยีน PPV-CP จากพลัมคัดแปลงพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกโดยการผสมข้ามได้โดยบางต้นพบได้ทั้งสองยีน อีกทั้งสามารถถ่ายทอดความต้านทานสู่ต้นลูกได้โดยจำนวนยีนในต้นพลัมนั้นไม่มีผลต่อความต้านทานที่เกิดขึ้น

Yie and Tien (1998) ทดสอบการควบคุมโรคไวรัสภายใต้สภาพแปลงปลูกของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมากกว่าหนึ่งยีนขึ้นไป คือ ยีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) และ satellite RNA ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) กับยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Potato virus Y* (PVY) หรือยีน 54K ของเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) ทำการสร้างสายพันธุ์แท้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตพืช นำพืชที่ได้ไปทดสอบความต้านทานโรค พบว่าพืชที่ได้รับการถ่ายยีน CMV CP, CMV Sat RNA และ PVY CP กับพืชที่ได้รับการถ่ายยีน CMV CP, CMV Sat RNA และ TMV 54K ให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือ ต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสหลายชนิด (mixed viral infection) ในระดับสูง ในขณะที่พืชที่ได้รับการถ่ายยีน PVY CP หรือ TMV 54K เพียงยีนเดียวอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไวรัสหลายชนิดพร้อมกัน

ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการรวมทรานส์ยีนแบบยีนเดี่ยว (combining individual transgenes) เข้าสู่ต้นพืชต้นเดียวกัน โดยสามารถรวมทรานส์ยีนได้ด้วยวิธีการผสมข้าม (cross-breeding) ในพืชหลายชนิดรวมไปถึงมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม นับเป็นแนวทางในการรวมยีนต้านทานโรคไวรัสของมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมในการทดลองนี้



อุปกรณ์และวิธีการ

1. มะเชื้อเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคใบด่างเรียวเล็กที่เกิดจากเชื้อ CMV และโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV

1.1 มะเชื้อเทศดัดแปลงพันธุกรรม

มะเชื้อเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่นำมาใช้ในการทดลองประกอบด้วยมะเชื้อเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (rep gene) ของไวรัสใบด่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV และได้รับการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV (วรพงษ์, 2547; อัญญรัตน์, 2553) และมะเชื้อเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (N gene) ของโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของโครงการการผลิตมะเชื้อเทศในสภาพโรงเรือนในประเทศไทย ภายใต้โครงการความร่วมมือระหว่างไทย-เยอรมัน (NRCT-DFG) นำเมล็ดมะเชื้อเทศแต่ละสายพันธุ์มาเพาะในกระบะเพาะกล้า เมื่อต้นกล้ามีอายุ 14 วัน ย้ายปลูกในกระถางขนาด 6 นิ้ว เก็บไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพและความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

1.2 การสร้างมะเชื้อเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

คัดเลือกพันธุ์พ่อและแม่จากมะเชื้อเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และได้รับการประเมินความต้านทานต่อโรคใบด่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV แล้วกับมะเชื้อเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่มียีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนที่ได้จากเชื้อ CaCV ผสมข้ามโดยใช้ทั้งสองสายพันธุ์เป็นทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (reciprocal full-sib selection) เพื่อหาสมรรถนะการผสมของพันธุ์พ่อและแม่ คัดเลือกให้ได้อย่างน้อย 20-25 คู่ผสม โดยในแต่ละคู่ผสมมีจำนวนต้นที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 25-30 ต้น ต่อคู่ผสมหนึ่ง เพาะเมล็ดมะเชื้อเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในกระบะเพาะชำย้ายกล้าลงในกระถางพลาสติก กระถางละ 1 ต้น ไปเพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก เมื่ออายุครบ 14 วัน ตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในรุ่นลูกของทุกๆคู่ผสม

1.2 การผสมเกสรและเก็บเกี่ยวผลผลิต

กำจัดเกสรเพศผู้ด้วยมือ (emasculation) ในต้นแม่พันธุ์ กลุ่มดอกไว้ด้วยสำลีเพื่อป้องกันการผสมจากละอองเกสรที่ไม่ต้องการ ผสมเกสรในดอกมะเขือเทศที่ต้องการให้เป็นแม่พันธุ์ ต้นในวันถัดไป โดยใช้ละอองเกสรจากต้นพ่อพันธุ์ผสมให้ติดกับเกสรตัวเมียมากที่สุด กลุ่มดอกไว้ด้วยสำลีอีกครั้ง เมื่อผสมเสร็จจัดป้ายชื่อของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เพื่อทราบประวัติ ยืนยันการผสมพร้อมวันที่ทำการผสม เก็บมะเขือเทศที่ติดผลและเริ่มสุกแดง ผ่าขวางผล บีบเมล็ดออก หมักทิ้งไว้ในถุงพลาสติกประมาณ 1 คืน นำไปล้างด้วยน้ำสะอาดจนกระทั่งไม่มีเศษเนื้อติดอยู่กับเมล็ด นำไปผึ่งลม 2-3 วัน จนเมล็ดแห้งสนิท (กรุง, 2543) นำเมล็ดไปปลูกเพื่อตรวจสอบยืนยันต่อไป

2. ตรวจสอบยีนบนโครโมโซมมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมโดยวิธี Polymerase Chain Reaction

2.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของมะเขือเทศ

สกัดดีเอ็นเอจากใบมะเขือเทศ ด้วยวิธีการ CTAB method (Fulton *et al.*, 1995) นำปลายใบมะเขือเทศใส่ลงในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. เตรียมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl) 700 มล. ที่ผสมกับ 0.9% sodium sulfite anhydrous ต่อมะเขือเทศ 1 ตัวอย่าง เติมสารละลายที่เตรียมไว้ 350 มล. ลงในหลอดไมโครทิวบ์ บดใบพืชให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช (JANKE & KUNKEL KIKAWERK RW20) เติมสารละลายที่เหลืออีก 350 มล. เติม chloroform: isoamylalcohol (24:1) 700 มล. พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่หลอดไมโครทิวบ์อันใหม่ เติม isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่เก็บได้ พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ เท 70% ethanol ที่ ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งใน chamber เป็นเวลาข้ามคืน ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจหาชิ้นเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 100 นาโนกรัม มาเป็นต้นแบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับชิ้นเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (ตารางที่ 1) ปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM MgCl₂ และ 1% Triton X-100) 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 0.5 mM, dNTPs 0.8 mM, RepCMV-F และ RepCMV-R primers อย่างละ 0.3 μ M 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 extension 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 15 นาที นำไปตรวจ สอบภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

2.3 การตรวจหาชิ้นนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนบนโครโมโซมมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 100 นาโนกรัม มาเป็นต้นแบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับชิ้นนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (ตารางที่ 1) ปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM MgCl₂ และ 1% Triton X-100) 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 0.375 mM, dNTPs 0.533 mM, N-CaCV-F และ N-CaCV -R primers อย่างละ 0.2 μ M 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 extension 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ด้วย 2.0% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 15 นาที นำไปตรวจ สอบภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบยีนเรพลีเคสที่ไม่สมบูรณ์ และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน

primer	primer sequence (5'→3')	product size
CMV-replicase gene specific primers		
RepCMV-F	5'-TATCGGATCCATGGCTTTCCTG 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

2.4 ตรวจสอบผลการรวมยีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม ตรวจสอบยีนเรพลีเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนด้วยเทคนิค PCR นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากทั้งสองปฏิกิริยานำมาวิเคราะห์รวมกันด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 15 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

อัตราการถ่ายถอดยีนของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการผสมทั้งหมดในรุ่นลูกคำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้ (วรพงศ์, 2547)

$$\text{อัตราการถ่ายถอดยีน (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่ตรวจพบยีน}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

2.5 การเปรียบเทียบอัตราการถ่ายถอดยีนระหว่างแม่พันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

ทดสอบทางสถิติโดยวิธี T-test ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F₁ ระหว่างกลุ่มที่ใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นต้นแม่พันธุ์ และกลุ่มที่ใช้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นต้นแม่พันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการถ่ายถอดยีนทั้งสอง

เมื่อใช้ต้นแม่พันธุ์ที่แตกต่างกันด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป R-program version 2.10.1 (Veneble *et al.*, 2009)

2.6 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

คำนวณค่าความถี่ของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนจากอัตราการถ่ายทอดยีนที่ได้ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์จากสมการดังนี้ (กฤษฎา, 2546)

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

จากค่าความถี่ที่ได้นำมาคำนวณหาอัตราส่วนของพันธุกรรมหรือค่าคาดหวัง (expectation data) เปรียบเทียบค่าคาดหวังกับค่าสังเกต (observation data) ซึ่งได้มาจากผลการตรวจสอบยีนทั้งสองในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 ด้วยวิธีการทดสอบทางสถิติ Chi-square (X^2 -test) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป R-program version 2.10.1 (Veneble *et al.*, 2009)

3. ทดสอบความต้านทานต่อโรคไวรัสในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่นำมาใช้ในการทดลองประกอบด้วยมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (rep gene) ของไวรัสใบด่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV และได้รับการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV (วรพงศ์, 2547; อัญญรัตน์, 2553) และมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (N gene) ของโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV แต่ยังไม่มีการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CaCV ดังนั้นทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CaCV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ที่เป็นต้นแม่พันธุ์ของมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด

3.1 ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CaCV ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6

ตรวจสอบยีนนิวคลีโอไทด์โปรตีนในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ดำเนินการตามข้อ 2.1 และ 2.3

ปลูกเชื้อไวรัส CaCV สายพันธุ์ KK เพื่อทดสอบความต้านทานต่อโรค โดยนำมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ไปปลูกในเรือนกระจก นาน 1 สัปดาห์เมื่อมีใบจริงแผ่เต็มที่ประมาณ 3-5 ใบ ปลูกเชื้อโดยเตรียมน้ำคั้นพืชที่แสดงอาการยอดไหม้จากถูกเข้าทำลายจากเชื้อ CaCV ใช้ใบมะเขือเทศ 1 กรัม บดใน 0.05M Phosphate buffer และ 0.2% Mercaptoethanol จากนั้นเติม 1% Celite เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปทาลงบนใบของต้นกล้ามะเขือเทศอีกครั้งหนึ่ง หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 10 วัน ย้ายต้นกล้าลงในกระถางปลูก บันทึกภาพและอาการที่เกิดขึ้นบนต้นมะเขือเทศเมื่อเวลาผ่านไป 14 วันหลังการปลูกเชื้อ โดยเทียบกับมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ตรวจหาปริมาณของเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค ELISA โดยบดตัวอย่างใบพืชกับ coating buffer ที่เติม 0.2% sodium DIECA ในอัตราส่วน 1 : 5 เติมนลงใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ล้างออกด้วย 1x PBST (1x PBS ที่เติม 0.05% Tween 20) 100 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม primary antibody หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ MYSV-6 กับ blocking buffer ในอัตราส่วน 1 : 5000 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ล้างออกด้วย 1x PBST 100 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม secondary antibody กับ 1x PBS ในอัตราส่วน 1 : 10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ล้างออกด้วย 1x PBST 100 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม substrate solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 N NaOH 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader โดยกำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นบวกคือ ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จากพืชปกติ (negative control) 2 เท่า (สุรศักดิ์, 2550)

3.2 ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV และ CaCV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลง พันธุกรรมที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22

ตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ดำเนินการตามข้อ 2.1 และ 2.4

ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV และ CaCV โดยนำมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลง พันธุกรรมที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 ไปปลูกในเรือนกระจก นาน 1 สัปดาห์เมื่อมีใบจริงแก่เต็มที่ประมาณ 3-5 ใบ ปลูกเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ 30RS โดยเตรียมน้ำคั้นพืชที่แสดงอาการใบด่างจากลูกเข้าทำลายจากเชื้อ CMV โดยใช้ใบมะเขือเทศ 1 กรัม บดใน 0.1M Phosphate buffer และ 0.2% Mercaptoethanol จากนั้นเติม 1% Celite เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปทาบบนใบของต้นกล้ามะเขือเทศ หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ปลูกเชื้อไวรัส CaCV สายพันธุ์ KK ซ้ำในต้นเดิม หลังจากปลูกเชื้อ CMV เป็นเวลา 21 วัน (ปลูกเชื้อ CaCV เป็นเวลา 14 วัน) บันทึกภาพและอาการที่เกิดขึ้น

ตรวจหาปริมาณของเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค ELISA โดยบดตัวอย่างใบพืชกับ coating buffer ที่เติม 0.2% sodium DIECA ในอัตราส่วน 1 : 2 เติมนลงใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ล้างออกด้วย 1x PBST (1x PBS ที่เติม 0.05% Tween 20) 100 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม primary antibody หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ anti-CMV กับ blocking buffer ในอัตราส่วน 1 : 1000 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ล้างออกด้วย 1x PBST 100 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม secondary antibody กับ 1x PBS ในอัตราส่วน 1 : 10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ล้างออกด้วย 1x PBST 100 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆละ 5 นาที เติม substrate solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 N NaOH 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader โดยกำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นบวกคือ ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จากพืชปกติ (negative control) 2 เท่า (Jianxiang and Zhou, 2004)

ตรวจหาปริมาณของเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค ELISA ดำเนินการตามข้อ 3.1

4. ทดสอบลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมหลังการรวมยีน

4.1 การเตรียมตัวอย่างมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

รวบรวมเมล็ดมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในทุกๆกลุ่มผสมเข้าด้วยกัน (bulk) เพาะเมล็ดมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ ในกระบะเพาะชำ ย้ายกล้าลงในกระถางพลาสติก กระถางละ 1 ต้น ไปเพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก เมื่ออายุครบ 14 วัน ตรวจสอบยีนด้วยเทคนิค PCR เพื่อแบ่งกลุ่มมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่มียีน มีเพียงยีนเดียว และมีทั้งสองยีนในต้นเดียวกัน

4.2 การประเมินลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

เก็บข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเปรียบเทียบระหว่างมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่มียีน มีเพียงยีนเดียว และมีทั้งสองยีนในต้นเดียวกัน โดยพิจารณาจาก

1. ลักษณะการเจริญเติบโต (growth habit)

จำแนกลักษณะการเจริญเติบโตของมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสามกลุ่มทดลอง โดยพิจารณาตามการจัดแบ่งลักษณะการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ (จานุลักษณะ, 2541) ได้แก่

