

วิจารณ์

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวเฉาโดยใช้แผนที่ละเอียดระดับโมเลกุล

จากการตรวจสอบประชากรในรุ่น F_2 จำนวน 1,200 ต้นด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 และ TG332 เพื่อหาต้นที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้ง 2 นั้นพบว่าได้ต้นที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายดังกล่าวจำนวน 240 ต้น คิดเป็นระยะห่างทางพันธุกรรม 20 cM ซึ่งพบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 กับ TG332 ในการทดลองครั้งนี้มากกว่าที่ Dara-Carlos (1998) ได้รายงานไว้นั้นคือ 13.7 cM เนื่องจากประชากรที่ใช้ศึกษาใช้ประชากรคนละประชากรกันและจำนวนต้นที่ใช้ก็แตกต่างกันทำให้ระยะห่างทางพันธุกรรมมีความแตกต่างกันบ้าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ละเอียดที่ควบคุมทรงผลของมะเขือเทศ พบว่าประชากรที่แตกต่างกันมีผลทำให้ระยะห่างทางพันธุกรรมแตกต่างกัน 10 เท่า (Van *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Kaloshian *et al.* (1998) ยังพบว่าการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ต้านทานไส้เดือนฝอยกับพันธุ์อ่อนแอถ้าใช้พ่อแม่ที่มีความใกล้ชิดกันจะทำให้ระยะห่างทางพันธุกรรมน้อย แต่ถ้าใช้พ่อแม่ที่มีความแตกต่างกันมากจะเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมมากขึ้น ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้ง 2 ยังมีระยะห่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ดังนั้นถ้าใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งนี้ช่วยในการคัดเลือกอาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดได้ เพราะอาจจะเกิด double crossing over ได้สูงทำให้ไม่ได้ต้นที่มีความต้านทานอีกทั้งยังทำให้มีโอกาสที่มีลักษณะอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการติดมาด้วยสูง

1. การศึกษา graphical genotype

จากการนำดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้ง 5 ตำแหน่งไปตรวจสอบในต้นรีคอมบิแนนท์ที่เป็นไฮโมไซโกตทั้ง 70 ต้น และแสดงเป็นภาพของสัดส่วนโครโมโซม (graphical genotype) ที่ได้รับจากพ่อและแม่ในต้นรีคอมบิแนนท์แต่ละต้น ดังภาพที่ 2 ศึกษาสัดส่วนของความกว้างต่อความยาวของผล เพื่อแสดงถึงรูปร่างผลของมะเขือเทศกับต้นรีคอมบิแนนท์ โดยการวัดความกว้างความยาวผลในต้นมะเขือเทศที่มีผลสีแดงโดยวัดต้นละ 5 ผลแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย พบว่าได้ต้นที่มีสัดส่วนความกว้างต่อความยาวต่ำที่สุดคือ 0.75 และสูงที่สุดคือ 1.16 พบว่าสัดส่วนของพันธุ์สีดำทิพย์ 3 เท่ากับ 0.91 พันธุ์ L285 มีสัดส่วน 1.14 สายพันธุ์คู่แฝด QTL2 มีสัดส่วน 1.30 และสายพันธุ์คู่แฝด QTLTG48 มีสัดส่วน 0.70 ดังนั้นจึงใช้สัดส่วนความกว้างต่อความยาวที่น้อยกว่า 1 จัดเป็นลักษณะรูปร่างผลไข่ที่

เหมือนกับพันธุ์สิดาทิพย์ 3 และสัดส่วนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 1 จัดเป็นผลเป็นเพื่อนำข้อมูลของสัดส่วนความกว้างต่อความยาวที่ใช้บ่งบอกรูปร่างผลมาเปรียบเทียบกับ graphical genotype ที่ได้ (ภาพที่ 6) พบว่ายีนที่ควบคุมรูปร่างผลเป็นมีตำแหน่งอยู่ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSR26 และ TG373 เนื่องจากในต้นรีคอมบิแนนท์ที่มีจีโนไทป์ในส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมาย ทั้ง 2 เหมือนกับพันธุ์สิดาทิพย์ 3 นั้นให้ลักษณะรูปร่างผลเป็นแบบรูปไข่ ในขณะที่ต้นรีคอมบิแนนท์ที่มีจีโนไทป์ในบริเวณนี้ที่เหมือนพันธุ์ L285 ให้ลักษณะรูปร่างผลเป็นแบบผลเป็น พบว่ามีต้นรีคอมบิแนนท์ที่มีลักษณะรูปร่างผลเป็นแบบผลไข่ม้วนไม่สอดคล้องกับจีโนไทป์ตามที่แสดงได้แก่ต้น 42, 51, 52, 53, 55 และ 56 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSR26 กับ TG373 นี้ยังมีระยะห่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมากคือ 11.7 cM ทำให้มีโอกาสเกิด double recombination ส่วนต้นรีคอมบิแนนท์ที่ 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 58, 62, 64, 66, 71 และ 72 มี recombination break point ระหว่าง SSR26 และ TG373 และถ้ามีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างพ่อแม่วงตัวอยู่ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSR26 และ TG373 มากขึ้นจะทำให้แสดงจุดที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้ง 2 ได้ชัดเจนขึ้น ซึ่งอาจใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดเช่น SNP (single nucleotide polymorphism) ที่ได้จากการหาลำดับเบสของจีโนมมะเขือเทศ (www.sgn.cornell.edu)

การทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายกับลักษณะรูปร่างผลและความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาโดยวิธี single point analysis จากดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้ง 6 ตำแหน่ง คือ TG332, TG462, SSR598, SSR26, TG373 และ TG48 โดยการจับกลุ่มรีคอมบิแนนท์ที่จีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ที่แตกต่างกันเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีจีโนไทป์เหมือนพันธุ์สิดาทิพย์ 3 (ผลไข่) และกลุ่มที่มีจีโนไทป์เหมือนพันธุ์ L285 (ผลเป็น) แล้วนำค่าเฉลี่ยความกว้างต่อความยาวผลของต้นรีคอมบิแนนท์ 2 กลุ่มนั้นมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี t-test ส่วนค่าเฉลี่ยการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี wilcoxon rank-sum test หากพบว่า ต้นรีคอมบิแนนท์ทั้ง 2 กลุ่มนั้นมีรูปร่างผล ค่าเฉลี่ยการเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ต่างกันทางสถิติแสดงว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งนั้นมีการกระจายตัวร่วมกับลักษณะรูปร่างผล ค่าเฉลี่ยการเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต จากการศึกษาพบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG332, TG373 และ TG48 มีการกระจายตัวร่วมกับลักษณะรูปร่างผล หรือแสดงว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายดังกล่าวมีความสัมพันธ์ (link) อยู่กับลักษณะรูปร่างผล (ตารางที่ 4) ซึ่งได้มีการศึกษาถึงยีนที่ควบคุมลักษณะรูปร่างผลและพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลในมะเขือเทศอย่างน้อย 5 ตำแหน่ง ดังได้มีรายงานโดย Knapp *et al.* (2001) ว่าพบตำแหน่งยีน *sun* บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม 7 ที่วางตัวระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG576 และ GP12 มี

ระยะห่างทางพันธุกรรม 6 cM ซึ่งยีนนี้จะแสดงออกหลังจากพืชผสมพันธุ์คือ ช่วงการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาของผล นอกจากนี้ Tanksley *et al.* (2004) พบว่ามียีนบนโครโมโซม 8 (*fs8.1*) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSR244 และนอกจากนี้ Zygiere *et al.* (2005) ยังพบอีกว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับรูปร่างผลอยู่บนโครโมโซม 2 อยู่ 1 ตำแหน่งคือ *fs2.1* และบนโครโมโซม 4 อยู่ 2 ตำแหน่ง คือ *fs4.1* และ *fs4.2*

2. ระดับความต้านทานโรคของต้นรีคอมบิแนนท์

จากการตรวจสอบความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งกับค่าเฉลี่ยโรคและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ทดสอบด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS160 โดยการทำการ single point analysis ด้วยการวิเคราะห์ wilcoxon rank sum test พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG332, TG373 และ TG48 มีการกระจายตัวร่วมกับลักษณะความต้านทานโรคโดย TG332 มีการตอบสนองต่อความต้านทานในทางบวกส่วน TG373 และ TG48 ตอบสนองต่อความต้านทานโรคในทางลบในการปลูกเชื้อครั้งนี้ ดังตารางที่ 3 Dara-Carlos (1998) ศึกษาต้านทานโรคเหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรีย (*Ralstonia solanacearum*) จากมะเขือเทศพันธุ์ต้านทาน 'L285' โดยใช้ประชากร recombinant inbred line จำนวน 112 สายพันธุ์ที่ได้จากการผสม 'L285' กับ CLN286 BC₁F₂-25-7-9-14-1-1 และผ่านการสร้างประชากรโดยวิธีการ single seed descent มากกว่า 7 รุ่น นำประชากร RIL มาศึกษาจีโนมไทป์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 66 ตำแหน่ง และนำประชากรนี้มาศึกษาการเกิดโรคเหี่ยวโดยใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RS145 พบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 บนโครโมโซม 2 มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว สาเหตุที่ผลการทดลองไม่เหมือนกัน อาจเนื่องจากประชากรที่ใช้มีจำนวนน้อยกว่า และ เชื้อที่ใช้ในการทดสอบต่างสายพันธุ์กัน

เนื่องจากความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวเป็นลักษณะทางปริมาณ โดยมียีนหลายตำแหน่งควบคุมและสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของความต้านทานโรค (Villareal, 1980) อีกทั้งต้นรีคอมบิแนนท์ที่สร้างขึ้นโดยการคัดเลือกเฉพาะความต้านทานในตำแหน่งโครโมโซม 2 เท่านั้น จึงอาจจะมีอิทธิพลของยีนจากตำแหน่งอื่นส่งผลต่อการแสดงออกของระดับความต้านทาน ซึ่งพบว่าในพันธุ์ L285 ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่มีตำแหน่งต้านทานอีกอย่างน้อย 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งบนโครโมโซม 10 (Dara-Carlos, 1998) และ ตำแหน่งต้านทานบนโครโมโซม 6 ซึ่งต้นรีคอมบิแนนท์ที่คัดเลือกอาจมีผลจากยีนตำแหน่งต้านทานดังกล่าวมีอิทธิพลต่อความต้านทานในตำแหน่งของโครโมโซม 2 ในการทดลองครั้งนี้ได้ปลูกเชื้อในต้นรีคอมบิแนนท์โดยใช้ต้นมะเขือเทศสายพันธุ์คู่

แฝด 2 สายพันธุ์เป็นตัวควบคุมการทดลองในแต่ละครั้งด้วย คือ สายพันธุ์คู่แฝด QTL2 และสายพันธุ์คู่แฝด QTLTG48 ซึ่งพบว่าสายพันธุ์คู่แฝด 2 สายพันธุ์นี้ก็มีความอ่อนแอต่อเชื้อสายพันธุ์ RS160 เมื่อเทียบกับพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เช่นเดียวกันกับต้นรีคอมบิแนนท์ และจากการศึกษาของ ัญญา (2547) ได้ศึกษาโดยทำการสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนควบคุมความต้านทาน และทำการปลูกเชื้อโดยใช้เชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์คือ RS27, RS140, RS145 และ RS160 โดยทำการทดลองทั้งหมด จำนวน 6 ครั้ง พบว่าความต้านทานแต่ละตำแหน่งมีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ (strain specific) และการทดสอบโรคในช่วงเวลาที่ต่างกันส่งผลต่อความรุนแรงของการเกิดโรคที่ต่างกัน โดยพบว่า การทดสอบโรคในช่วงฤดูร้อนทำให้มะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวอย่างรวดเร็ว จึงมีผลทำให้การตรวจพบการตอบสนองในเชิงบวกได้ไม่เหมือนกัน ซึ่งในการปลูกเชื้อในต้นรีคอมบิแนนท์ครั้งนี้ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการตัดใบโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ RS160 เพียงสายพันธุ์เดียวและทำการปลูกเชื้อเพียงฤดูเดียวคือ ทดสอบในเดือนพฤศจิกายน 2547 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2548 จึงควรมีการทดสอบโรคในฤดูอื่น ๆ เช่น ในฤดูฝน และอาจจะใช้เชื้อสาเหตุสายพันธุ์อื่น เช่น RS27, RS140 และ RS145

สำหรับแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ที่ควรดำเนินการต่อไปคือคัดเลือกต้นที่มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบเพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุสายพันธุ์นั้น โดยนำต้นรีคอมบิแนนท์ที่เป็นโฮโมไซโกตผสมกลับไปพันธุ์สีดาทิพย์ 3 จนมีลักษณะเหมือนสีดาทิพย์ 3 แต่มียืนควบคุมลักษณะต้านทานต่อเชื้อและสามารถพัฒนาให้เป็นพันธุ์การค้าที่มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุสายพันธุ์นั้น ๆ ได้

การทดลองที่ 2 การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวเป็น 1, 2 และ 3 ยีน

1. การทดสอบโรคด้วยวิธีการที่ต่างกัน

วิธีการปลูกเชื้อที่ต่างกัน คือการปลูกเชื้อแบบตัดใบโดยการตัดใบจริงเหนือใบเลี้ยงจำนวน 2 ใบทำการทดสอบโรคจำนวน 2 ครั้งที่แตกต่างกัน และการปลูกเชื้อแบบราดดิน ต้น ๆ ละ 30 มิลลิตร โดยทำการปลูกเชื้อ 2 ถาด โดยใช้เชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าการปลูกเชื้อแต่ละครั้งส่งผลต่อความรุนแรงในการเกิดโรคต่างกัน โดยพบว่าในเชื้อสาเหตุบางสายพันธุ์และมะเขือเทศบางพันธุ์ จะมีการตอบสนองต่อเชื้อที่แตกต่างกันเช่น ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 การปลูกเชื้อทั้ง 4 ครั้งให้ความแตกต่างกันในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่ในพันธุ์ L285 มีความแตกต่างกันเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ RS160 ส่วนมะเขือเทศพันธุ์ H7996 มีการตอบสนองแตกต่างกันเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ RS145 นอกจากนี้สภาพแวดล้อมยังมีผลต่อการทดสอบโรค (environment-specific) และวิธีการทดสอบโรคที่ต่างกันก็มีผลต่อความรุนแรงในการเกิดโรคที่ต่างกันและยังมีผลของความจำเพาะเจาะจงของสายพันธุ์ของเชื้อต่อตำแหน่งต้านทานแต่ละตำแหน่ง (race-specific) อีกด้วย เช่นในมะเขือเทศพันธุ์ L285 พบว่ามีการตอบสนองที่ให้ความแตกต่างกันเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ RS160 เท่านั้น ซึ่งต่างจากมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ซึ่งมีการตอบสนองที่แตกต่างกันในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาวิธีการปลูกเชื้อที่ต่างกัน โดยการปลูกเชื้อแบบตัดใบ 2 ครั้ง และการราดดิน 2 ครั้ง พบว่าการปลูกเชื้อโดยวิธีการตัดใบในมะเขือเทศสายพันธุ์สีดาทิพย์ 3 มีการตอบสนองที่แตกต่างเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ RS27 และ RS140 ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์ L285 และ H7996 มีการตอบสนองไม่แตกต่างกันในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ และในการปลูกเชื้อแบบราดดินให้ผลในทางที่กลับกันคือ ในพันธุ์สีดาทิพย์ 3 มีการตอบสนองไม่แตกต่างกันในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่ในพันธุ์ L285 ให้ความแตกต่างเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ RS160 และในมะเขือเทศพันธุ์ H7996 ให้ความแตกต่างเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ RS145

วิธีการปลูกเชื้อที่ต่างกัน และตำแหน่งต้านทานที่ต่างกันมีผลต่อการเกิดโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศที่ต่างกัน จากการศึกษาของ Danesh *et al.* (1994) พบว่าการปลูกเชื้อด้วยวิธีการตัดใบ และการปลูกเชื้อโดยวิธีฉีดรากมะเขือเทศและทำการราดเชื้อ สามารถตรวจพบความรุนแรงของเชื้อ และตำแหน่งความต้านทานที่ต่างกัน นอกจากนี้สภาพใด ๆ ก็ตามที่ส่งเสริมให้เกิดบาดแผลขึ้นกับพืช จะช่วยส่งเสริมความรุนแรงในการเกิดโรคด้วย ซึ่งรวมทั้งแมลงต่าง ๆ ที่กัดกินรากหรือ

