

การคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวเฉาโดยใช้แผนที่ละเอียดระดับโมเลกุล และการทดสอบมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนต้านทานโรคเหี่ยวเฉา

Selection of Bacterial Wilt Resistance Tomato Using High Density Map and Testing of Near Isogenic Lines Containing Bacterial Wilt Resistance Genes

คำนำ

มะเขือเทศเป็นพืชผักกินผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง มีแหล่งปลูกและผลิตในท้องถิ่นต่าง ๆ อย่างกว้างขวางทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและกึ่งร้อน ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการปลูกมะเขือเทศปริมาณมาก โดยสามารถส่งจำหน่ายทั้งในรูปผลสด เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ รวมทั้งส่งโรงงานเพื่อการแปรรูป เช่น น้ำมะเขือเทศ และซอสมะเขือเทศ เป็นต้น แหล่งปลูกมะเขือเทศส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันตก ส่วนภาคตะวันออกและภาคใต้มีการผลิตกันน้อย (งานข้อมูลส่งเสริมการเกษตร, 2547)

อย่างไรก็ตามการผลิตมะเขือเทศยังคงประสบปัญหาในเรื่องโรคและแมลงรบกวน โดยเฉพาะโรคเหี่ยวเฉา ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (เดิมชื่อ *Pseudomonas solanacearum* E.F Smith) ซึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ในดินและสามารถแพร่กระจายไปกับดิน มีพืชอาศัยมากกว่า 250 ชนิดในพืช 30 วงศ์ (Hayward, 1991) ได้แก่พืชผัก เช่น แครอท ผักกาดหัว พริก มันฝรั่ง พืชตระกูลถั่วต่าง ๆ เช่น ถั่วลิสง ถั่วแขก ป่าน ปอ พวกไม้ดอกได้แก่ พิทูเนีย ทานตะวัน ดาวเรือง กระเจียว พืชไร่ ได้แก่ มันสำปะหลัง ละหุ่ง ฝ้าย อ้อย ยาสูบ ข้าวโพด และจึงไม้ผลบางชนิด เช่น แตงโม กัลย พวงวรีพืชอีกหลายชนิด รวมทั้ง ไม้ป่า เช่น สัก (Atabug and Juan, 1981) ลักษณะอาการของโรค คือ ในระยะแรกพืชจะเกิดอาการเหี่ยวในช่วงกลางวันที่มีอากาศร้อน ใบล่างจะเหี่ยวห้อยลง หลังจากนั้นพืชจะแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น ใบม้วนงอลง ทั้งที่ใบยังเขียวอยู่

การป้องกันกำจัดโรคโดยวิธีการอบดิน หรือการใช้สารเคมีป้องกันกำจัด ให้ผลไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ และไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (Aspiras and Dela Cruze, 1985) การควบคุมและป้องกันกำจัดโดยการนำยอดมะเขือเทศพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าไปต่อบนดินตอที่ต้านทานโรค (วิภาพร, 2538) และการใช้วิธีการทางชีววิธีโดยใช้จุลินทรีย์บางชนิดช่วยควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุ (อุไรจนา, 2534) นั้นใช้ได้ผลดี แต่เกษตรกรไม่สะดวกต่อการนำไปใช้

ประโยชน์ เนื่องจากสิ้นเปลืองเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายสูง การใช้พันธุ์ต้านทานจัดเป็นวิธีป้องกันการแพร่ระบาดและการเข้าทำลายของโรคได้วิธีหนึ่ง โดยเกษตรกรสามารถปฏิบัติงานได้สะดวก ช่วยลดต้นทุนการผลิตจากการใช้สารเคมี และไม่มีผลตกค้างต่อสภาพแวดล้อม และไม่เป็นอันตรายกับเกษตรกรอีกด้วย

ลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศเป็นลักษณะทางปริมาณ (Anand *et al.*, 1993) ซึ่งเป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ยีนแต่ละตำแหน่งมีผลต่อการแสดงออกต่อลักษณะนั้นได้น้อยและสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะนี้อย่างมาก ทำให้การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความต้านทานต่อโรคนี้นี้กระทำได้ยากและไม่ประสบความสำเร็จมากนัก (Acoate *et al.*, 1964)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคระดับโมเลกุลต่าง ๆ โดยเฉพาะทางด้านดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) มาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช ด้วยการสร้างแผนที่ยีนและนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่กระจายตัวร่วม (co-segregation) กับยีนต้านทาน มาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่มีลักษณะตามต้องการด้วยวิธีที่เรียกว่า marker-assisted selection ซึ่งจัดเป็นวิธีการคัดเลือกโดยอ้อมที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกจีโนไทป์ของพืชที่ต้องการ พร้อมกับลักษณะที่สนใจได้ตามเป้าหมาย (จุลภาค, 2543) ซึ่งสามารถนำมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะปริมาณซึ่งเป็นลักษณะที่ยากในการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional) ให้สามารถดำเนินการได้รวดเร็วและง่ายขึ้น

ได้มีรายงานพบตำแหน่งยีนของลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉาีน้อยอยู่อย่างน้อย 6 ตำแหน่งในมะเขือเทศ 2 พันธุ์ คือพันธุ์ L285 และพันธุ์ Hawaii7996 โดยพบตำแหน่งของความต้านทานอย่างน้อย 3 ตำแหน่งในพันธุ์ L285 คือ QTL 2 วางตัวอยู่บนโครโมโซม 2 ระหว่างตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG48 และ TG332 โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรม 13.7 cM (Dara-Carlos, 1998) QTL6.1 วางตัวอยู่บนโครโมโซม 6 ระหว่างตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมาย CT184 และ TG365 โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรม 4.1 cM (Danesh, 1994) QTL10 วางตัวอยู่บนโครโมโซม 10 ระหว่างตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมาย TG230 (Dara-Carlos, 1998) และ CT234 กับ TG285 โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรม 37.3 cM (Danesh, 1994)

ณัญญา (2547) ได้สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เพื่อให้มียีนควบคุมความต้านทานโรคใน 4 ตำแหน่ง โดยแต่ละสายพันธุ์ที่สร้างนั้นมียีนต้านทานเพิ่มเข้ามายังพันธุ์สีดา

ทิพย์ 3 พันธุ์ละ 1 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยการผสมพันธุ์ด้านทานโรคได้แก่ พันธุ์ L285 และ H7996 เข้ากับมะเขือเทศ พันธุ์สีดาทิพย์ 3 ซึ่งอ่อนแอต่อโรค และผสมกลับ 6 ครั้งจนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 6 จึงนำลูกผสมกลับชั่วที่ 6 ที่ได้ผสมตัวเองเพื่อให้ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 6 รุ่นที่ 2 (BC_6F_2) เพื่อคัดเฉพาะต้นที่เป็น homozygous ในตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือก เมื่อนำมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด ที่มียีนควบคุมความต้านทานในตำแหน่งโครโมโซม 2 (NIL-QTL2) และ 6.2 (NIL-QTL6.2) มาทดสอบระดับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาพบว่า มีระดับความต้านทานโรคเหี่ยวได้ค่อนข้างดี แต่พบว่าสายพันธุ์คู่แฝด ทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นมีลักษณะของรูปร่างผลและสีผลไม่ตรงตามลักษณะประจำพันธุ์สีดาทิพย์ 3 โดย NIL-QTL2 มีลักษณะลูกแป้น (ภาพผนวกที่ 4) และ NIL-QTL6.2 มีผลสีส้มซึ่งไม่เป็นไปตามลักษณะประจำพันธุ์ของพันธุ์สีดาทิพย์ 3 คือ มีลักษณะประจำพันธุ์เป็นแบบผลรูปไข่ สีส้มพู ทั้งนี้เนื่องมาจากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกในการศึกษาดังกล่าว มีระยะห่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ส่งผลให้เกิดการแลกเปลี่ยนส่วนโครโมโซมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ (undetected crossing over) เช่น double crossing over ทำให้การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคมีโอกาสผิดพลาดได้ง่าย อีกทั้งอาจมีลักษณะที่ไม่ต้องการติดมาด้วย (linkage drag)

วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวคือ ควรหา recombination breakpoint ระหว่างยีน 2 ยีน คือ ยีนที่ต้องการคัดเลือกไว้กับยีนที่ไม่ต้องการ โดยทำแผนที่ละเอียดระดับโมเลกุลระหว่างยีนทั้ง 2 เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอเครื่องหมายวางตัวใกล้ชิดกับยีนที่ต้องการมากที่สุด ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงต้องการ break linkage drag ของลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในตำแหน่งของ QTL2 กับยีนผลแป้น

ณัญญา (2547) ทดสอบการเกิดโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่สร้างขึ้น ด้วยเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค 4 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่ายีนที่ควบคุมความต้านทานโรคแต่ละตำแหน่งมีการตอบสนองในเชิงบวกกับเชื้อที่ต่างสายพันธุ์กัน รวมทั้งสภาพแวดล้อมที่ทดสอบก็มีผลต่อการตรวจพบการตอบสนองในเชิงบวกได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการทำงานของยีนควบคุมความต้านทานแต่ละตำแหน่งมีความสัมพันธ์ที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุ และสภาพแวดล้อม ถึงแม้ว่าลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศจะเป็นลักษณะปริมาณ ซึ่งเป็นลักษณะที่ทำให้มีความต้านทานแบบไม่จำเพาะ (horizontal resistance) โดยพืชที่มีความต้านทานในลักษณะนี้มักแสดงความต้านทานกับเชื้อได้หลายสายพันธุ์ก็ตาม แต่ก็พบว่าการตรวจพบความต้านทานที่เฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของเชื้อได้ในบางตำแหน่งของความต้านทานที่เป็นลักษณะเชิงปริมาณได้ (Young, 1996; Conebido et al., 1996; Wang et al., 2000) ดังนั้นการรวมยีนต้านแต่ละตำแหน่งเข้าด้วยกัน จึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ที่ควรดำเนินการต่อไป เพื่อให้

ได้สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อได้หลากหลายสายพันธุ์ และหลากหลายสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดความต้านทานแบบคงทนและยาวนานหรือเรียกว่าเป็นความต้านทานแบบ horizontal resistance นั่นเอง การทดลองนี้เป็นการสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic lines: NILs) ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มียีนเป็น 1 2 และ 3 ยีน ตามลำดับ โดยวิธีการผสมกลับและใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก โดยการปลูกเชื้อ 4 สายพันธุ์ คือ RS27 RS140 RS145 และ RS160 โดยเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีความรุนแรงในการเข้าทำลายโรคที่แตกต่างกันและมีแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงระดับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในสายพันธุ์คู่แฝดที่มีตำแหน่งของความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในสายพันธุ์ที่มีตำแหน่งความต้านทานโรค 1 2 และ 3 ตำแหน่งตามลำดับ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเกิด recombinant breakpoint ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะผลแป้น และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉา ในตำแหน่งของโครโมโซม 2 (QTL2)
2. ศึกษาการแสดงออกของระดับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในต้น homozygous
3. ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางฟีโนไทป์ในลักษณะของความต้านทานโรคและลักษณะรูปร่างผลเปรียบเทียบกับลักษณะทางจีโนไทป์
4. หาคำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาบนตำแหน่งโครโมโซม 2 เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกมะเขือเทศที่มีลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาได้อย่างแม่นยำ และสามารถแยกลักษณะที่ไม่ต้องการ ได้แก่ ลักษณะผลแป้น ออกจากยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคเพื่อให้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่สร้างขึ้นมีลักษณะเหมือนกับพันธุ์รับมากที่สุด
5. สร้างสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในแต่ละตำแหน่ง
6. รวมยีนแต่ละตำแหน่งเข้าด้วยกันเพื่อให้ได้สายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนควบคุมความต้านทาน 2 และ 3 ตำแหน่ง ตามลำดับ
7. เปรียบเทียบระดับความต้านทานโรคของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่สร้างขึ้น