1.1 การเจริญแบบเลื้อย หรือแบบทอดยอด (indeterminate type) ประกอบด้วยช่อดอกข้างเท่านั้น ส่วนปลายยอดยังเจริญทางกิ่งก้านและใบ มีการเจริญของดอกสลับการเจริญของใบทุก 2-3 ใบหรือมากกว่า การเจริญของดอกและการติดผลช้า ทรงต้นโปร่งและไม่เป็นพุ่ม

1.2 การเจริญแบบพุ่มหรือแบบไม่ทอดยอด (determinate type) ประกอบด้วยช่อดอกข้าง และช่อดอกปลายยอด มีการเจริญของดอกสลับการเจริญของใบทุกใบ แตกแขนงมาก ลำต้นเป็นพุ่มแน่น

1.3 การเจริญแบบกึ่งเลื้อย (semi-determinate type) มีการเจริญของดอกสลับการเจริญของใบทุก 1-2 ใบ ลำต้นสูงกว่าการเจริญแบบพุ่ม

2. รูปร่างผล (fruit shape)

จำแนกลักษณะรูปร่างผลของมะเขือเทศคัดแปลงพันธุกรรมทั้งสามกลุ่มทดลอง โดยพิจารณาตามการจัดแบ่งลักษณะรูปร่างผลของมะเขือเทศ (Rodriguez, 2011) ได้แก่

- | | |
|------------------------------------|--|
| 2.1 กลมแบน (flattened) | 2.5 รูปผลแพร์ (obovoid or pear shape) |
| 2.2 กลม (rounded) | 2.6 รูปทรงรี (ellipsoid or plum shape) |
| 2.3 รูปหัวใจ (heart –shape) | 2.7 รูปทรงยาว (long) |
| 2.4 รูปทรงสี่เหลี่ยม (rectangular) | 2.8 รูปหัวใจขนาดใหญ่ (Oxheart) |

3. สีของผล (fruit colour)

- | | |
|-----------------------|-------------------|
| 3.1 สีเขียว (green) | 3.4 สีชมพู (pink) |
| 3.2 สีเหลือง (yellow) | 3.5 สีแดง (red) |
| 3.3 สีส้ม (orange) | |

4. ขนาดผล (fruit size) ที่ระยะสุกแก่ (at maturity)

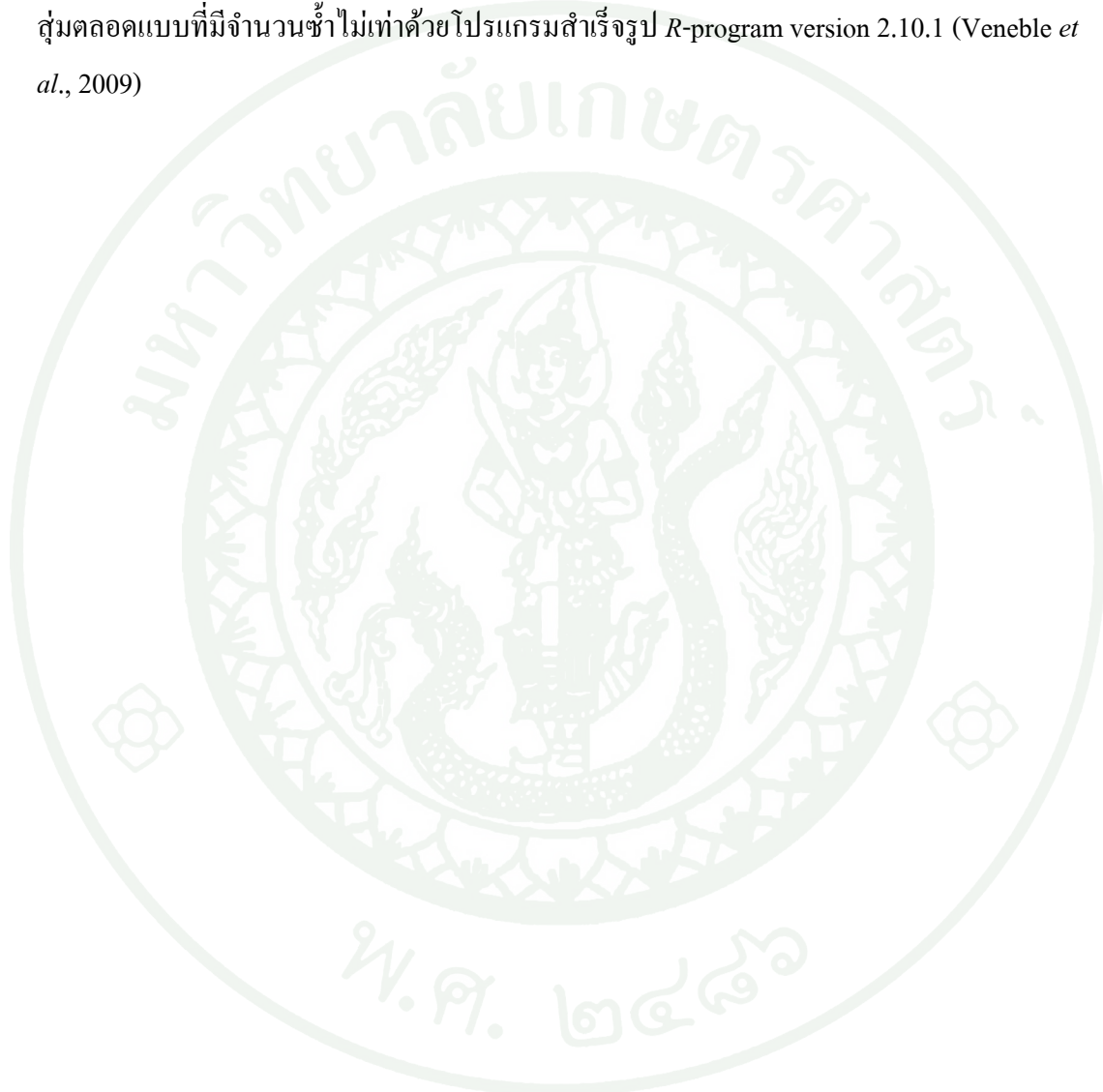
เปรียบเทียบขนาดผลของมะเขือเทศคัดแปลงพันธุกรรมทั้งสามกลุ่มทดลอง โดยพิจารณาจากค่าดัชนีรูปร่างผลที่คำนวณได้จากสมการข้างล่างนี้ (กรุง และคณะ, 2537)

$$\text{Shape index (Z)} = \text{fruit length} / \text{fruit width}$$

นำค่าที่ได้ทั้งสามกลุ่มทดลองมาทดสอบทางสถิติแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) แบบที่มีจำนวนซ้ำไม่เท่าด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป R-program version 2.10.1 (Veneble *et al.*, 2009)

5. น้ำหนักผลเฉลี่ย (fruit weight)

เปรียบเทียบน้ำหนักผลเฉลี่ยของมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมทั้งสามกลุ่มทดลอง โดยพิจารณาจากน้ำหนักผลที่วัดได้ น้ำค่าที่ได้ทั้งสามกลุ่มทดลองมาทดสอบทางสถิติแบบสุ่มตลอดแบบที่มีจำนวนซ้ำไม่เท่าด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป *R-program* version 2.10.1 (Veneble *et al.*, 2009)



ผลและวิจารณ์

ผลการทดลอง

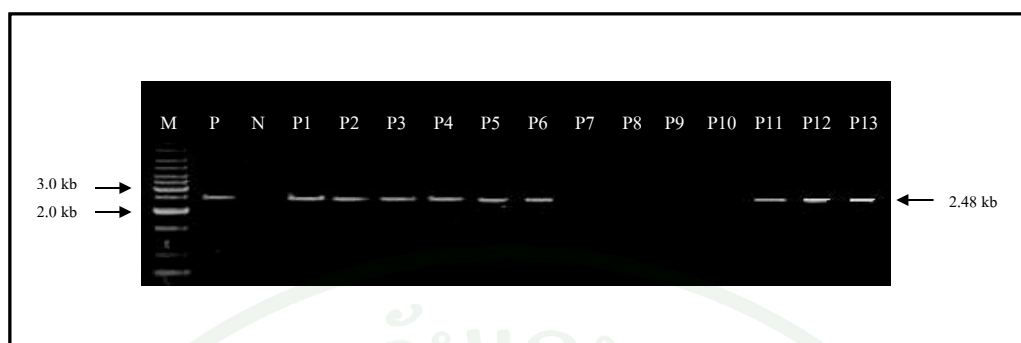
1. การคัดเลือกต้นพ่อแม่พันธุ์ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 เพื่อใช้ในการสร้างมะเขือเทศลูกผสมดัดแปลงพันธุกรรมโดยวิธีการผสมข้าม

1.1 การคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มีอินเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากเชื้อ CMV

ผลการตรวจสอบอินเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 รุ่น R_4 พบว่า มะเขือเทศ line CMV L13-x-47 จำนวนทั้งหมด 23 ต้น ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.48 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับอินเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 (positive control) ทั้งหมด 14 ต้น (ภาพที่ 1) คิดเป็นอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูก 60.87% นำมะเขือเทศ 2 สายพันธุ์ คือ CMV L 13-x-47-6 และ CMV L 13-x-47-22 มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

1.2 การคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่มีอินนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนที่ได้จากเชื้อ CaCV

ผลการตรวจสอบอินนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 พบว่า จากการปลูกมะเขือเทศที่ทำทดสอบทั้งหมดทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CaCV L 2, 3, 6, 7 และ 8 จำนวน 14, 18, 16, 21 และ 23 ต้น ตามลำดับ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับอินนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 (positive control) แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 2) โดย line CaCV L 3, 6 และ 7 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจำนวน 8, 14 และ 14 ต้น มีอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูก คือ 44.4% , 87.5% และ 66.6% ตามลำดับ ในขณะที่ line CaCV L2 และ L8 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 และ 6 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) มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์



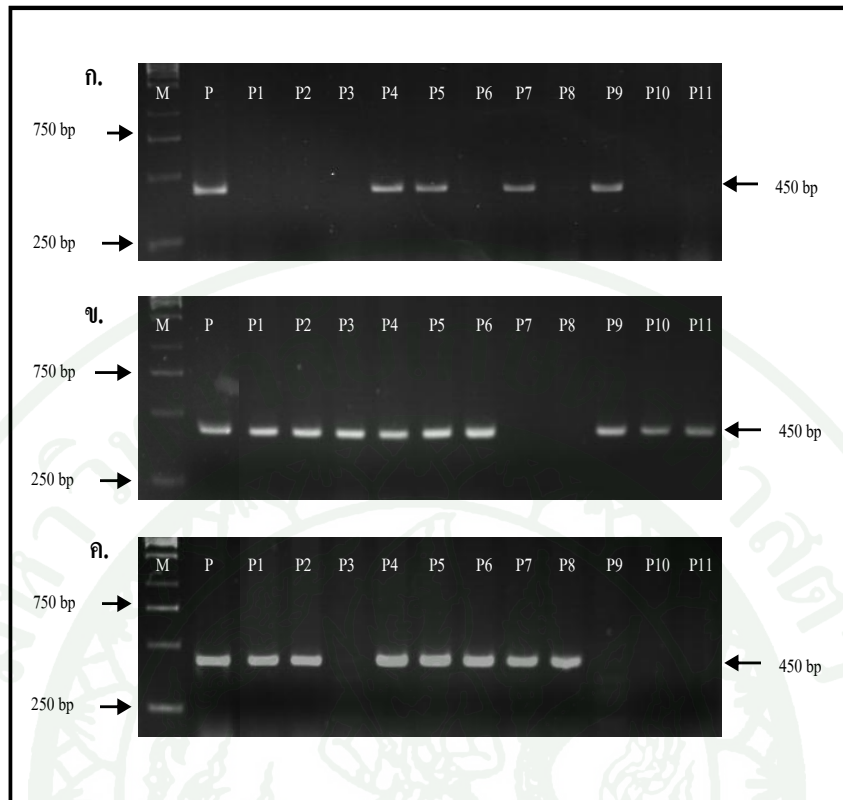
ภาพที่ 1 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 รุ่น R₄ ด้วยเทคนิค PCR

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder marker (Fermentas)

P : มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R₃ (positive control)

N : มะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P1-13 : มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CMV L13-x-47 ต้นที่ 1-13



ภาพที่ 2 ผลการตรวจหายีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม

พันธุ์สีดาทิพย์ 4 รุ่น R_2 บางสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR

ก. line CaCV L 3 ต้นที่ 1-11

ข. line CaCV L 6 ต้นที่ 1-11

ค. line CaCV L 7 ต้นที่ 1-11

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder marker (Fermentas)

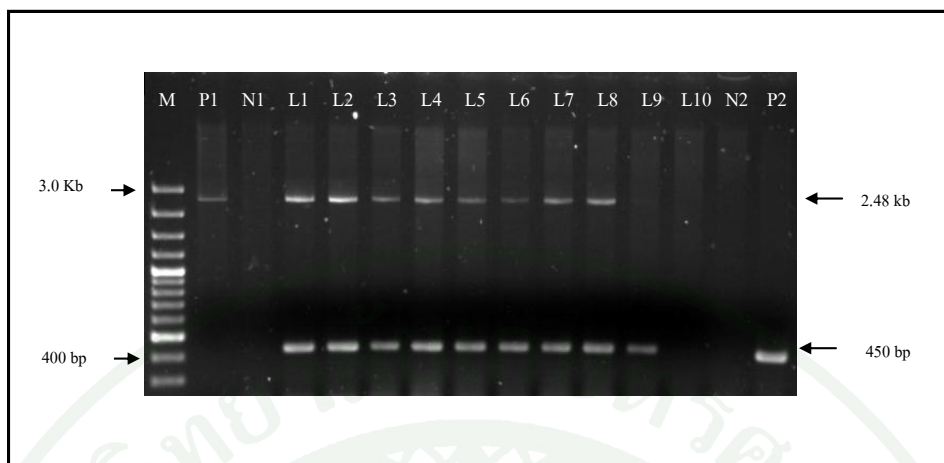
P : มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1

2. การตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีน ดัดแปลงพันธุกรรม

ผลการนำมะเขือเทศที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อ CMV จำนวน 2 สายพันธุ์ และมะเขือเทศที่มียีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของเชื้อ CaCV จำนวน 6 สายพันธุ์ มาผสมสลับพ่อแม่ได้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรวมยีนทั้งหมด 24 คู่ผสม จากการตรวจสอบยีนมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมในคู่ผสมต่างๆ พบว่า มีการถ่ายทอดยีนแตกต่างกันไป โดยพบทั้งต้นที่ไม่มียีน มีเพียงยีนเดียว และมีทั้งสองยีน (ภาพที่ 3)

เมื่อตรวจสอบผลของการรวมยีนโดยวิธีการผสมข้ามในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 685 ต้น ที่ได้จากทุกคู่ผสม พบว่า มีต้นมะเขือเทศที่ตรวจไม่พบทรานส์ยีน (transgene) จำนวน 266 ต้น คิดเป็น 38.83% ตรวจพบเพียงยีนเดียว เป็นยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์จำนวน 14 ต้น คิดเป็น 2.04% และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน จำนวน 158 ต้น คิดเป็น 23.07% รวมเป็นเปอร์เซ็นต์การตรวจพบยีนเดียว 25.11% และพบทั้งสองยีนจำนวน 247 ต้น คิดเป็น 36.06% (ตารางที่ 2)

ในการผสมสลับพ่อแม่นั้น เมื่อใช้มะเขือเทศพันธุ์สีกาทิพย์ 3 (replicase gene) เป็นต้นแม่พันธุ์ เปรียบเทียบทางสถิติกับมะเขือเทศพันธุ์สีกาทิพย์ 4 (nucleocapsid protein gene) ที่ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 22 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่า ไม่ว่าจะใช้ต้นใดเป็นต้นแม่พันธุ์ต่างให้อัตราการรวมยีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ยกเว้นอัตรา การถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ปฏิเสธสมมติฐาน แสดงให้เห็นว่าการเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ต่างกัน ส่งผลให้การถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์แตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 3 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F₁ ด้วยเทคนิค PCR

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

P1 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์รุ่นพ่อ-แม่

N1 : มะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P2 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนรุ่นพ่อ-แม่

N2 : มะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 4 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

L1-10 : มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง line CMV L 13-x-47-22 กับ CaCV L7-2 ต้นที่ 1-10

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (rep gene) และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน (N gene) ในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

Crosses	No. of tested plant	No. of plant without transgene	No. of plant with transgene		
			rep gene	N gene	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%)

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบอัตราการถ่ายทอดยีนระหว่างการใช้มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นแม่พันธุ์และมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นแม่พันธุ์

Crosses	No. of tested plant	No. of plant without transgene	No. of plant with 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 = มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3

SD4 = มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4

จากผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 รุ่น R₄ ใน line CMV L 13-x-47 ที่มีอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อ-แม่สู่รุ่นลูก 60.87% หรือร้อยละ 0.6087 และการตรวจสอบยีนนิวคลีโอแคบซิดโปรตีนในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 รุ่น R₂ ใน line CaCV L 3, 6 และ 7 ที่มีอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อ-แม่สู่รุ่นลูก คือ 44.4% , 87.5% และ 66.6% หรือร้อยละ 0.444, 0.875 และ 0.666 ตามลำดับ นำอัตราการถ่ายทอดยีนที่ได้มาคำนวณหาค่าความถี่ของยีนทั้งสองได้ดังตารางที่ 4 และจากค่าความถี่ที่ได้นำมาคำนวณหาอัตราการกระจายตัวของยีนได้ดังตารางที่ 5 (expectation data)

ตารางที่ 4 แสดงความถี่ของการถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีน
ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้เป็นพ่อและแม่พันธุ์

Line	Frequency of gene transmission			
	CACV* nucleocapsid protein gene		CMV** replicase gene	
	A	a	B	b
CMV L13-x-47	-	-	0.375	0.635
CaCV L6	0.647	0.353	-	-
CaCV L7	0.423	0.577	-	-
CaCV L3	0.262	0.738	-	-

* A = with target CACV band, a = without target CACV band

** B = with target CMV band, b = without target CMV band

จากค่าความถี่ที่คำนวณได้เปรียบเทียบกับค่าสังเกตที่ได้จากผลของการตรวจสอบยีนทั้งสองในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 (ตารางที่ 5) พบว่า ค่า Chi-square ที่ได้จากกลุ่มผสมทั้งสามแบบมีค่าน้อยกว่า 7.82 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 3 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่าการกระจายตัวของยีนทั้งสองเป็นไปตามสมมติฐาน กล่าวคือ ในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1 ที่ได้จากกลุ่มผสมทั้งสามแบบมีการกระจายตัวของยีนทั้งสองไม่แตกต่างจากอัตราการกระจายตัวของยีนที่คำนวณได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น ไม่ว่าจะใช้มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สี่ดาทีย์ 4 สายพันธุ์ใดก็ตามเป็นกลุ่มผสมต่างให้ผลของการกระจายตัวของยีนตามอัตราการกระจายตัวของยีนที่ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ตนเอง

ตารางที่ 5 แสดงการกระจายตัวของยีนทั้งสองในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น F_1

Crosses (line)	Frequency of F_1 type* ob(ex)**				Chi- square	P-value
	AB	Ab	aB	ab		
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= with target CACV band, a = without target CACV band,

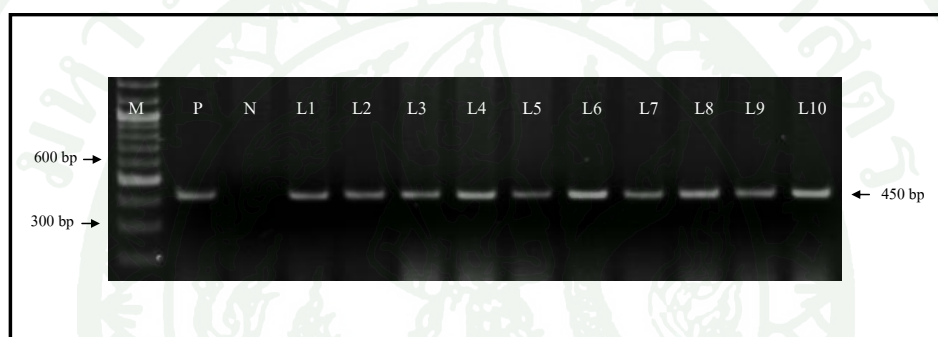
B=with target CMV band, b=without target CMV band

**ob= observation data, ex= expectation data

3. ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

3.1 ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CaCV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6

ผลการตรวจสอบยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ลีดาทิพย์ 4 line CaCV L6 จำนวนทั้งหมด 20 ต้น ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R₀ (positive control) จำนวน 20 ต้น คิดเป็นอัตราการถ่ายทอดยีนจากรุ่นพ่อ-แม่ สู่นุ่นลูก 100% (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผลการตรวจหายีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ลีดาทิพย์ 4 line CaCV L6 ด้วยเทคนิค PCR

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

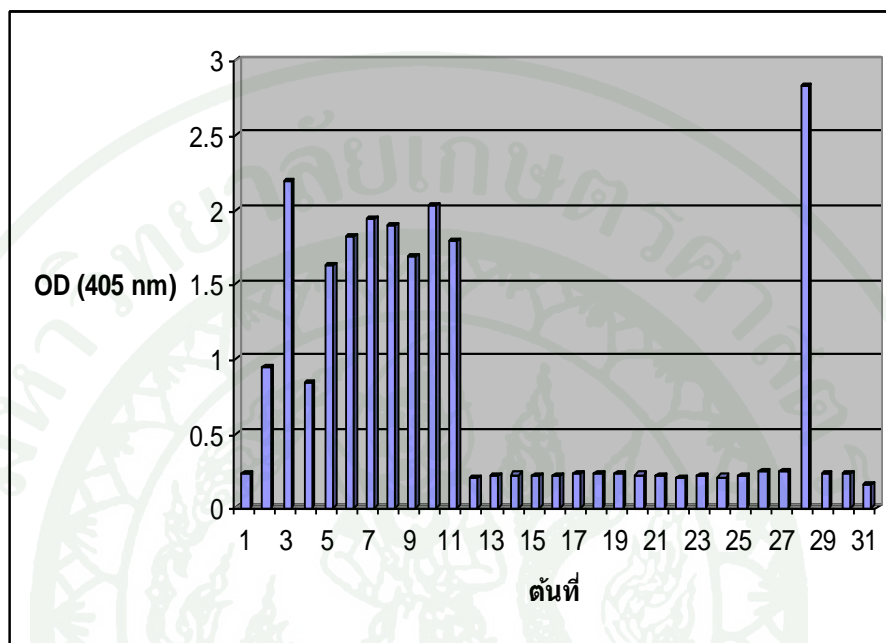
P : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R₀ (positive control)

N : มะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

L1-10 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ต้นที่ 1-10

ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CaCV พบต้นมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการของโรคทั้งหมด 10 ต้น โดยในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพบทั้งต้นที่แสดงลักษณะอาการของโรคและต้นที่ไม่แสดงลักษณะอาการของโรค ยืนยันผลการปลูกเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค ELISA (ภาพที่ 5) โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ต้นมะเขือเทศปกติ (ต้นที่ 1) เปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 2-11) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคนั้นสูงกว่าต้นมะเขือเทศปกติอย่างน้อย 2 เท่า เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม (ต้นที่ 12-31) พบต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าต้นมะเขือเทศปกติ 2 เท่า จำนวน 1 ต้น ได้แก่ ต้นที่ 28 ในขณะที่ต้นมะเขือเทศ

ที่เหลือมีค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสง 2 เท่าของมะเขือเทศปกตินับเป็นมะเขือเทศที่ต้านทานต่อเชื้อ CaCV



ภาพที่ 5 ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ด้วยเทคนิค ELISA

ต้นที่ 1 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-11 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 12-31 มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

จากผลการทดลองที่ได้พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ที่นำมาใช้เป็นแม่พันธุ์ในการสร้างมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดมีต้นที่ต้านทานต่อเชื้อ CaCV จำนวน 19 ต้น จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ทั้งหมด 20 ต้น คิดเป็น 95%

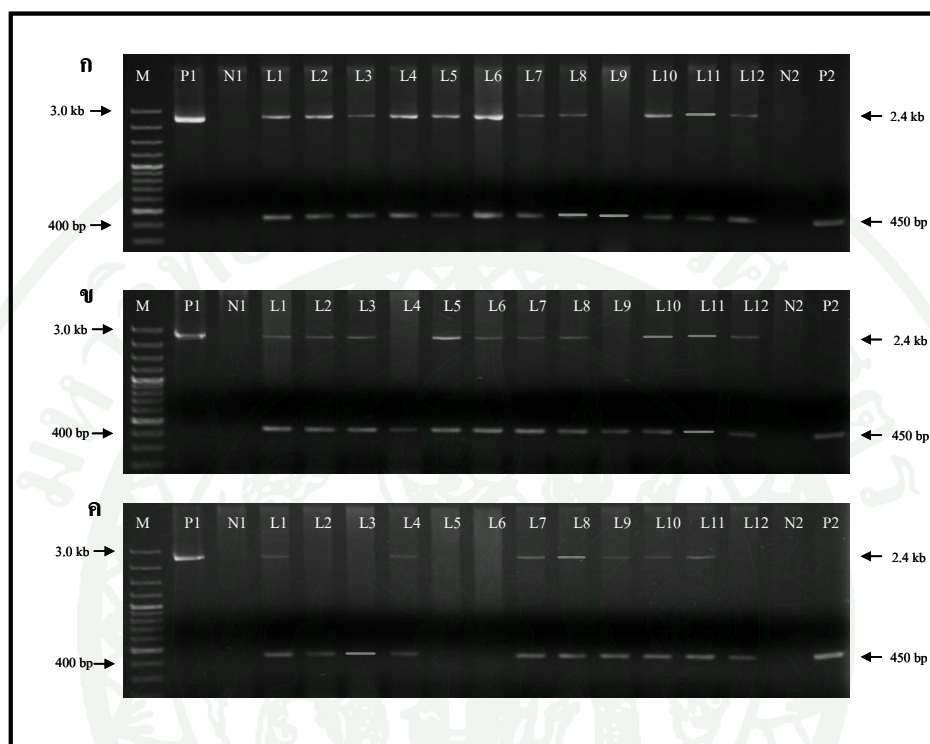
3.2 ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อทั้งสองชนิดในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรม

จากผลการตรวจสอบการถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมในรุ่นที่ 1 ทั้งหมด 24 กลุ่มสม เลือกลายพันธุ์ที่ได้จากกลุ่มผสมที่มีอัตราการถ่ายทอดยีนสูง ได้แก่ สายพันธุ์ที่ได้จากกลุ่มผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV และโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ปลูกเชื้อ CaCV กลุ่มที่ปลูกเชื้อ CMV และกลุ่มที่ปลูกทั้งเชื้อ CaCV และ CMV พร้อมกัน ตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนด้วยเทคนิค PCR ได้ผลดังภาพที่ 6

ต้นมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ CaCV เป็นเวลา 14 วัน ใบมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อและใบยอดที่เกิดขึ้นใหม่จะแสดงอาการจุดวงแหวนสีเหลืองหรือสีน้ำตาล ส่วนลำต้นและบริเวณยอดพบแผลสีน้ำตาล (ภาพที่ 7) ในบางครั้งอาจพบอาการใบและยอดไหม้อย่างรุนแรงทำให้ต้นมะเขือเทศตายได้ ในส่วนของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ CMV เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ใบมะเขือเทศเกิดอาการลดรูป บิดเบี้ยว ใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ลำต้นเริ่มแคระแกร็น (ภาพที่ 8)

เมื่อปลูกเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดเพื่อทดสอบต้านทานในต้นมะเขือเทศปกติ (พันธุ์สีดาทิพย์ 4) และมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากกลุ่มผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 แล้ว พบว่า ในชุดที่ทำการปลูกเชื้อ CaCV เพียงอย่างเดียว พบต้นมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการของโรคทั้งหมด 7 ต้น ในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมพบทั้งต้นที่แสดงลักษณะอาการของโรคและต้นที่ไม่แสดงลักษณะอาการของโรค สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นมะเขือเทศปกติกับต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคได้ดังภาพที่ 12 ยืนยันผลการปลูกเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค ELISA (ภาพที่ 9) โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ต้นมะเขือเทศปกติ (ต้นที่ 1) เปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 2-8) พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรสูงกว่าต้นมะเขือเทศปกติอย่างน้อย 2 เท่า เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรม (ต้นที่ 9-20) พบต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าต้นมะเขือเทศปกติ 2 เท่า จำนวน 8 ต้น ได้แก่