ไส้เดือนฝอยชนิดต่าง ๆ ที่เข้าทำลายพืชด้วย (ประสาทร, 2537) และ Danesh *et al.* (1994) ยังพบว่าวิธีปลูกเชื้อโดยวิธีการตัดใบสามารถตรวจพบตำแหน่งด้านทานบนโครโมโซม 6 และโครโมโซม 10 นอกจากนี้วิธีการปลูกเชื้อแบบวิธีการราดดินสามารถตรวจพบตำแหน่งด้านทานบนโครโมโซม 7 เพิ่มขึ้นอีกตำแหน่งซึ่งตำแหน่งด้านทานบนโครโมโซม 7 มาจากอัลลีลของพันธุ์อ่อนแอ และยังพบว่าการปลูกเชื้อแบบราดดิน พบการแสดงออกที่มีความชัดเจนบนโครโมโซม 6 มากกว่าการปลูกเชื้อแบบตัดใบ จากการศึกษาของ Lui *et al.* (2001) ได้ทำการ mutant ยีนใน *R. solanacearum* ที่เรียกว่า *pilQ* และ *pilT* ซึ่งยีนนี้เป็นยีนที่เกี่ยวกับการสร้าง pili ซึ่ง pili เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อเทียบกับ wild-type พบว่าในสายพันธุ์ mutant มีการเคลื่อนที่ได้ลดลง และนอกจากนี้ในการศึกษาของ Tans-Kersen *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาใน *R. solanacearum* โดยทำการ mutant ยีน *filC* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างแฟลกเจลลาซึ่งแฟลกเจลลาเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ซึ่งการ mutant ของยีน *filC* จะมีผลทำให้แบคทีเรียขาดโปรตีน 30-kDa ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง flagellin หลังจากนั้นนำเชื้อ mutant ไปปลูกเชื้อโดยวิธีราดดินพบว่า เชื้อมีความสามารถในการทำลายพืชลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อที่เป็น wild type แต่ถ้าเรานำเชื้อที่ mutant ไปปลูกเชื้อโดยวิธีการตัดใบจะไม่มี ความแตกต่างในการทำลายพืชเมื่อเทียบกับ wild-type นั่นก็สามารถสรุปได้ว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อมีผลต่อการเกิดโรคของมะเขือเทศในวิธีการปลูกเชื้อแบบราดดินเพราะเชื้อสามารถเคลื่อนที่เข้าหารากได้ โดยมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อในระยะเริ่มต้นของการเข้าทำลายเพราะเชื้อสามารถเคลื่อนที่จากดินเข้าหารากพืชได้ต่างกัน แต่จะไม่มี ความแตกต่างกันถ้าทำการปลูกเชื้อแบบตัดใบ นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองของ Vudhivanich (1995) ได้ทำการปลูกเชื้อ 4 วิธีคือ การตัดใบ ปลูกเชื้อเข้าลำต้นโดยตรง วิธีการฉีด และวิธีการปลูกเชื้อโดยวิธีการราดดิน โดยใช้เชื้อสายพันธุ์ที่เก็บมาจาก จังหวัดนครปฐม ทำการทดลองในมะเขือเทศ 9 สายพันธุ์ พบว่ามะเขือเทศไม่มีความแตกต่างกันในการตอบสนองในการปลูกเชื้อทั้ง 4 วิธี และอีกการทดลองคือใช้เชื้อจากจังหวัดหนองคาย พบว่าการตอบสนองต่อโรคของมะเขือเทศมีความแตกต่างกันระหว่างวิธีการปลูกเชื้อแบบตัดใบและแบบราดดิน นั้นแสดงว่าเชื้อต่างสายพันธุ์กัน และวิธีการปลูกเชื้อที่ต่างกัน มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อที่ต่างกัน นอกจากนี้ Trigalet (1989) พบว่า การที่เชื้อ *R. solanacearum* สามารถใช้เมือกหรือ EPS เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตในสภาพที่ขาดแคลนอาหาร และยังช่วยปกป้องเชื้อจากการสัมผัสโดยตรงกับผนังเซลล์พืชหลีกเลี่ยงการถูกยึดจับของเซลล์พืช ทำให้เชื้อสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและแพร่กระจายไปยังส่วนต่อน้ำได้ นอกจากนี้ Hasain and Kelman (1958) ได้กล่าวว่าการผลิต EPS ในสายพันธุ์ที่รุนแรงเป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดการเหี่ยวโดยพบว่าแรงดันในท่อลำเลียงของพืชจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากสารในท่อลำเลียงมีความหนืดสูงขึ้น และรบกวนการเคลื่อนที่ของน้ำในระบบท่อลำเลียง ในขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงจะไม่ผลิต EPS

หรือเมือก และจะมีการเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อพืชน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เชื้อไม่สามารถสร้าง EPS ได้ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว เฉพาะเชื้อสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรครุนแรงเท่านั้นจะผลิต extracellular polysaccharide ที่ทนความร้อน และสารนี้ก็จะพบในพืชที่เกิดโรคในส่วนท่อน้ำของพืช และจากการศึกษาของ Robert *et al.* (1988) ได้โคลนยีน *egl* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตเอนไซม์ β -1,4-endoglucanase ซึ่งพบเอนไซม์นี้ในระดับสูงในเชื้อสายพันธุ์กลายที่เกิดโรครุนแรง แต่พบน้อยในพวกที่ไม่รุนแรง ซึ่งสายพันธุ์เชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงยีนส่วนนี้ทำให้เกิดความรุนแรงน้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติในมะเขือเทศ และเมื่อทำให้ยีนนี้สามารถทำงานได้อีก โดยวิธี complementation test พบว่าเอนไซม์ endoglucanase อาจเกี่ยวข้องกับการย่อยผนังเซลล์พืชซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าไปในพืชได้ง่ายขึ้น และใช้ส่วนของพืชที่ถูกย่อยเป็นอาหาร อย่างไรก็ตามเชื้อพันธุ์กลายในยีนส่วนของ *egl* ก็สามารถทำให้มะเขือเทศตายได้ แต่ต้องใช้เวลาานาน แสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่จำเป็นในการทำให้เกิดโรค แต่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการเกิดโรค ซึ่งในการเกิดโรคอาจมียีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องและได้มีการศึกษายีน *phcA* พบว่ามีผลต่อการลดปริมาณของ EPS I (Brumbley and Denney, 1990) โดยโปรตีน *PhcA* เป็นตัวควบคุมการทำงานของ *eps* (Brumbley *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมียีน *vsrC* และ *vsrD* ซึ่งให้โปรตีน *VrsC* และ *VrsD* ตามลำดับ โดยการทำงานของยีนทั้งสองจะต้องการกระตุ้นของโปรตีน *XpsR* ได้ยีน *xpsR* เพื่อจะไปกระตุ้นการทำงานของ *eps* ยีนอีกชั้นหนึ่ง แสดงให้เห็นว่ายีน *eps* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง EPS I มีการควบคุมการแสดงออกที่ซับซ้อน และนอกจากนี้ Huang *et al.* (1995) พบว่าการทำงานของยีนต้องการสัญญาณในการกระตุ้น ได้แก่ ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียในต้นพืช โดย Denney *et al.* (1997) พบว่าเมื่อมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียในพืช 10^8 cfu/ml จะมีการผลิต EPS I และเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์พืช ที่เกี่ยวข้องกับการที่แบคทีเรียเข้าทำลายและอยู่อาศัยในพืช แต่ถ้าเซลล์แบคทีเรียในต้นพืชมีปริมาณต่ำกว่า 10^7 cfu/ml จะพบว่าปริมาณ EPS I และเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ลดลง