ต้นที่ 9, 10, 11, 12, 14, 15, 18 และ 20 ในขณะที่ต้นมะเขือเทศที่เหลือมีค่าการดูคลิ่นแสงน้อยกว่า ค่าการดูคลิ่นแสง 2 เท่าของมะเขือเทศปกติ ให้นำเป็นมะเขือเทศที่ต้านทานต่อเชื้อ CaCV



ภาพที่ 6 ผลการตรวจหาชิ้นเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และชิ้นนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F₁ ที่ทำการทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อ CaCV (ก), CMV (ข) และทั้งสองชนิดพร้อมกัน (ค) ด้วย PCR

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

P1 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีชิ้นเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์รุ่นพ่อ-แม่

N1 : มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P2 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนรุ่นพ่อ-แม่

N2 : มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

L1-12 : มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง

line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 ต้นที่ 1-12



ภาพที่ 7 อาการของต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

CaCV สายพันธุ์ KK เป็นเวลา 14 วัน

ก. ต้นมะเขือเทศปกติ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับต้นที่เป็นโรค (ขวา)

ข. ใบมะเขือเทศปกติ

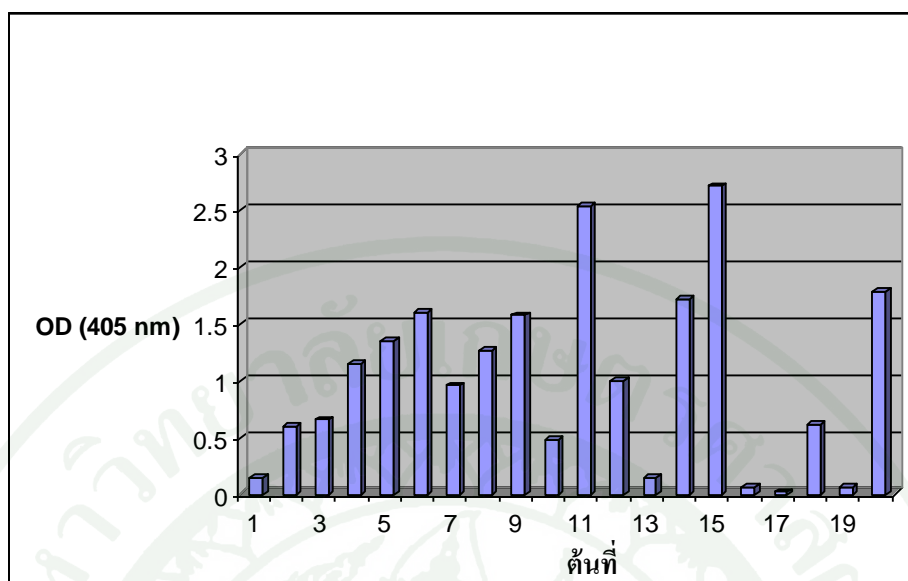
ค. ใบมะเขือเทศที่เป็นโรค



ภาพที่ 8 อาการของต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 21 วัน
 ก. ต้นมะเขือเทศปกติ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับต้นที่เป็นโรค (ขวา)
 ข. ใบมะเขือเทศปกติ
 ค. ใบมะเขือเทศที่เป็นโรค

ในชุดที่ทำการปลูกเชื้อ CMV เพียงอย่างเดียว ต้นมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ แสดงอาการของโรคในทุกๆต้น จากจำนวนมะเขือเทศทั้งหมด 7 ต้น ในขณะที่ในมะเขือเทศรวมยีน พบต้นที่แสดงลักษณะอาการของโรคและต้นที่ไม่แสดงลักษณะอาการของโรค สามารถแยก ความแตกต่างระหว่างต้นมะเขือเทศปกติกับต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคได้ดังภาพที่ 13 ยืนยันผลการ ปลูกเชื้อ CMV จากการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA (ภาพที่ 10) ที่ค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรเช่นกัน ต้นมะเขือเทศปกติ (ต้นที่ 1) เปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 2-8) พบว่า ค่าที่ได้จากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคมีค่าการดูดกลืนแสง มากกว่าต้นมะเขือเทศปกติอย่างน้อย 2 เท่า เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศรวมยีน คัดแปลงพันธุกรรม (ต้นที่ 9-20) แล้ว พบต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าต้นมะเขือเทศปกติ 2 เท่า จำนวน 4 ต้น ได้แก่ ต้นที่ 11, 12, 13 และ 15 ในขณะที่ต้นมะเขือเทศที่เหลือมีค่าการดูดกลืน แสงน้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสง 2 เท่าของมะเขือเทศปกติ ให้นับเป็นมะเขือเทศที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV

ในชุดสุดท้ายที่ทำการปลูกเชื้อ CMV และ CaCV พร้อมกัน พบว่า ในช่วง 14 วัน มะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อทั้งสอง แสดงอาการจุดวงแหวนสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อ CaCV ทั้ง 7 ต้น ต่อมาในช่วงระหว่างวันที่ 14-21 มะเขือเทศที่เกิดอาการยอดไหม้อย่างรุนแรงจนตายลง จำนวน 4 ต้น เหลือมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อทั้งสองเพียง 3 ต้น แสดงอาการใบด่างที่เกิด จากเชื้อ CMV เมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน ในมะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมมีทั้งต้นที่แสดง อาการของโรคและไม่แสดงอาการของโรค ทั้งที่เกิดจากเชื้อ CMV และ CaCV ยืนยันผลที่ได้ด้วย เทคนิค ELISA (ภาพที่ 11) โดยต้นมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 2-8) มีค่าการดูดกลืน แสงมากกว่า 2 เท่าของต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ ในการตรวจสอบเชื้อ CMV นั้น ต้นมะเขือเทศ รวมยีนคัดแปลงพันธุกรรม (ต้นที่ 9-20) พบต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าต้นมะเขือเทศ ปกติ 2 เท่า จำนวน 5 ต้น ได้แก่ ต้นที่ 9, 16, 17, 19 และ 20 ในขณะที่เชื้อ CaCV นั้น พบต้นที่มีค่า การดูดกลืนแสงมากกว่าต้นมะเขือเทศปกติ 2 เท่าทุกต้น ยกเว้นต้นที่ 16 ที่มีค่าการดูดกลืนแสง ใกล้เคียงกับต้นมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ จากผลที่ได้แสดงว่า มีต้นมะเขือเทศรวมยีน คัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV จำนวน 7 ต้น ต้านทานต่อเชื้อ CaCV จำนวน 1 ต้น ไม่ ต้านทานต่อเชื้อใดๆ จำนวน 4 ต้น และไม่พบต้นมะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมดัดที่ต้านทาน ทั้งต่อเชื้อ CMV และ CaCV ดังที่แสดงในตารางที่ 6

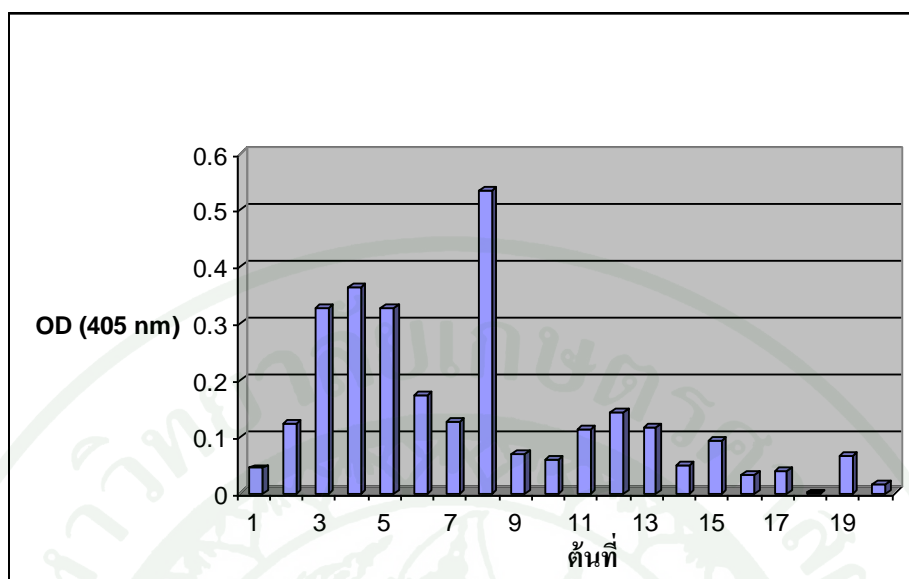


ภาพที่ 9 ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลง พันธุกรรมที่ได้จากกลุ่มผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 ด้วยเทคนิค ELISA

ต้นที่ 1 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-8 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 9-20 มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ

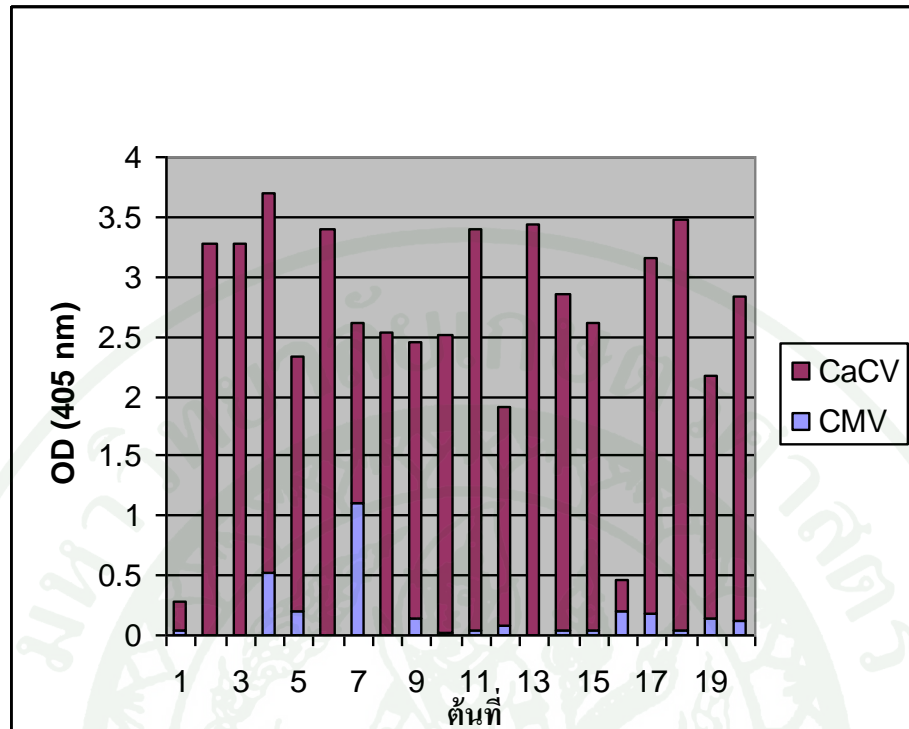


ภาพที่ 10 ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 21 วัน ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลง พันธุกรรมที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 ด้วยเทคนิค ELISA

ต้นที่ 1 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-8 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 9-20 มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ



ภาพที่ 11 ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV และ CMV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วันและ 21 วันในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 ด้วยเทคนิค ELISA

ต้นที่ 1 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-8 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ CaCV และ CMV

ต้นที่ 9-20 มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ



ภาพที่ 12 ต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ CaCV สายพันธุ์ KK เป็นเวลา 14 วัน
 ก. ต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค (ต้นที่ 2 และ 4) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่เป็นโรค (ต้นที่ 1 และ 3)

ข. ใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 1)

ค. ใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 2)

ง. ใบมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (CaCV L6-6 × CMV L13-x-47-22) ที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงลักษณะต้านทานต่อโรค (ต้นที่ 3)

จ. ใบมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (CaCV L6-6 × CMV L13-x-47-22) ที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค (ต้นที่ 4)



ภาพที่ 13 ต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 21 วัน
 ก. ต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค (ต้นที่ 2 และ 4) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่เป็นโรค (ต้นที่ 1 และ 3)
 ข. ใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 1)
 ค. ใบมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ (ต้นที่ 2)
 ง. ใบมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (CaCV L6-6 ×CMV L13-x-47-22) ที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงลักษณะต้านทานต่อโรค (ต้นที่ 3)
 จ. ใบมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (CaCV L6-6 ×CMV L13-x-47-22) ที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค (ต้นที่ 4)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV และ CaCV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลง พันธุกรรม รุ่น F₁

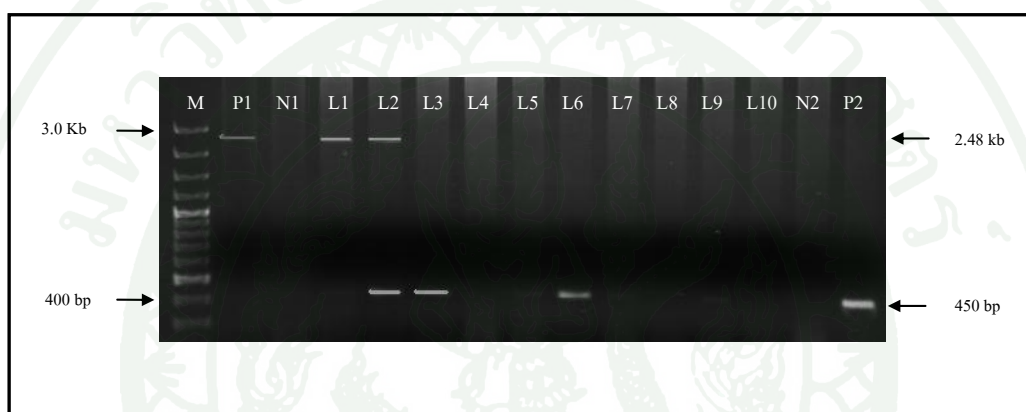
No.	CaCV		CMV		CaCV+CMV	
	N + rep	R/S	N + rep	R/S	N + rep	R/S
Seedathip 4 (control)						
1	-	S	-	S	-	-*
2	-	S	-	S	-	-*
3	-	S	-	S	-	S
4	-	S	-	S	-	S
5	-	S	-	S	-	-*
6	-	S	-	S	-	S
7	-	S	-	S	-	-*
CaCV L6-6 × CMV L13-x-47-22						
1	+/+	S	+/+	R	+/+	S/S
2	+/+	S	+/+	R	+/+	S/R
3	+/+	S	+/-	S	+/+	S/R
4	+/+	S	+/+	S	+/-	S/R
5	+/+	R	-/-	S	+/+	S/R
6	+/+	S	-/-	R	+/+	S/R
7	+/+	S	+/+	S	+/+	S/R
8	+/+	R	+/+	R	+/+	R/S
9	+/-	R	+/+	R	+/-	S/S
10	+/+	S	+/+	R	+/+	S/R
11	+/+	R	+/+	R	+/+	S/S
12	+/+	S	+/+	R	+/+	S/R

* ต้นมะเขือเทศตาย

จากผลที่ได้สังเกตว่า ในการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV หรือ CaCV เพียงเชื้อเดียว พบว่ามะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมบางต้นแม้จะตรวจสอบพบชิ้นส่วนยีน แต่เมื่อปลูกเชื้อไวรัสเพื่อทดสอบพบต้นที่ไม่ต้านทาน โดยในกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CaCV มะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมตรวจพบยีนนิวคลีโอแคปซิด โปรตีนทั้งหมด แต่พบต้นที่ต้านทานเพียง 4 ต้นเท่านั้น คิดเป็น 33.33% และในกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CMV ตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ จำนวน 9 ต้น จากทั้งหมด 12 ต้น และเมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV พบต้นที่ต้านทานจำนวน 7 ต้น คิดเป็น 77.77 % ในกลุ่มที่ปลูกเชื้อทั้งสองชนิดพร้อมกัน ตรวจพบยีนนิวคลีโอแคปซิด โปรตีนทั้งหมด พบต้นที่ต้านทานเพียงต้นเดียว คิดเป็น 8.33% และตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์จำนวน 10 ต้น จากทั้งหมด 12 ต้น พบต้นที่ต้านทานจำนวน 7 ต้น คิดเป็น 70 %

4. ผลการทดสอบลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมหลังการรวมยีน

จากผลการตรวจสอบยีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมในทุกๆกลุ่มผสม (bulk) (ภาพที่ 14) จำนวนทั้งหมด 54 ต้น ตรวจสอบต้นมะเขือเทศที่ไม่มียีนจำนวน 16 ต้น ต้นมะเขือเทศที่มีเพียงยีนเดียวจำนวน 31 ต้น และต้นมะเขือเทศที่มีทั้งสองยีนจำนวน 7 ต้น รวมกับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 จำนวน 7 ต้น และมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 จำนวน 8 ต้น รวมมะเขือเทศที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดจำนวน 69 ต้น



ภาพที่ 14 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (bulk) บางตัวอย่างที่ทำการทดสอบลักษณะประจำพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR

- M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA ladder marker (Fermentas)
 P1 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์รุ่นพ่อ-แม่
 N1 : มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
 P2 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนรุ่นพ่อ-แม่
 N2 : มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
 L1-10 : มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

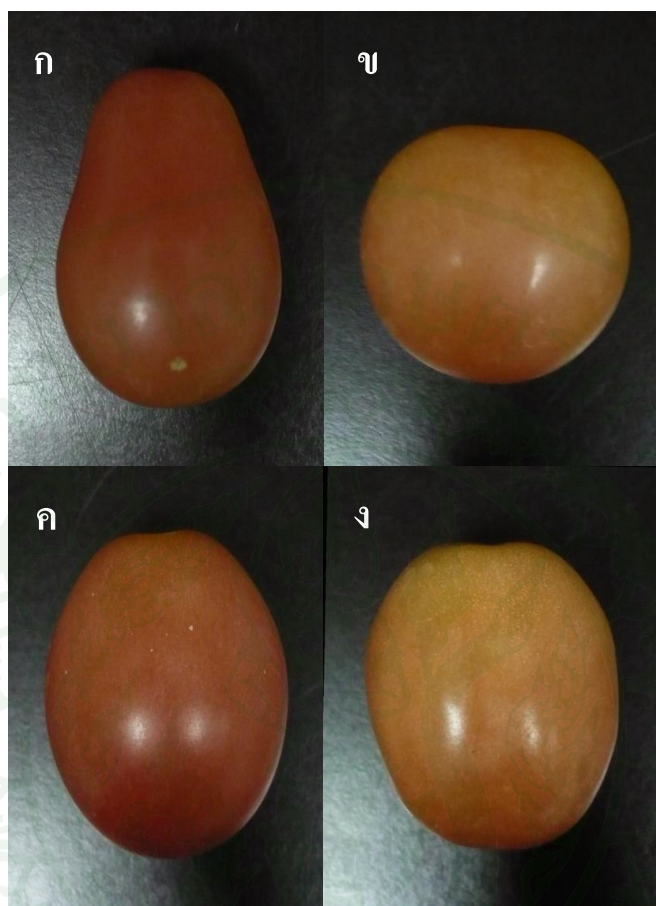
มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม ได้มาจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเดี่ยว (semi-determinate type) ผสมข้ามดอกกับมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเดี่ยวเช่นกัน ผลที่ได้พบว่ามะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม รุ่นที่ F₁ ทั้งหมด 54 ต้นมีลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเดี่ยวทั้งหมด

เก็บผลมะเขือเทศที่ได้จากทั้งสามกลุ่มทดลองและมะเขือเทศชุดควบคุม ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อมะเขือเทศผลแรกเริ่มสุก เก็บผลผลิตที่ได้ทั้งหมด เป็นระยะเวลา 40 วัน พบว่า ผลมะเขือเทศที่ได้จากทั้งสามกลุ่มทดลองและมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 มีรูปร่างผลเป็นแบบรูปทรงรี (ellipsoid or plum shape) ค่อนข้างกลม (rounded) พบรูปผลแบบแพร์ (obovoid or pear shape) พบผลแบบทรงกลม (rounded) และรูปทรงสี่เหลี่ยม (rectangular) บ้างเล็กน้อย

จากผลมะเขือเทศที่เก็บเกี่ยวได้ทั้งหมด พบว่าผลมะเขือเทศมีสีผลที่อยู่ระหว่างสีชมพูถึงสีชมพูอมแดงเข้ม โดยมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 มีผลสีชมพูอมแดงเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และมะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมพบผลเป็นสีชมพูอมแดงเข้มเกือบทั้งหมด และพบมะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมบางสายพันธุ์มีผลสีชมพูแดงอมส้มบ้างเล็กน้อย

จากผลมะเขือเทศทั้งหมด 2007 ผล ที่ได้จากมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมรวมทั้ง 5 กลุ่มการทดลอง นำมาหาค่าดัชนีแล้วพบว่า ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองอย่างชัดเจน แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองแล้วกลับไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลที่ได้คาดว่าเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณมาก อีกทั้งยังมีความแปรปรวนสูงในกลุ่มการทดลองเอง จึงกำหนดให้คัดเลือกผลมะเขือเทศที่มีขนาดใหญ่ที่สุด 10 ลำดับแรกของแต่ละต้น และต้นที่มีผลผลิตไม่ถึง 10 ผลให้ตัดออก ไม่นำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย รวมทั้งขนาดผล (shape index; Z) ซึ่งใช้ข้อกำหนดเดียวกันนี้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลที่ได้พบว่าค่าดัชนีของแต่ละกลุ่มนั้นมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 มีน้ำหนักผลเฉลี่ยสูงสุด (ตารางที่ 7) ในขณะที่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 มีน้ำหนักผลเฉลี่ยต่ำที่สุด และมะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างมะเขือเทศคัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 มีน้ำหนักผลเฉลี่ยอยู่ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ปกติทั้งสองสายพันธุ์ ยกเว้นมะเขือเทศรวมยีนในกลุ่มที่พบเพียงยีนเดียวที่มีน้ำหนักผลเฉลี่ยไม่แตกต่างกับน้ำหนักผลเฉลี่ยของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 14 รูปร่างผลของมะเขือเทศแบบต่างๆ ที่พบในมะเขือเทศพันธุ์สีดำทิพย์ 3 และในมะเขือเทศพันธุ์สีดำทิพย์ 4

ก. ผลแบบแพร์ (obovoid or pear shape)

ข. ผลแบบทรงกลม (rounded)

ค. ผลแบบรูปทรงรี (ellipsoid or plum shape)

ง. ผลแบบรูปทรงสี่เหลี่ยม (rectangular)



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบสีผลของมะเขือเทศที่พบในมะเขือเทศพันธุ์ลีดาทิพย์ 3, 4 และในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม

- ก. ผลสีชมพู
- ข. ผลสีชมพูอมแดง
- ค. ผลสีชมพูอมแดงเข้ม

ขนาดผลที่ได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง พบว่า ค่า Z ที่ได้จากมะเขือเทศพันธุ์ปกตินั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกับค่า Z ที่ได้จากมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสามกลุ่ม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มมะเขือเทศพันธุ์ปกติกับกลุ่มมะเขือเทศรวมยีน

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศรวมยีนคัดแปลงพันธุกรรม

ลักษณะ	การเจริญเติบโต	รูปร่างผล	สีผล	น้ำหนักผลเฉลี่ย* (กรัม)	ขนาดผล* (Z)
สีดาทิพย์ 3	กึ่งเลื้อย	รูปทรงรี	ชมพูอมแดงเข้ม	16.22c	1.25b
สีดาทิพย์ 4	กึ่งเลื้อย	รูปทรงรี	ชมพูอมแดง	21.12a	1.28b
กลุ่มไม่มียีน	กึ่งเลื้อย	รูปทรงรี	ชมพูอมแดงเข้ม	17.53b	1.32a
กลุ่มยีนเดี่ยว	กึ่งเลื้อย	รูปทรงรี	ชมพูอมแดงเข้ม	16.78c	1.35a
กลุ่มสองยีน	กึ่งเลื้อย	รูปทรงรี	ชมพูอมแดงเข้ม	17.48b	1.33a

* ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการแบบ CRD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

วิจารณ์ผลการทดลอง

อัญญรัตน์ (2553) ได้ทำการประเมินความต้านทานมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมต่อเชื้อ CMV ถึงรุ่นที่ R_3 โดยพบว่า มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CMV L13 ตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ด้วย PCR ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมทุกต้น คิดเป็น 100% และคัดเลือกต้นที่ตรวจพบยีนได้ถึงรุ่นที่ R_3 คาดว่ามะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้เป็นสายพันธุ์แท้ แต่ในการทดลองนี้ได้นำมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CMV L 13-x-47 มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์พบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมรุ่นที่ R_4 60.87% จึงไม่อาจยืนยันได้ว่า line CMV L 13-x-47 เป็นสายพันธุ์แท้โดยสมบูรณ์เนื่องจากการตรวจสอบยีนด้วย PCR ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้ (homozygous genotype) กับต้นที่ยังมีการกระจายตัวของยีน (hemizygous genotype) ได้เหมือนเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีการข่มร่วมกัน (codominant marker) สามารถแยกต้นที่เป็นสายพันธุ์แท้กับต้นที่ยังมีการกระจายตัวของยีนออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ต้องใช้เอ็นเอคุณภาพดีและมีปริมาณมากพอ อีกทั้งมีกระบวนการยุ่งยากและใช้เวลานาน (สุรินทร์, 2552) จึงไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในตัวอย่างพืชที่มีปริมาณมากเช่นการทดลองนี้

การตรวจสอบพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CMV L 13-x-47 รุ่นที่ R_4 ที่พบเพียง 60.87% คาดว่าเกิดจากการคัดเลือกในรุ่นที่ R_1 ที่เป็นการคัดเลือกแบบกลุ่ม (family selection) โดยเก็บผลผลิตที่ได้ในรุ่นแรกแบบไม่แยกต้นจึงอาจทำให้เกิดการปะปนระหว่างเมล็ดที่เป็นสายพันธุ์แท้ เมล็ดที่ยังมีการกระจายตัวของยีน และเมล็ดที่ไม่มียีน เมื่อคัดต้นที่ตรวจไม่พบทิ้งไปด้วยเทคนิค PCR มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ที่เหลือเพื่อใช้เป็นต้นแม่พันธุ์จึงเป็นทั้งแบบ homozygous และ hemizygous แม้การผสมตัวเองในรุ่นถัดไปจะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่เป็น homozygous และ hemizygous ได้ก็ตามการคัดเลือกในครั้งนี้เกิดจากการผสมตัวเองตามธรรมชาติ ไม่มีการกำจัดเกสรเพศผู้ แม้มะเขือเทศจะเป็นพืชผสมตัวเองโดยธรรมชาติ แต่สามารถเกิดการผสมข้ามได้ หากมะเขือเทศที่เป็นสายพันธุ์แท้ผสมกับมะเขือเทศที่ไม่ใช่สายพันธุ์แท้จะสามารถตรวจพบยีนได้ทั้งหมดในมะเขือเทศรุ่นถัดไป แต่ในรุ่นต่อมาก็จะเกิดการกระจายตัวของยีนอีกครั้ง ดังผลที่แสดงให้เห็นในการตรวจสอบยีนในรุ่นที่ R_4 การคัดเลือกแบบแยกต้น (line selection) โดยคัดเลือกแต่ละต้นแยกจากกันในแต่ละรุ่น (กฤษฎา, 2546) และมีส่วนตอนการกำจัดเกสรเพศผู้ร่วมด้วยจะเพิ่มค่าความถี่ของต้นที่เป็นชนิดพันธุ์แท้มากขึ้นและเข้าสู่สายพันธุ์แท้ในที่สุด

การรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในต้นมะเขือเทศสามารถดำเนินการได้หลายวิธี แต่การทดลองในครั้งนี้เลือกวิธีการรวมยีนแบบผสมข้ามเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและไม่จำเป็นต้องออกแบบพลาสมิดที่มีหลายยีนขึ้นมาใหม่ (Francois *et al.*, 2002) การถ่ายยีนซ้ำ (re-transformation) หรือการถ่ายยีนหลายๆยีนพร้อมกันเพียงครั้งเดียว (co-transformation) อาจไม่จำเป็นในกรณีที่มีพ่อและแม่พันธุ์เป็นพืชตัดแปลงพันธุกรรมอยู่แล้ว อีกทั้งในบางกรณีพบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังที่พบในการรวมยีนเรพลิเคชันของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและไวรัสใบด่างแดงในคราวเดียวแบบหลายพลาสมิด (multiple-plasmid co-transformation) ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ซึ่งมีมะเขือเทศรวมยีนในอัตรา 32.26% (วรพงศ์, 2547)