นอกจากนี้การปลูกเชื้อแบบตัดใบให้ผลที่ไม่เหมือนกับการปลูกเชื้อแบบราดดิน คาดว่าอาจเนื่องมาจาก ความต้านทานที่เกิดขึ้นเพื่อตอบโต้การเข้าทำลายของเชื้อโรค (inducible resistance) เช่นพืชเกิดปฏิกิริยา hypersensitivity การสร้างสารพิษ (phytoalexin) ซึ่งจะไม่พบในพืชปกติ แต่สารนี้จะสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ของพืชถูกกระตุ้น และจากการทดลองปลูกเชื้อไม่รุนแรงหรือไม่ใช่สาเหตุ พบว่า พืชที่ได้รับการปลูกเชื้อจะแสดงคุณสมบัติต้านทานต่อเชื้อที่รุนแรงได้ เป็นต้นเพราะวิธีการปลูกเชื้อแบบตัดใบเป็นการสร้างบาดแผลให้พืชและพืชจะส่งสัญญาณหรือสามารถสร้างสารพวก pathogenecity related (PR) proteins เพื่อกระตุ้นให้พืชสร้างสารมายับยั้งการเข้าทำลายหรือการเพิ่มปริมาณของเชื้อ

เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่ออินด้านทานแต่ละตำแหน่งที่ต่างกัน ในวิธีการปลูกเชื้อแบบตัดใบพบว่ามะเขือเทศมีการตอบสนองที่ต่างกัน ในเชื้อ 2 สายพันธุ์คือ RS27 และ RS140 ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 แต่ในพันธุ์ L285 และ H7996 มีการตอบสนองที่ไม่แตกต่างกันในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ส่วนในวิธีการปลูกเชื้อแบบราดดินโดยพบว่าในมะเขือเทศพันธุ์ L285 ให้ผลแตกต่างกันในเชื้อสายพันธุ์ RS160 และในพันธุ์ H7996 มีการตอบสนองที่แตกต่างกันในเชื้อสายพันธุ์ RS145 ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 การตอบสนองของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน นั่นแสดงว่าวิธีการปลูกเชื้อและสายพันธุ์ของเชื้อที่ต่างกันมีผลต่อความรุนแรงในการเกิดโรคในมะเขือเทศ

2. การทดสอบโรคในช่วงเวลาต่างกัน

การปลูกเชื้อในช่วงเวลาที่ต่างกัน สภาพแวดล้อมซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ อากาศ และความชื้นในดิน และความเข้มของแสง ในการปลูกเชื้อแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน ซึ่งส่งผลต่อความรุนแรงของโรคได้ โดยพบว่า การทดสอบโรคแบบตัดใบมีผลต่อการตอบสนองของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ในเชื้อ 2 สายพันธุ์เท่านั้นคือ RS27 และ RS140 แต่ในการปลูกเชื้อแบบราดดินในพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในมะเขือเทศพันธุ์ L285 และ H7996 การปลูกเชื้อแบบตัดไม่มีความแตกต่างกันในเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์และพบว่าในการปลูกเชื้อแบบราดดินมีการตอบสนองที่ความแตกต่างกันในเชื้อสายพันธุ์ RS160 นอกจากนี้ในมะเขือเทศพันธุ์ L285 และเชื้อสายพันธุ์ RS145 ในมะเขือเทศพันธุ์ H7996 มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน

สภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ เนื่องจากเชื้อก่อความเสียหายให้กับพืชต้องมีปัจจัยที่ต่างกัน ดังนี้ พืชที่อ่อนแอ (susceptible host) เชื้อโรคที่รุนแรง (aggressive pathogen) และ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (favorable environment) มามีความสัมพันธ์กัน สำหรับเชื้อ *R. solanacearum* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้พืชสามารถพัฒนาไปได้อย่างรวดเร็ว เชื้อเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิช่วง 15-38 องศาเซลเซียส แต่ที่ดีที่สุดระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส และจะตายเมื่อโดนความร้อนที่ 49-51 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เชื้อต้องการสภาพที่มีความชื้นสูงในการเข้าทำลายพืช แต่ถ้าเชื้อมีปริมาณมากแม้ในดินจะมีความชื้นเพียงเล็กน้อยก็อาจจะทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงได้ โดยเฉพาะเมื่อเข้าทำลายพืชที่อยู่ในระยะต้นกล้า (ศักดิ์, 2537) และยังพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการพัฒนาของมะเขือเทศ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ในตอนกลางวัน และ 16-20 องศาเซลเซียสในตอนกลางคืน ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและติดดอกผล ซึ่งอุณหภูมิที่

แตกต่างกันมากใน 1 วันจะช่วยให้การติดดอก ผล การเจริญเติบโตและคุณภาพผลดีขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการติดผลอยู่ในช่วง 18-25 องศาเซลเซียส และจะติดผลได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียสและต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส (Rabatzky and Yamaguchi, 1997) นั้นแสดงว่าถ้าอุณหภูมิสูงจะเจริญพัฒนาได้ดีแต่ต้นมะเขือเทศจะเจริญเติบโตได้ไม่ค่อยดีทำให้เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น และความชื้นก็มีผลต่อการพัฒนาของเชื้อถ้ามีความชื้นสัมพัทธ์มากเชื้อก็จะเจริญเติบโตได้ดี และ Prior *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิมีผลต่อการปลูกเชื้อโดยทำการปลูกเชื้อในมะเขือเทศ 13 สายพันธุ์ทำการทดลองในสภาพอากาศเย็นระหว่างเดือน มีนาคม-เมษายน ซึ่งมีอุณหภูมิ 20-28 องศาเซลเซียส และทำการทดลองในเดือน มิถุนายน-สิงหาคม อุณหภูมิ 23-29 พบว่าอุณหภูมิในเวลากลางวันต่างกัน 2 องศาเซลเซียส และในกลางคืนอุณหภูมิต่างกัน 3 องศาเซลเซียส มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อในมะเขือเทศโดยมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยอุณหภูมิที่สูงกว่าในเดือนมิถุนายน-สิงหาคม ปริมาณเชื้อที่พบในต้นพืชจะมีมากกว่าเดือน มีนาคม-เมษายน