อย่างไรก็ตาม การผสมข้ามเพื่อรวมยีนหากพ่อแม่พันธุ์มีพันธุกรรมที่แตกต่างกันมาก ลูกผสมที่ได้แม้จะมียีนที่ต้องการซึ่งได้จากทั้งต้นพ่อและต้นแม่ แต่ผลที่เกิดจาก linkage effect จะทำให้ลูกผสมได้ยีนที่มีลักษณะที่ไม่ต้องการติดมาด้วย และถ้าหากจำนวนยีนที่ต้องการรวบรวมมีมากขึ้นและพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้แตกต่างกัน ลูกผสมที่ได้ก็จะมีลักษณะที่ไม่ต้องการติดมามากขึ้นด้วยเช่นกัน (Halpin, 2005; Douglas and Halpin, 2010) แต่ในการรวมยีนแบบผสมข้ามระหว่างมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 นั้น เนื่องจากการพัฒนาพันธุ์จากพ่อและแม่พันธุ์กลุ่มเดียวกัน จึงไม่มีปัญหาในเรื่องของการผสมติด การพัฒนาของผลและเมล็ด และการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ อีกทั้งเป็นมะเขือเทศพันธุ์การค้าที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน ลักษณะที่ผู้บริโภคไม่ต้องการจึงถูกคัดทิ้งตั้งแต่เริ่มมีการพัฒนาสายพันธุ์ (กรุง และคณะ, 2537) หากสามารถรวมยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้มากขึ้นกว่าเดิมจะได้สายพันธุ์มะเขือเทศที่เป็นประโยชน์ตรงตามความต้องการของตลาด

ผลการรวมยีนมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้นำไปวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของยีนด้วยวิธีทางสถิติพบว่า เป็นไปตามค่าคาดหวัง การกระจายตัวของยีนทั้งสองในรุ่นลูก (F_1) เป็นไปตามค่าความถี่ของการถ่ายทอดยีนในรุ่นพ่อแม่ อย่างไรก็ตามการกระจายตัวของยีนที่ได้ไม่นับตรงตามอัตราส่วนของเมนเดล (ตารางที่ 5) โดยหากพ่อแม่พันธุ์เป็นสายพันธุ์แท้ ลูก (F_1) ที่ได้จะมีจีโนไทป์เพียงแบบเดียว คือ AaBb เมื่อตรวจสอบยีนทั้งสองด้วย PCR จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอในรุ่นลูกทุกๆต้น (Datta *et al.*, 2002) แต่จีโนไทป์ที่ได้จากการผสมข้ามในครั้งนี้มีถึงสี่แบบ คือ AaBb, Aabb, aaBb และ aabb ทั้งนี้เนื่องจากมะเขือเทศที่ใช้เป็นทั้งพ่อและแม่พันธุ์ไม่ได้เป็นสายพันธุ์แท้แต่มีลักษณะเป็นแบบ hemizygous ซึ่งในพืชตัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด พบการกระจายตัวของยีนทั้งที่เป็นไปตามกฎและไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล โดยมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้องทั้งปัจจัย

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

มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้นำมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด พบความต้านทานต่อโรคที่แตกต่างกันไป ยีนต้านทานเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมได้มาจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CMV L 13-x-47-22 ที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ โดยมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์นี้ได้ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV ตั้งแต่รุ่น R₁-R₃ พบความต้านทานในระดับสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรุ่น R₃ ที่มีจำนวนต้นต้านทานคิดเป็น 100% (อัญญรัตน์, 2553) ในขณะที่ยีนต้านทานเชื้อไวรัส CaCV ได้มาจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 6-6 ที่ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ โดยมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์นี้ยังไม่ได้ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CaCV จึงทำการทดสอบความต้านทานในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 6 พบต้นที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงถึง 95%

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดที่ทดสอบด้วยด้วยเทคนิค ELISA เปรียบเทียบกันในสามกลุ่มการทดลองแล้ว พบว่า ในกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CMV เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CMV ร่วมกับเชื้อ CaCV มีปริมาณของเชื้อไวรัส CMV ไม่แตกต่างกันมากนัก (ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยเท่ากับ 0.485 และ 0.817 ตามลำดับ) และความต้านทานต่อเชื้อ CMV ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ไม่แตกต่างกัน คือ 70%-77.77% โดยทั่วไปแล้วการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ 30RS ด้วย anti-CMV antibody ในต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ พบว่ามีค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยอยู่ที่ 0.8 (มณีรัตน์, 2547) มีค่าใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการทดลอง แต่ในการประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ของอัญญรัตน์(2553) ตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสพบค่า O.D._{405nm} ที่มากกว่า 1 ขึ้นไป เมื่อปลูกเชื้อ CMV เป็นเวลา 21 วัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากเชื้อไวรัสเอง พบรายงานว่าในการทดสอบปริมาณเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ KPS10 ในทุกๆ ช่วงสัปดาห์ มีค่า O.D._{405nm} ที่แตกต่างกัน โดยหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ปริมาณเชื้อจะลดลง (วิภาวี, 2550) โดยปริมาณเชื้อ CMV ที่มากขึ้นแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาสามารถพบได้บ่อยครั้ง

ในกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CaCV เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CaCV ร่วมกับเชื้อ CMV พบว่า ในกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CaCV ร่วมกับเชื้อ CMV มีปริมาณของเชื้อ CaCV (ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยเท่ากับ 3.202) มากกว่าในกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CaCV เพียงอย่างเดียว (ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยเท่ากับ 1.276)

ต่างจากรายงานการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV สายพันธุ์ KK ด้วย MYSV6 antibody ในต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ ที่พบว่ามียีน O.D._{405nm} เฉลี่ยอยู่ที่ 1.781 เท่านั้น (Sripiban, 2011) แต่มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CaCV เพียงอย่างเดียว ปริมาณของเชื้อไวรัส CaCV ที่มากกว่าในกลุ่มที่ปลูกเชื้อไวรัสด้วยกัน ส่งผลต่อระดับความรุนแรงของโรคซึ่งเห็นได้จากมะเขือเทศปกติที่ทำการปลูกเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดมีอาการใบและลำต้นไหม้อย่างรุนแรง ทำให้มะเขือเทศที่ทำการทดสอบตายไปถึง 4 ต้นจากมะเขือเทศทั้งหมด 7 ต้น (ตารางที่ 6) ซึ่งปริมาณของเชื้อไวรัสที่มากนี้อาจส่งผลต่อความต้านทานของมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่พบว่ามีความต้านทานลดลงในกลุ่มที่ปลูกเชื้อ CMV ร่วมกับเชื้อ CaCV

การเข้าทำลายของเชื้อไวรัสหลายชนิดในพืชเพียงต้นเดียวสามารถพบได้โดยทั่วไป โดยเฉพาะในมะเขือเทศซึ่งเป็นพืชที่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากมายหลายชนิด และจากการศึกษาพบว่ามะเขือเทศจะแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงเมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป (Balogun *et al.*, 2002; Balogun, 2008; Mascia *et al.*, 2010; Mohamed, 2010) เช่นในมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Tomato chlorosis virus* (ToCV) และ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) จะแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงและตายลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่ามะเขือเทศพันธุ์ต้านทานที่มียีน Sw-5 ที่ต้านทานต่อเชื้อ TSWV นั้น เมื่อปลูกเชื้อ ToCV แล้วตามด้วยเชื้อ TSWV จะทำให้เกิดการลดหรือยับยั้งระดับของความต้านทานลง (Glaciá-Cano *et al.*, 2006) อย่างไรก็ดี ในบางกรณีการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสสองชนิดอาจไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน เช่น ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ TSWV และ CMV พบว่าต้นมะเขือเทศรวมยีนมีระดับความต้านทานที่คงตัวเมื่อปลูกเชื้อทั้งสองชนิดพร้อมกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ปลูกเชื้อไวรัสเพียงชนิดเดียว (Gonsalves *et al.*, 1996)

ความต้านทานต่อเชื้อ CMV เกิดจากการแสดงออกของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (replicase-mediated resistance) ที่ถูกถ่ายเข้าสู่ต้นมะเขือเทศ โดยกลไกนี้อาจเกิดขึ้นในระดับอาร์เอ็นเอ (Hellwald and Palukaitis, 1995) หรือในระดับโปรตีน (Wintermantel and Zaitlin, 2000) ในขณะที่ความต้านทานต่อเชื้อทอสปอไวรัสในต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein gene) เกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน (N protein-mediated protection) (Gonsalves *et al.*, 1996) และในระดับอาร์เอ็นเอ (RNA-mediated resistance) โดยกระบวนการที่เรียกว่า post-transcriptional gene silencing (PTGS) และพบว่าการใช้ยีนนิวคลีโอโปรตีนที่มีขนาดมากกว่า 387 เบสขึ้นไป จึงทำให้ต้นพืชเกิดความต้านทาน (Pang *et al.*, 1997; Jan

et al.,2000) อย่างไรก็ตามยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนที่ถ่ายเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 มีขนาดมากกว่า 1200 เบส คาดว่าไม่มีผลต่อความต้านทานที่ลดลงเมื่อขึ้นส่วนยีนมีขนาดเล็กกว่า 200 เบส

นอกจากขนาดของยีนส่วนยีนแล้ว พบว่าความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดเชื้อไวรัสมีผลต่อความต้านทานต่อโรคด้วยเช่นกัน เนื่องจากมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากเชื้อไวรัส CMV Subgroup IA สายพันธุ์ Fny ในขณะที่เชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดลองนั้นเป็นเชื้อไวรัส CMV Subgroup IB สายพันธุ์ 30RS อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงความต้านทานต่อเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เมื่อใช้ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ Fny ได้ (อัญญรัตน์, 2553; Zhang, 2005) และในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนที่ได้จากเชื้อไวรัส CaCV สายพันธุ์ AIT แต่เชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อไวรัส CaCV สายพันธุ์ KK (Seepiban, 2011) ซึ่งพบรายงานเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนระหว่างเชื้อไวรัส CaCV ทั้งสองสายพันธุ์ที่ระดับความเหมือน 93% (Chiamsombat *et al.*, 2008) และเมื่อพิจารณาร่วมกับความต้านทานต่อเชื้อ CaCV ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 6 แล้ว คาดว่าความแตกต่างระหว่างยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของเชื้อไวรัส CaCV ทั้งสองสายพันธุ์มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีผลกระทบต่อความต้านทานในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เลย

ความต้านทานที่ลดลงของมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของการแสดงออกของยีนซึ่งเกิดขึ้นได้บ่อยครั้งในพืชตัดแปลงพันธุกรรม ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนอาจเกิดจากจำนวนชุดของยีนส่วนยีน การเกิด RNA silencing ตำแหน่งแทรกสอดของยีนส่วนยีน รวมไปถึงส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน (regulatory sequence) (Butaye *et al.*, 2005)

โดยทฤษฎีแล้วจำนวนชุดของยีนมากน่าจะเกิดการแสดงออกของยีนมากเช่นกัน แต่กลับพบว่าจำนวนชุดของยีนที่มากขึ้นก่อให้เกิดการรวมกันเป็นรูปแบบเชิงซ้อนที่ส่งผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่ำ โดยเฉพาะรูปแบบที่เกิดจากการเรียงตัวซ้ำกันของลำดับเบสเป็นช่วงยาว (tandem repeat) และลำดับเบสที่กลับทิศทางกัน (inverted repeat) (Wang and Waterhouse, 2000; Muskens *et al.*, 2000) การเข้าคู่กันของเบสคู่สมเป็นรูปแบบเชิงซ้อนนี้จะทำให้เกิด homology-

dependent gene silencing (HDGS) ขึ้น และส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนหรือการแสดงออกของ ยีนได้ (Meyer and Saedler, 1996)

ในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมพบความต้านทานที่ลดลงจากการเข้าทำลายของ เชื้อ CMV และ CaCV เมื่อกลับไปพิจารณาถึงความต้านทานที่เกิดขึ้นทั้งในมะเขือเทศตัดแปลง พันธุกรรม line CMV L 13-x-47 และ line CaCV L 6 ซึ่งเป็นต้นสายพันธุ์ของพ่อและแม่พันธุ์ที่ใช้ ในการสร้างมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมพบว่ามีความต้านทานสูง โดยมะเขือเทศตัดแปลง พันธุกรรม line CMV L 13-x-47 มีการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization ทั้งในรุ่น R₁ และ R₂ พบจำนวนชุดของยีนเพียง 2 ชุดเท่านั้น ทำให้มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์นี้คงความต้านทานในระดับสูง (อัญญรัตน์, 2553) ในขณะที่มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 6 ยังไม่มีการตรวจสอบยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนด้วย เทคนิค genomic Southern hybridization ทำให้ไม่ทราบจำนวนชุดของยีนที่แน่นอน อย่างไรก็ตาม มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนด้วยการ ใช้เชื้อ *Agrobacterium* ซึ่งเกิดการแทรกสอดของชิ้นส่วนยีนในจำนวนชุดที่ต่ำกว่าการถ่ายยีน โดยตรง (ตัวอย่างเช่น particle bombardment หรือ electroporation เป็นต้น) ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนของ ยีนในจำนวนชุดที่มากและหลากหลายตำแหน่ง (Gelvin, 2003) เมื่อพิจารณาร่วมกับความต้านทาน ต่อเชื้อ CaCV ที่ค่อนข้างสูงในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 6 คาดว่า ในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L 6 ที่ได้รับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนนั้นมีจำนวนชุดของ ยีนต่ำ และไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกับมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CMV L 13-x-47

จากความต้านทานต่อโรคสูงในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CMV L 13-x-47 และ line CaCV L 6 และเมื่อทดสอบต้านทานในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่รวมยีนทั้งสองเข้าด้วยกันพบว่า มีความต้านทานต่อโรคที่ลดลง คาดว่าอาจเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างส่วนที่ เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน โดยพบว่าการรวมทรานส์ยีนแบบยีนเดี่ยว (combining individual transgenes) โดยใช้ promoter ชนิดเดียวกันจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ HDGS ยับยั้ง การแสดงออกของยีน (Matzke and Matzke, 1995; Kooter *et al.*, 1999) แม้จะทำการรวมยีนแบบ พลาสมิดเดี่ยว (single-plasmid co-transformation) แต่หากชิ้นส่วนยีนใช้ promoter แยกกันและเป็น promoter ชนิดเดียวกันแล้ว พบว่ายังคงมีความแปรปรวนของระดับความต้านทานที่เป็นผลมาจากการใช้ promoter ชนิดเดียวกันอยู่ (Prins *et al.*, 1995) และเนื่องจากการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่

สมบูรณ์ของเชื้อ CMV เข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ใช้พลาสมิด pCMV N/B-23 (Anderson *et al.*, 1992) ที่มี CaMV 35S promoter เช่นเดียวกับการถ่ายยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนของเชื้อ CaCV เข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ที่ใช้พลาสมิด p1355 CaCV-AIT ที่มี CaMV 35S promoter ด้วยเช่นกัน การใช้ promoter ชนิดเดียวกันนี้อาจทำให้เกิดกระบวนการ HDGS มีการแสดงออกของยีนที่ลดลงและส่งผลกระทบต่อระดับความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้เช่นกัน

เมื่อพิจารณาถึงผลของชิ้นส่วนทรานส์ยีนที่เพิ่มขึ้นในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมต่อลักษณะประจำพันธุ์ เปรียบเทียบกับมะเขือเทศรวมยีนที่พบยีนเพียงยีนเดียว และไม่พบชิ้นส่วนยีนเลย พบว่าจำนวนของทรานส์ยีนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อลักษณะประจำพันธุ์ ทั้งลักษณะการเจริญเติบโตแบบกิ่งเลื้อย, รูปร่างผลแบบรี, ผลสีชมพูอมแดงเข้ม และรูปร่างผล (Z) มีเพียงน้ำหนักผลเฉลี่ยเท่านั้นที่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรัตน (2554) ที่รวมลักษณะต้านทานต่อโรคพืชถึง 4 ยีนเข้าด้วยกันแล้วคัดเลือกลูกผสมที่ได้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย พบว่ามะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน ยังคงผลแบบรีและสีผลแดงชมพูใกล้เคียงกับพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ปกติ รายงานนี้แสดงให้เห็นว่าจำนวนของชิ้นส่วนยีนไม่มีผลต่อลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศ

อย่างไรก็ดีลักษณะประจำพันธุ์บางลักษณะมีความแตกต่างจากมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 ที่เป็นมะเขือเทศปกติ ได้แก่ สีผล, รูปร่างผล (Z) และน้ำหนักผลเฉลี่ย ทั้งนี้เนื่องจากมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมได้มาจากการผสมข้ามระหว่างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 ดังนั้น อาจมีบางลักษณะที่เกิดจากผลของการผสมข้ามกัน เช่น น้ำหนักเฉลี่ยผลของมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่พบว่ามีค่าอยู่ระหว่างน้ำหนักเฉลี่ยผลของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 ซึ่งตรงตามรายงานของกรุง และคณะ (2537) ที่ว่ามะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 มีน้ำหนักผลเฉลี่ยที่สูงกว่ามะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 รวมไปถึงรูปร่างผล (Z) ที่พบว่ามีค่าแตกต่างทางสถิติเช่นกัน โดยค่า Z ที่ได้จากการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 1.25-1.35 แตกต่างจากในรายงานที่พบว่า ค่า Z ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.51-1.53 แสดงให้เห็นถึงผลของมะเขือเทศที่ได้ จากการทดลองที่มีลักษณะรูปร่างแบบรีค่อนข้างไปทางกลมมากกว่า

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้สามารถรวมยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากเชื้อ CMV กับยีนนิวคลีโอแคปซิดโปรตีนที่ได้จากเชื้อ CaCV โดยวิธีการผสมข้ามของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 จากรุ่นพ่อ-แม่สู่มะเขือเทศรุ่นลูกได้ในอัตราการถ่ายทอดทั้งสองยีนที่ 36.06% โดยไม่พบความแตกต่างของอัตราการถ่ายทอดทั้งสองยีนเมื่อผสมสลับพ่อและแม่พันธุ์ และจากอัตราการถ่ายทอดยีนที่ได้เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบการกระจายตัวของยีนทั้งสองในรุ่นลูกเป็นไปตามค่าความถี่ของการถ่ายทอดยีนในรุ่นพ่อแม่

เมื่อนำมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง line CaCV L6-6 และ line CMV L13-x-47-22 มาใช้ทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างเรียวเล็กหรือโรคใบด่างแดงที่เกิดจากเชื้อ CMV และโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ CaCV พบว่ามะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมมีความต้านทานต่อเชื้อ CMV 77.77% จากการปลูกเชื้อ CMV เพียงอย่างเดียว มีความต้านทานต่อเชื้อ CaCV 33.33% ในปลูกเชื้อ CaCV เพียงอย่างเดียว และในการปลูกเชื้อ CaCV ร่วมกับเชื้อ CMV มีความต้านทานต่อเชื้อ CMV 70%, ต้านทานต่อเชื้อ CaCV 8.33% และคิดเป็นต้นที่ต้านทานทั้งต่อเชื้อ CMV และเชื้อ CaCV 0%

จำนวนชิ้นส่วนของทรานส์ยีนที่เพิ่มขึ้นในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลต่อลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศลูกผสม แต่ยังมีบางลักษณะแตกต่างจากมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และ 4 ที่เป็นมะเขือเทศปกติ

ข้อเสนอแนะ

การรวมยีนในครั้งนี ได้ทดสอบเพียงมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นที่ F₁ เท่านั้น การคัดเลือกแบบต้นเดี่ยวในรุ่นถัดไปพร้อมทั้งการกำจัดเกสรเพศผู้ทุกครั้งของการผสมจะช่วยป้องกันการปะปนกันระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์แท้กับมะเขือเทศที่ไม่ใช่สายพันธุ์แท้ และทำให้ได้มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่เข้าสู่สายพันธุ์แท้ในที่สุด

การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด ทำการทดสอบเพียงกลุ่มผสมเดี่ยว และใช้ตัวอย่างต้นมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมเพียง 12 ต้นต่อกลุ่มการทดลองเท่านั้น เพื่อทดสอบหาแนวโน้มมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถต้านทานต่อโรคได้จริง การตรวจสอบยีนและทดสอบความต้านทานเพื่อคัดเลือกมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้องการใช้ในรุ่นถัดไปจะต้องใช้จำนวนต้นมะเขือเทศในกลุ่มตัวอย่างปริมาณมาก เนื่องจากมะเขือเทศรวมยีนที่ได้จะเกิดการกระจายตัวของยีนมาก และจากการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในข้างต้น ยังไม่พบมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดเลย ต้นมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่มีขนาดของประชากรที่กว้างพอจะสามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรุง สีตะธานี. 2543. การปลูกมะเขือเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 1 ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตร
แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- กรุง สีตะธานี, ชีรพล ครุฑรังสิต, ชีรวัฒน์ กษิรวัฒน์, เฉลย ดวงตา และดำรง จิรสานต์ชัย. 2537.
การพัฒนาสายพันธุ์มะเขือเทศทนร้อน ผลเล็ก สีชมพู เพื่อรับประทานสด. ใน รายงานการ
ประชุมสรุปผลงานวิจัยผักและถั่ว ครั้งที่ 2. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- กฤษณา สัมพันธ์รักษ์. 2546. ปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐาน วิธีการ แนวคิด. ภาควิชาพืชไร่ คณะ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จานุลักษณ์ ขนบดี. 2541. การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก. โอ. เอส. พรินต์ติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.
- ทศพล เจริญอม. 2552. การสร้างความคงตัวทางพันธุกรรมในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรมที่
ต้านทานต่อเชื้อใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธีระ สุธะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วน
จำกัดฟีนีฟับบลิง, กรุงเทพฯ.
- พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ, อรประไพ คชนันท์, รัชนิ สงประยูร, วิมล สีเทา, อัญญา บุญชด, นุชนาด
วารินทร์, ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน และชาญณรงค์ ศรีภิบาล. 2549. ความหลากหลายของ
ทอสปอไวรัสที่พบในประเทศไทยและเปลือกไฟที่เป็นภาหะนำโรค. ใน การประชุมวิชาการ
เกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ภัทรพร สุภปัญญาพงศ์. 2549. การถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการจำลองตัว
ของไวรัสใบหงิกเหลืองเข้าสู่มะเขือเทศโดยใช้ *ipt-type* MAT vector. วิทยานิพนธ์ปริญญา
โท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2547. การปลูกมะเขือเทศ. แหล่งที่มา: <http://www.ku.ac.th/e-magazine/may47/agri/tomato.html>, 6 กุมภาพันธ์ 2551.

มณีรัตน์ คุณาพิทักษ์ธรรม. 2547. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบด่างแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนา ลาสุข. 2554. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ Soluble Solid Content และลักษณะต้านทานโรคพืชหลายชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิภาวี ลี้สุทธิพรชัย. 2550. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสใบด่างแดง ไอโซเลท KPS10. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรพงศ์ อธิรณกุล. 2547. การถ่ายยีนเรพลิเคสของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและไวรัสใบด่างแดงเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภลักษณ์ ฮอกระวัด. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สมภพ จูตะวสันต์. 2530. การผลิตมะเขือเทศเพื่อการค้า. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ส่วนวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ ธนาคารกสิกรไทย. 2531. ผักและผลิตภัณฑ์. เอกสารวิชาการ ปีที่ 9 ฉบับที่ 1.

สุพัฒน์ อรรถธรรม, พิศสุวรรณ เกียมสมบัติ, ทิพย์วดี อรรถธรรม, วิชัย โมลีรัตน์, ชีระ สุตะบุตร, เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และบุษนาถ แซ่อึ้ง. 2535. การสร้างมะเขือเทศให้ต้านทานต่อโรคโดยการถ่ายยีน, น. 193-200. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 30 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุพัฒน์ อรรถธรรม, อัญญา บุญชด, เจษฎาพร พิทักษ์สุธิพงษ์ และพิศสุวรรณ เกียมสมบัติ. 2548. การประเมินความเสียหายของผลผลิตมะเขือเทศที่ถูกเชื้อไวรัสใบด่างแดงเข้าทำลาย. ว.วิทย.ภษ. 36 (5-6) : 337-341.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2552. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สุรศักดิ์ จันทร์คำ. 2550. การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* สาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัญญา บุญชด. 2544. การถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของ *Cucumber mosaic virus* เข้าสู่มะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัญญรัตน์ ฤทธิพิทักษ์พงศ์. 2553. การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ของมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adkins, S., T. Zitter and T. Momol. 2005. **Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus *Tospovirus*)**. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, USA.

- Anderson, J.M., P. Palukaitis and M. Zaitlin. 1992. A defective replicase gene induces resistance to *Cucumber mosaic virus* in transgenic tobacco plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 89: 8759-8763.
- 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, 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.
- Balogun, O.S., L. Xu T. Teraoka and D. Hosokawa. 2002. Effect of single and double infections with *Potato virus X* and *Tobacco mosaic virus* on disease development, plant growth, and virus accumulation in tomato. **Fitopatol. Bras.** 27(3): 241-248.
- Balogun, O.S. 2008. Seedling age at inoculation and infection sequence affect disease and growth responses in tomato mixed infected with *Potato virus X* and *Tomato mosaic virus*. **Int. J. Agri. Biol.** 10: 145-150.
- Baulcombe, D.C., W.D.O. Hamilton, M.A. Mayo and B.D. Harrison. 1987. Resistance to viral disease through expression of viral genetic material from the plant genome. pp. 170-184. *In* D. Evered and S. Harnett, eds. **Plant Resistance to Viruses**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Beven, M.W., S.E. Mason and P. Goelet. 1985. Expression to *Tobacco mosaic virus* coat protein by a *Cauliflower mosaic virus* promoter in plant transformed by *Agrobacterium*. pp. 1921-1926. *In* M. Dickinson and J. Beynon, eds. **Molecular Plant Pathology**. Sheffield Academic Press Ltd, England.

- Brunt, A., K. Crabtree and A. Gibbs. 1990. **Viruses of Tropical Plants**. Redwood Press Ltd, Melksham, Wiltshire, UK.
- Brunt, A., K. Crabtree, M. Dellwitz, A. Gibbs and L. Watson. 1996. **Viruses of Plants**. Cambridge University, UK.
- Butaye, K.M.J., B.P.A. Cammue, S.L. Delaure and M.F.C. De Bolle. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. **Molecular Breeding** 16: 79-91.
- Chawla, H.S. 2002. **Introduction to Plant Biotechnology**. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
- Chen, K., Z. Xu, L. Yan and G. Wang. 2007. Characterization of a new strain of Capsicum chlorosis virus from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) in China. **Phytopathology** 155: 178-181.
- Chiemsombat, P. and S. Adkins. 2008. Tospoviruses. 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.
- Chiemsombat, P., O. Gajanandana, N. Warin, R. Hongprayoon, A. Bhunchoth and P. Pongsapich. 2008. Biological and molecular characterization of *tosspoviruses* in Thailand. **Arch. Virol.** 153: 571-577.
- 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.

- De Haan, P., T. Ultzen, M. Prins, J. Gielen, R. Goldbach and M. van Grinsven. 1996. Transgenic tomato hybrids resistance to *Tomato spotted wilt virus* infection. **Acta Horticulturae** 431 : 417-426.
- 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 Science+Business Media B.V.
- Fedorowicz, O., G. Bartoszewski, M. Kaminsaka, P. Stoeva and K. Niemirowicz-Szczytt. 2005. Pathogen-derived resistance to *Tomato spotted wilt virus* in transgenic tomato and tobacco plants. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 130(2): 218-224.
- 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.
- Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. **Microbiol. Mol. Biol.** 67: 16-37.
- García-Cano, E., R.O. Resende, R. Fernández-Muñoz and E. Moriones. 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. **Phytopath.** 96:1263-1269.
- Gonsalves, D., S.Z. Pang, C. Gonsalves, B. Xue, M. Yepes and F.J. Jan. 1996. Developing Transgenic crops that are resistance to *tospovirus*. **Acta Horticulturae** 431 : 427-431.
- Gonsalves, C., B. Xue, S.Z. Pang, R. Provvidenti, J.L. Slightom and D. Gonsalves. 1996. Breeding transgenic tomatoes for resistance to *Tomato spotted wilt virus* and *Cucumber mosaic virus*. **Acta Horticulturae** 431 : 442-448.

Green, S.K. and J.S. Kim. 1991. **Characteristic and control of viruses infecting pepper: A literature review.** AVRDC Tech. Bull. No. 18. 60 p.