3. การทดสอบโรคด้วยเชื้อ *R. solanacearum* ที่ต่างสายพันธุ์

ในการทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อที่มีความแตกต่างกันจำนวน 4 สายพันธุ์โดยจะพบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถทำให้พืชเกิดโรคได้ ซึ่งยังพบว่าเชื้อแต่ละเชื้อมีความรุนแรงไม่เท่ากันจากการปลูกเชื้อทั้ง 4 ครั้งตรวจพบการตอบสนองที่แตกต่างกันในเชื้อ 4 สายพันธุ์ถึง 3 ครั้ง เป็นการปลูกเชื้อโดยวิธีการตัดใบ 2 ครั้ง และเป็นการปลูกเชื้อแบบราดดิน 1 ครั้ง ซึ่งพบว่าการปลูกเชื้อแบบราดดินครั้งที่ 2 พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันในการก่อให้เกิดโรคในพันธุ์สีดาทิพย์ 3 L285 และ H7996 แต่ถ้าดูจากเปอร์เซ็นต์ความต้านทานโรคเมื่อเทียบกับพันธุ์สีดาทิพย์ 3 จะพบว่าในเชื้อ RS27, RS140 และ RS160 มีเปอร์เซ็นต์ความต้านทานโรคที่มากกว่าพันธุ์สีดาทิพย์ 3

เชื้อต่างสายพันธุ์กัน มีผลทำให้มะเขือเทศพันธุ์เดียวกันมีความรุนแรงในการเกิดโรคต่างกัน โดยมีสาเหตุจากพันธุกรรมส่วนหนึ่งและมีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมส่วนหนึ่งอิทธิพลทางด้านพันธุกรรม เช่น ความสามารถในการเคลื่อน และความสามารถในการสร้าง EPS ที่ต่างกัน เป็นต้น ส่วนอิทธิพลทางด้านสิ่งแวดล้อมได้กำจัดออกไปในเรื่องของวัสดุที่ใช้ในการปลูก และน้ำที่ใช้ในการรด พืชที่มีอายุเท่ากัน แต่ไม่สามารถจำกัดอิทธิพลให้เรื่องของอุณหภูมิ ความชื้น และแสงได้

4. ระดับความต้านทานโรคของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่สร้างขึ้น

การสร้างสายพันธุ์คู่แฝดโดยใช้การถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉาจากมะเขือเทศพันธุ์ต้านทาน 2 พันธุ์ คือ L285 และ H7996 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีรายงานว่ามีความต้านทานโรคสูงทั้ง 2 สายพันธุ์เข้าไปในพันธุ์รับคือพันธุ์สิดาทิพย์ 3 โดยแบ่งเป็นยีนตำแหน่งต่าง ๆ เรียกว่าสายพันธุ์คู่แฝดและทำการศึกษาผลของยีน 1 ตำแหน่งจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ QTL2, QTL6.1 และ QTL10 ซึ่งเป็นตำแหน่งต้านทานจากมะเขือเทศพันธุ์ L285 และ QTL6.2 เป็นตำแหน่งต้านทานจากมะเขือเทศพันธุ์ H7996 จากนั้นทำการรวมยีนแต่ละตำแหน่งเข้าด้วยกันเป็น 2 และ 3 ตำแหน่งโดยรวมยีน 2 ตำแหน่งได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ดังนี้ QTL6.2/10, QTL2/10, QTL2/6.2 และ QTL2/6.1 และรวมยีน 3 ตำแหน่งเข้าด้วยกันอีก 1 สายพันธุ์คือ QTL2/6.2/10

จากการปลูกเชื้อทั้ง 4 ครั้งพบว่าสายพันธุ์คู่แฝดที่สร้างขึ้นมีความต้านทานต่อเชื้อได้ค่อนข้างดี โดยยีนตำแหน่ง QTLTG48 มีการตอบสนองในเชิงบวกต่อเชื้อสายพันธุ์ RS160 ถึง 2 ครั้ง โดยเป็นการปลูกเชื้อแบบตัดใบทั้ง 2 ครั้ง และไม่มีการตอบสนองในเชิงบวกในเชื้อสายพันธุ์ RS140 ทั้งการปลูกเชื้อแบบตัดใบและการปลูกเชื้อแบบราดดิน และพบว่ายีนตำแหน่ง QTL2 ตอบสนองต่อเชื้อสายพันธุ์ RS27 ได้ค่อนข้างดี โดยตรวจพบการตอบสนองได้ถึง 3 ครั้ง จากการปลูกเชื้อทั้งหมด 4 ครั้ง แต่จะอ่อนแอต่อเชื้อสายพันธุ์ RS145 และนอกจากนี้ยังพบว่ายีนตำแหน่ง QTL6.1, QTL10, QTLTG285/CT234, QTL6.2/10, QTL2/10 และ QTL2/6.1 ไม่พบการตอบในเชิงบวกต่อเชื้อสายพันธุ์ RS145 เนื่องจากเป็นเชื้อที่ค่อนข้างแรงและในเชื้อทั้งหมด 4 สายพันธุ์พบว่าเชื้อ RS145 ตรวจพบการตอบสนองได้น้อยที่สุดเนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความรุนแรง แต่จากการสังเกตพบว่าในพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ แต่พบว่ามีความต้านทานต่อเชื้อ RS145 เมื่อเทียบกับมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานคือพันธุ์ L285 และพันธุ์ H7996 อาจเนื่องมาจากในมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 อาจจะมีตำแหน่งต้านทานต่อเชื้อสายพันธุ์นี้โดยจะมีลักษณะความต้านทานเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ RS145 (race-specific) นอกจากนี้ยังพบว่ายีนตำแหน่ง QTL6.2 มีการตอบสนองแบบต่อเชื้อสายพันธุ์ RS145 นี้ค่อนข้างดี เมื่อเทียบกับยีนตำแหน่งอื่น ๆ โดยพบว่า QTL6.2, QTL2/6.2 และ QTL2/6.2/10 มีการตอบสนองในเชิงบวก โดยตำแหน่ง QTL6.2 มาจากพันธุ์ให้คือ พันธุ์ H7996 ซึ่งพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ การตอบสนองแต่ละครั้งสภาพแวดล้อมและวิธีการปลูกเชื้อมีผลต่อการตอบสนองของตำแหน่งต้านทานและต่อการเข้าทำลายเชื้อ และจะพบว่าในเชื้อสายพันธุ์ RS27 ยีนหลายตำแหน่งมีการตอบสนองต่อเชื้อสายพันธุ์นี้ ในวิธีการปลูกเชื้อแบบราดดิน โดยพบว่าในยีนตำแหน่ง QTL2, QTL6.1, QTL10, QTL6.2/10 และ QTL2/10 มีการตอบสนอง 2 ครั้งเป็นการปลูกเชื้อแบบราดดินทั้ง 2 ครั้ง ซึ่งเชื่อนี้เป็นเชื้อที่ค่อนข้าง