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

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

Hellwald, K.H. and P. Palukaitis. 1995. Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus*. **Cell** 83: 937-946.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ***Cucumber mosaic virus***. Available Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.010.0.04.001.htm>, February 9, 2008.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2005. ***Tospovirus***. Available Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/11050000.htm>, February 9, 2008.

Jan, F.-J., C. Fagoaga, S.-Z. Pang and D. Gonsalves. 2000. A minimum length of N gene sequence in transgenic plants is required for RNA-mediated *tospovirus* resistance. **J. Gen. Virol.** 81: 235-242.

Jianxiang, C.Y. and W.X. Zhou. 2004. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. **J. Virol. Met.** 123: 155-161.

Jones, D.R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. **European Journal of Plant Pathology.** 113: 119-157.

- 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.
- Knierim, D., R. Blawid and E. Maiss. 2006. The complete nucleotide sequence of a Capsicum chlorosis virus isolate from *Lycopersicon esculentum* in Thailand. **Arch Virol.** 151: 1761-1782.
- Kooter, J.M., M.A. Matzke and P. Meyer. 1999. Listening to silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science** 4: 340-347.
- Mascia, T., F. Cillo, V. Fanelli, M.M. Finetti-Sialer, A. De Stradis, P. Palukaitis and D. Gallitelli. 2010. Characterization of the interactions between *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* in mixed infections in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23(11): 1514-1524.
- Matzke, M.A. and A.J.M. Matzke. 1995. How and why do plants inactivate homologous (*trans*) genes. **Plant Physiol.** 107: 679-685.
- Meyer, P. and H. Saedler. 1996. Homology-dependent gene silencing in plants. **Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 47: 23-48.
- Mohamed, E.F. 2010. Interaction between some viruses which attack tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant and their effect on growth and yield of tomato plants. **Journal of American Science** 6(8): 311-320.
- Morroni, M., J.R. Thompson and M. Tepfer. 2008. Twenty Years of Transgenic Plants Resistant to *Cucumber mosaic virus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 21: 675-684.

- Muskens M.W., A.P. Vissers, J.N. Mol and J.M. Kooter. 2000. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. **Plant Mol. Biol.** 43: 243-260.
- Nunome, T., F. Fukumoto, F. Terami, K. Hanada and M. Hirai. 2002. Development of breeding materials of transgenic tomato plant with truncated replicase gene of *Cucumber mosaic virus* for resistance to the virus. **Breeding Science** 52 : 219-223.
- Pang,S.-Z., F.-J. Jan and D. Gonsalves. 1997. Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated *tomspovirus* resistance in transgenic plants. **Plant Biology** 94: 8261-8266.
- Piamjit, P. 2000. **Inheritance of Tomato yellow leaf curl virus coat protein gene in transgenic tomato.** M.S. Thesis, Kasetsart University.
- Plant Viruses Online. 1996. **Descriptions and lists from the VIDE database : Cucumber mosaic cucumovirus.** Available Source: <http://image.fs.uidaho.edu/vidе/descr267.htm>, February 9, 2008.
- 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.
- Premachandra, W. T. S. D., C. Borgemeister, E. Maiss, D. Knierim and H. M. Poehling. 2005. *Ceratohripoides claratris*, a new vector of a Capsicum chlorosis virus isolate infecting tomato in Thailand. **Virology** 95: 659-663.
- Prins, M., P. de Haan, R. Luyten, M. van Veller, M.Q.J.M. van Grinsven and R. Goldbach. 1995. Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequences. **Molecular Plant-Microbe interactions** 8: 85-51.

- 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.
- Rodriguez G.R., S. Munos, C. Anderson, S.-C. Sim, A. Michel, M. Causse, B. B. McSpadden Gardener, D. Francis, and E. van der Knaap. 2011. Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the Tomato Germplasm and the Relationship to Fruit Shape Diversity. **Plant Physiol.** 156 : 275–285.
- Scorza, R., A.M. Callahan, L. Levy, V. Damsteegt and M. Ravelonandro. 1998. Transferring *potyvirus* coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce *Plum pox virus* resistant plums (*Prunus domestica* L.). **Acta Horticulturae** 472: 421-427.
- Seepiban, C. 2011. **Characterization of Tomato necrotic ringspot virus, a new species of tospovirus infecting tomato in Thailand.** Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- 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.
- Slater, A., N. Scott, and M. Fowler. 2003. **Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants.** Oxford University Press Inc., New York, USA.
- 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.

- Tricoll, D.M., K.J. Carney, P.F. Russell, J. R. McMaster, D.W. Groff, K.C. Hadden, P.T. Himmel, J.P. Hubbard, M.L. Boeshore and H.D. Quemada. 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to *Cucumber mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus2*, and *Zucchini yellow mosaic virus*. **Biotechnology** 13: 1458-1465.
- 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.
- Wang M.B. and P.M. Waterhouse. 2001. Application of gene silencing in plants. **Plant Biology**. 5: 146-150.
- Wintermantel, W.M. and M. Zaitlin. 2000. Transgene translatability increase effectiveness of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*. **J. Gen. Virol.** 81: 587-595.
- 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.
- Zhang, D. 2005. **Sequence Variability of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and its Effects on CMV-Resistance of *Capsicum* sp.** Doctor rerum naturalium, Universität Hamburg.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วันในมะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศหลังการปลูกเชื้อ			
ต้นที่	O.D. _{405nm}	ต้นที่	O.D. _{405nm}
1	0.375	16	0.417
2	1.124	17	0.411
3	2.380	18	0.417
4	1.015	19	0.408
5	1.812	20	0.401
6	2.000	21	0.304
7	2.123	22	0.394
8	1.866	23	0.393
9	2.217	24	0.394
10	1.975	25	0.430
11	0.387	26	0.432
12	0.402	27	3.009
13	0.418	28	0.410
14	0.406	29	0.419
15	0.398	30	0.339

ต้นที่ 1 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-11 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 12-31 มะเขือเทศตัดแปลงพันธุกรรม line CaCV L6 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ค่า O.D._{405nm} ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.185

ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ (positive control) เท่ากับ 1.674

ตารางผนวกที่ 2 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CaCV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm
 ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F₁ ภายหลังจากปลูกเชื้อ CaCV
 สายพันธุ์ KK เป็นเวลา 14 วัน ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศหลังการปลูกเชื้อ			
ต้นที่	OD _{405nm}	ต้นที่	OD _{405nm}
1	0.202	11	2.724
2	0.792	12	1.189
3	0.85	13	0.339
4	1.338	14	1.906
5	1.547	15	2.905
6	1.798	16	0.261
7	1.151	17	0.213
8	1.459	18	0.81
9	1.768	19	0.258
10	0.671	20	1.981

ต้นที่ 1 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-8 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 9-20 มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ค่า O.D._{405nm} ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.194

ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ (positive control) เท่ากับ 1.276

ตารางผนวกที่ 3 ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm
 ในมะเชื้อเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น F₁ ภายหลังจากปลูกเชื้อ CMV
 สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 21 วัน ด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเชื้อเทศหลังการปลูกเชื้อ			
ต้นที่	OD _{405nm}	ต้นที่	OD _{405nm}
1	0.24	11	0.318
2	0.326	12	0.346
3	0.53	13	0.319
4	0.568	14	0.254
5	0.53	15	0.296
6	0.376	16	0.236
7	0.331	17	0.242
8	0.737	18	0.21
9	0.273	19	0.269
10	0.263	20	0.22

ต้นที่ 1 มะเชื้อเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-8 มะเชื้อเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 9-20 มะเชื้อเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ค่า O.D._{405nm} ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.19

ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยของต้นมะเชื้อเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ (positive control) เท่ากับ 0.485

ตารางผนวกที่ 4 ผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CaCV และ CMV โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน และ 21 วัน ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA

ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศหลังการปลูกเชื้อ							
CaCV				CMV			
ต้นที่	O.D. _{405nm}	ต้นที่	O.D. _{405nm}	ต้นที่	O.D. _{405nm}	ต้นที่	O.D. _{405nm}
1	0.432	11	3.57	1	0.243	11	0.241
2	3.473	12	2.036	2	0.205	12	0.283
3	3.472	13	3.627	3	0.204	13	0.214
4	3.992	14	3.019	4	0.731	14	0.246
5	2.342	15	2.781	5	0.402	15	0.248
6	3.591	16	0.471	6	0.201	16	0.399
7	2.804	17	3.173	7	1.317	17	0.387
8	2.743	18	3.635	8	0.210	18	0.253
9	2.51	19	2.236	9	0.351	19	1.338
10	2.679	20	2.909	10	0.234	20	0.334

ต้นที่ 1 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 2-8 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นที่ 9-20 มะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ค่า O.D._{405nm} ของ CaCV ที่เป็น negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.202

ค่า O.D._{405nm} ของ CMV ที่เป็น negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.204

ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ CaCV (positive control) เท่ากับ 3.202

ค่า O.D._{405nm} เฉลี่ยของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ CMV (positive control) เท่ากับ 0.817

ภาพผนวกที่ 1 ตัวอย่าง parameter file ที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักผลเฉลี่ย (กรัม) และขนาดผล (shape index; Z) ในมะเขือเทศรวมยีนตัดแปลงพันธุกรรม

```
> d<-read.table('clipboard', header= T)
> d
  trt rep sam  SI  MW
1  A  1  1 1.213 20.900
2  A  1  2 1.224 18.725
3  A  1  3 1.385 18.023
4  A  1  4 1.119 16.938
:
656 E  6  6 1.161 19.588
657 E  6  7 1.250 19.204
658 E  6  8 1.429 19.108
659 E  6  9 1.429 18.600
660 E  6 10 1.382 17.420
> attach(d)
> names(d)
[1] "trt" "rep" "sam" "SI" "MW"
> trt<-factor(trt)
> rep<-factor(rep)
> sam<-factor(sam)
> md<-aov(SI~trt+rep:trt)
> anova(md)
Analysis of Variance Table

Response: SI
  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt   4 0.7823 0.195579 11.9894 2.229e-09 ***
trt:rep 57 4.6414 0.081429  4.9918 < 2.2e-16 ***
Residuals 598 9.7549 0.016313
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> load("E:\\Thailand before July 2012\\From pastpost\\R stat and R biometrix\\R_Course3\\Choo_Function\\multicomp.test.RData")
> multicomp.test(SI,trt,598,0.016313,alpha=0.01,type="LSD")

Test for SI

.....
Alpha          0.010000
Error Degrees of Freedom 598.000000
Error Mean Square    0.016313
fitted nis
A 1.253975 80
B 1.283113 80
C 1.327719 160
```

ภาพผนวกที่ 1 ตัวอย่าง parameter file ที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักผลเฉลี่ย (กรัม) และขนาดผล (shape index; Z) ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (ต่อ)

```

D 1.353989 280
E 1.330667 60
$`Means with the same letter are not significantly different.`
  means test
D 1.353989 a
E 1.330667 a
C 1.327719 a
B 1.283113 b
A 1.253975 b

$Critical.Differences
  [,1] [,2] [,3] [,4] [,5]
[1,] 0.05218458 0.05218458 0.04519317 0.04184074 0.05636578
[2,] 0.05218458 0.05218458 0.04519317 0.04184074 0.05636578
[3,] 0.04519317 0.04519317 0.03690007 0.03270841 0.04996293
[4,] 0.04184074 0.04184074 0.03270841 0.02789383 0.04695231
[5,] 0.05636578 0.05636578 0.04996293 0.04695231 0.06025756

$`Mean diff's`
  [,1] [,2] [,3] [,4] [,5]
[1,] 0.00000000 -0.023322619 -0.026270536 -0.07087679 -0.10001429
[2,] 0.02332262 0.000000000 -0.002947917 -0.04755417 -0.07669167
[3,] 0.02627054 0.002947917 0.000000000 -0.04460625 -0.07374375
[4,] 0.07087679 0.047554167 0.044606250 0.00000000 -0.02913750
[5,] 0.10001429 0.076691667 0.073743750 0.02913750 0.00000000

> md1<-aov(MW~trt+rep:trt)
> anova(md1)
Analysis of Variance Table

Response: MW
  Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt  4 1326.7 331.66 62.3624 < 2.2e-16 ***
trt:rep  57 2829.8 49.65 9.3348 < 2.2e-16 ***
Residuals 598 3180.4 5.32
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> multcomp.test(MW,trt,598,5.32,alpha=0.01,type='LSD')

Test for MW
.....
Alpha 0.01
Error Degrees of Freedom 598.00

```

ภาพผนวกที่ 1 ตัวอย่าง parameter file ที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักผลเฉลี่ย (กรัม) และขนาดผล (shape index; Z) ในมะเขือเทศรวมยีนดัดแปลงพันธุกรรม (ต่อ)

```

Error Mean Square      5.32
  fitted nis
A 16.22824 80
B 21.12653 80
C 17.53691 160
D 16.78039 280
E 17.48308 60
$'Means with the same letter are not significantly different.'
  means test
B 21.12653  a
C 17.53691  b
E 17.48308  b
D 16.78039  c
A 16.22824  c

$Critical.Differences
  [,1] [,2] [,3] [,4] [,5]
[1,] 0.9423908 0.9423908 0.8161344 0.7555936 1.0178984
[2,] 0.9423908 0.9423908 0.8161344 0.7555936 1.0178984
[3,] 0.8161344 0.8161344 0.6663710 0.5906747 0.9022705
[4,] 0.7555936 0.7555936 0.5906747 0.5037291 0.8479024
[5,] 1.0178984 1.0178984 0.9022705 0.8479024 1.0881792

$'Mean diffs'
  [,1] [,2] [,3] [,4] [,5]
[1,] 0.000000 -3.58961875 -3.64344167 -4.3461321 -4.8982875
[2,] 3.589619 0.00000000 -0.05382292 -0.7565134 -1.3086688
[3,] 3.643442 0.05382292 0.00000000 -0.7026905 -1.2548458
[4,] 4.346132 0.75651339 0.70269048 0.00000000 -0.5521554
[5,] 4.898288 1.30866875 1.25484583 0.5521554 0.0000000
>

```

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายปณิธิ ผลบังเกิด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 ตุลาคม 2527
สถานที่เกิด	พิษณุโลก
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2546 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพิจิตรพิทยาคม พ.ศ. 2550 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
ประวัติการทำงาน	-
ผลงานทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตศึกษา ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนัก พัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO- CHE) ทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก International Service for the Acquisition for Agri-biotech Applications (ISAAA)