อ่อนแอ แต่ถ้าพิจารณาเชื้อสายพันธุ์ RS160 พบว่ายีนตำแหน่ง QTLTG48, QTL6.1, QTLTG285/CT234, QTL2/10 และ QTL2/6.2 ตอบสนองในเชิงบวกในเชื้อสายพันธุ์ RS160 ในวิธีการปลูกเชื้อแบบตัดใบทั้ง 2 ครั้งซึ่งแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ RS27 ที่มีการตอบสนองในเชิงบวกได้ดีในการปลูกเชื้อแบบราดดิน ในทำนองเดียวกันคือ QTL6.1, QTLTG285/CT234 และ QTL6.2 มีการตอบสนองเฉพาะในการปลูกเชื้อแบบตัดใบและในเชื้อสายพันธุ์ RS160 มีการตอบสนองในเชิงบวกเฉพาะการปลูกเชื้อแบบตัดใบโดยพบใน QTLTG48, QTL6.1 และ QTL2/6.2 ซึ่งก็เป็นการยืนยันว่าวิธีการปลูกเชื้อ และสายพันธุ์เชื้อมีผลต่อการแสดงออกตำแหน่งด้านทาน

5. การเกิดปฏิกริยาของยีนแต่ละตำแหน่ง

จากการสร้างมะเชื้อเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนด้านทานเป็น 1 ตำแหน่งจำนวน 4 สายพันธุ์ และเพิ่มยีนด้านทาน เป็น 2 และ 3 ตำแหน่งตามลำดับ พบว่ายีนควบคุมความต้านทานโรคแต่ละตำแหน่งมีการตอบสนองในเชิงบวกต่อเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ต่างกัน รวมทั้งสภาพแวดล้อมมีผลต่อการตรวจพบการตอบสนองในเชิงบวกได้ต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการทำงานของยีนควบคุมความต้านทานแต่ละตำแหน่งมีความสัมพันธ์แบบเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุแต่ละสายพันธุ์ และแต่ละสภาพแวดล้อม ถึงแม้ว่าลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในมะเชื้อเทศจะเป็นลักษณะปริมาณ ซึ่งเป็นลักษณะที่ทำให้มีความต้านทานแบบไม่จำเพาะ (horizontal resistance) โดยพืชที่มีความต้านทานในลักษณะนี้มักแสดงความต้านทานต่อเชื้อได้หลายสายพันธุ์ก็ตาม แต่ก็พบว่ามีการตรวจพบความต้านทานที่เฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของเชื้อได้ในบางตำแหน่งของความต้านทานที่เป็นลักษณะปริมาณได้ (Young, 1996; Conebido *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000) ดังนั้นการรวมยีนทั้ง 4 ตำแหน่งเข้าด้วยกันเป็น 2 ตำแหน่งดังต่อไปนี้คือ QTL6.2/10, QTL2/10, QTL2/6.2 และ QTL2/6.1 และ 3 ตำแหน่งคือ QTL2/6.2/10 เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อได้หลากหลายสายพันธุ์ และหลากหลายสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดความต้านทานแบบคงทนและยาวนาน

จากการรวมยีนแต่ละตำแหน่งและทำการปลูกเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่ายีนบางตำแหน่งที่รวมตำแหน่งด้านทานเข้าด้วยกันน่าจะทำให้พืชมีความต้านทานมากกว่าตำแหน่งเดียวแต่กลับพบว่าในบางตำแหน่งทำให้มะเชื้อเทศมีความต้านทานน้อยกว่ายีนตำแหน่งเดียว ดังเช่นการปลูกเชื้อสายพันธุ์ RS27 ในสายพันธุ์คู่แฝด QTL6.2/2 เมื่อเพิ่มยีนตำแหน่งบนโครโมโซม 2 เข้ามา และในสายพันธุ์ QTL6.2/10 เพิ่มยีนตำแหน่งโครโมโซม 10 เข้ามา ทำให้มะเชื้อเทศสายพันธุ์คู่แฝดมีความต้านทานน้อยลงกว่าเดิม อาจเนื่องมาจากเกิดปฏิกริยาระหว่าง QTL2 และ QTL6.2 ซึ่งทำให้มะเชื้อ

ทดสอบที่ได้มีความต้านทานน้อยลงกว่ายีนตำแหน่งเดียว และการปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ RS160 พบว่า QTLTG48 เพิ่มยีนบนโครโมโซม 2 โดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG332 ช่วยในการคัดเลือก เข้ามาและ QTL2/6.1 เพิ่มยีนตำแหน่ง 6.1 เข้ามา QTL10/2/6.2 เพิ่มยีนตำแหน่ง 2 และ 6.2 เข้ามา และนอกจากนี้ QTL6.1/2 เพิ่มยีนตำแหน่ง 2 เข้ามาแล้วทำให้ความต้านทานโรคน้อยลง และการปลูกเชื้อสายพันธุ์ RS27 พบว่ายีนตำแหน่ง QTL2 และ QTL6.1 เมื่อรวม 2 ตำแหน่งเข้าด้วยกัน จะเกิดปฏิกริยากันในทางลบจะทำให้มีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเฉียวที่น้อยลงกว่าตำแหน่งเดียว แต่ในบางตำแหน่งเช่น ในการทดลองแบบตัดใบครั้งที่ 2 ในเชื้อ RS27 ในตำแหน่ง QTL2 และ QTL2/10 เมื่อเพิ่มโครโมโซม 10 เข้ามา จะทำให้สายพันธุ์คู่ผสมมีความต้านทานมากขึ้น แสดงว่าในยีนบางตำแหน่งถ้ารวมเข้าด้วยกันก็สามารถเสริมความต้านทานบางตำแหน่งจะเกิดปฏิกริยากันทำให้ความต้านทานน้อยลง ฉะนั้นการรวมยีนต้านทานแต่ละตำแหน่งเข้าด้วยกันอาจจะเกิดผลในทางเสริมกันหรือทำให้ความต้านทานน้อยลงก็ได้

Ariel *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาโรคใบสนิมในข้าวบาร์เลย์ (strip rust) โดยสร้างสายพันธุ์คู่ผสมที่มียีนเป็น 1 ตำแหน่งได้ 3 สายพันธุ์ คือ QTL4, QTL5 และ QTL7 หลังจากนั้นได้ทำการรวมยีนตำแหน่งต่าง ๆ เป็น 2 ตำแหน่งดังนี้ QTL4 X QTL5, QTL4 X QTL7, QTL5 X QTL7 และเป็นยีน 3 ตำแหน่ง 1 สายพันธุ์ คือ QTL4 X QTL5 X QTL7 พบว่า ในสายพันธุ์คู่ผสมที่ทำการรวมยีน 2 ตำแหน่งมีเกิดปฏิกริยากันทำให้มีเชื้อสามารถเข้าทำลายได้มากขึ้นโดยเฉพาะสายพันธุ์คู่ผสม QTL4 X QTL7 มีความอ่อนแอมากที่สุด และใน 3 ตำแหน่งคือ QTL4 X QTL5 X QTL7 เป็นการรวมยีน 3 ตำแหน่งมีความอ่อนแอต่อเชื้อมากกว่ายีน 1 ตำแหน่งแต่ว่ามีความต้านทานกว่ายีน 2 ตำแหน่งของสายพันธุ์คู่ผสม QTL4 X QTL7 ที่รวมกัน ซึ่งสามารถอธิบายว่าเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเกิดปฏิกริยาระหว่างยีน และเกิดปฏิกริยาระหว่างตำแหน่ง QTL แต่ละตำแหน่งกับสภาพแวดล้อมและอายุของต้นที่ต่างกัน

เนื่องจากลักษณะยีนต้านทานต่อโรคเหี่ยวเฉียวเป็นลักษณะที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่หรือปฏิกริยาของยีนที่ควบคุมเป็นลักษณะปริมาณ (Villareal, 1980) ซึ่งพบว่ามียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคเหี่ยวเฉียวหลายแบบทั้ง multiple recessive gene, single dominant gene, partial dominant gene, polygenic additive, monogenic additive gene action, multiple recessive gene acting additively (Anand *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1992) การแสดงออกของยีนที่มีหลายรูปแบบจึงเป็นตัวกำหนดการแสดงออกของยีนต้านทานโรคเหี่ยวเฉียวอย่างหนึ่ง

จากการศึกษาพันธุกรรมของมะเขือเทศพันธุ์ด้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว ยังคงไม่สามารถระบุความต้านทานได้อย่างชัดเจนซึ่งพบที่มีความแตกต่างกันตามแหล่งพันธุกรรม โดยพบว่าพันธุ์ H7998, H7996 และ H7997 มีพันธุกรรมด้านทานจาก *L. pimpinellifolium* (Pi 127805A) แต่มีปฏิกิริยาของยีนต่างกันโดยพบว่า H7998 มียีนควบคุมแบบยีนเด่นคู่เดียว (single dominant gene) ส่วน H7997 และ H7996 มียีนควบคุมแบบข่มบางส่วน (partial dominant gene) (Scott และ Somodi, 1992) อย่างไรก็ตาม Grimault *et al.* (1992) กลับพบว่า H7996 มียีนควบคุมแบบข่มสมบูรณ์ (completely dominant) ขณะที่พันธุ์ CRA66 มียีนควบคุมที่เป็นยีนด้อย (recessive gene) (Scott *et al.*, 1992) เนื่องจากลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวถูกควบคุมด้วยยีนแบบปริมาณที่ต่างกัน ระดับความต้านทานหรือระดับการเกิดโรคเหี่ยวเหี่ยวจึงไม่ได้อยู่ที่ความสามารถของเชื้อโรคที่จะทำให้เกิดโรคหรือพันธุกรรมของมะเขือเทศพันธุ์ด้านทานเท่านั้น แต่ยังมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย (Grimault *et al.*, 1992) ดังนั้นการที่พันธุ์ด้านทานต่อโรคในสภาพแวดล้อมหนึ่งอาจไม่สามารถแสดงลักษณะด้านทานในอีกสภาพแวดล้อมหรือในท้องถิ่นที่ต่างกันออกไปได้ (Scott *et al.*, 1992)

นอกจากนี้ในการปลูกเชื้อด้วยเชื้อสายพันธุ์ RS140 และ RS145 สามารถตรวจพบการตอบสนองในเชิงบวกในทุกตำแหน่งที่รวมเข้าด้วยกันคือต้นที่มียีนหลายตำแหน่ง เช่น QTL2/6.2/10 มีความต้านทานมากกว่ายีนตำแหน่ง QTL2/6.2 มีการตอบสนองต่อเชื้อในเชิงบวกต่อเชื้อในทุกตำแหน่งได้ค่อนข้างน้อยแสดงว่าในเชื้อสายพันธุ์ RS140 และ RS145 ไม่เกิดปฏิกิริยาในเชิงลบ นั้นแสดงว่าถ้าตำแหน่งยีนด้านทานมะเขือเทศสามารถแสดงความต้านทานที่เพิ่มขึ้นในบางสภาพแวดล้อม (environment-specific) หรือมีลักษณะเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ (race-specific) และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อซึ่งจะพบว่ามีผลดีและสามารถนำไปปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันได้และสามารถต้านทานเชื้อต่างสายพันธุ์กันได้แต่ยีนบางตำแหน่งอาจจะอ่อนแอต่อเชื้อสายพันธุ์นั้นในสภาพแวดล้อมหนึ่ง ๆ แต่อาจจะต้านทานต่อเชื้อนั้น ๆ ในสภาพแวดล้อมที่ต่างไปได้