Monma *et al.* (1997) รายงานว่า ความต้านทานต่อโรคเหี่ยวของ มะเขือเทศ เป็นลักษณะด้อย โดยลูก F_1 จะมีดัชนีความต้านทาน อยู่ระหว่าง พ่อ กับ แม่ แต่ค่อนไปในทางพ่อแม่ข้างที่อ่อนแอ (มีค่าดัชนีความต้านทานต่ำกว่า) โดยเขาศึกษา ใน การผสมระหว่าง พ่อ –แม่ คือ D9 X TPL-5 และ TPL-5 X Hawaii 7998

ในประเทศไทย การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่ศึกษาโดย บุปผา (2538) โดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น 6 ชั่วรุ่น พบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทาน เป็นยีนที่แสดงผลแบบบวก ใน 1 คู่ ผสมคือ สีดาทิพย์ 2 x CL 143-0-10-3-0-1-10 , ในคู่ผสมระหว่าง สีดาทิพย์ 2 x BL 342 และ Early pink X CL 143-0-10-3-0-1-10 พบว่าอิทธิพลของยีนเป็นแบบบวก ร่วมกับอิทธิพลของยีนแบบ epistasis ชนิด ข่ม X ข่ม ส่วนคู่ผสม Early Pink X BL 342 มีการแสดงออกของยีนทั้งแบบ บวก แบบข่ม และ อิทธิพลของยีนแบบ epistasis ชนิด บวก X บวก ซึ่ง จะเห็นได้ว่า ยีนควบคุม ลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยว จะมีกลไกการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ซับซ้อน

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การทดลองเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยว

การแยกเชื้อสาเหตุและทดสอบหาสายพันธุ์ที่รุนแรง

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย จำนวน 3 แหล่ง ดังนี้ อ. หาดใหญ่ อ.บางเหรียง อ.บางกล่ำ จ.สงขลา จำนวน 8 ตัวอย่าง ทดสอบว่าเกิดจากแบคทีเรียหรือไม่โดยการตัดส่วนของโคนต้นและแช่ในน้ำสะอาด หากตัวอย่างโรคนั้นเกิดจากเชื้อแบคทีเรียจะปรากฏกลุ่มของแบคทีเรียเคลื่อนที่เป็นสายในน้ำที่แช่นั้นในเวลา 1-5 นาที บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเหี่ยวมาล้างบริเวณโคนต้นและรากให้สะอาดทำความสะอาดผิวด้วย alcohol 70% ตัดโคนต้นตามขวางยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ในหลอดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้สักครู่จะปรากฏ bacterial exudate เป็นของเหลวสีขาวขุ่นไหลออกมาจากชิ้นส่วนพืช ใช้ลูปแตะน้ำแขวนลอยแบคทีเรีย สตรีคบนอาหาร Potato synthetic agar (PSA) ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีสีขาว

ลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ผิวหน้าโค้งนูนเป็นมัน โดยใน 1 ตัวอย่างพืชจะเลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ 2-3 โคโลนีได้เชื้อจำนวน 17 ไอโซเลท

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

การเตรียมพืช เตรียมต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 อายุ 30 วัน จำนวน 100 ต้น ปลูกในกระถางพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร ภายในเรือนกระจก

การเตรียมเชื้อ เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยของเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 17 ไอโซเลท ที่แยกได้ย้ายเลี้ยงในอาหาร PSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ 0.5 McFarland และเนื่องจากผู้วิจัยมีเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว *R. solanacearum* ที่เก็บรักษาไว้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 จึงได้คัดเลือกและนำมาร่วมทดสอบความสามารถและรุนแรงในการทำให้เกิดโรคใหม่ โดยปกติเชื้อที่ผ่านการย้ายเลี้ยงหลาย ๆ ครั้ง และเก็บรักษาไว้ ความสามารถในการก่อโรคอาจลดลงหรือหายไป โดยเฉพาะเชื้อ *R. solanacearum* สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคค่อนข้างมาก คัดเลือกได้เชื้อจำนวน 41 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากพืชอาศัย 9 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มะเขือยาว พริกขี้หนู พริกหนุ่ม มันฝรั่ง ดาวกระจาย ขิง และงา ที่เก็บไว้ในอาหาร NA slant มาเพิ่มปริมาณเชื้อ 3 ครั้ง ใน อาหาร PSA slant แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ จากนั้นเตรียมเป็นแบคทีเรียแขวนลอยเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ 0.5 McFarland

การปลูกเชื้อ ทำการปลูกเชื้อโดยการตัดใบ (leaf cutting) โดยนำกรรไกรจุ่มในแบคทีเรียแขวนลอย แล้วตัดใบเริ่มจากใบที่ 3 นับจากยอดลงมาต้นละ 4 ใบ ทำการทดลองไอโซเลทละ 2 ต้น ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรียแขวนลอย

การตรวจผล หลังจากนั้นตรวจผลภายใน 7-10 วัน และประเมินความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Winstead และ Kelman (1952) โดยคำนวณดัชนีการเกิดโรคเหี่ยว
การแสดงออกของโรคเหี่ยวแบ่งเป็น 6 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว
1 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 1-2 ใบ
2 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 3-4 ใบ
3 = ยอดเริ่มแสดงอาการเหี่ยว
4 = ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น
5 = ต้นเหี่ยวและแห้งตาย

ดัชนีการเกิดโรค = $\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ x100}}{\text{จำนวนต้น x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}}$

และจากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่า เชื้อที่ได้จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ใหม่ จำนวน 17 ไอโซเลท สามารถทำให้เกิดโรคในระดับ 3-4 ส่วนเชื้อที่คัดเลือกจากการเก็บรักษา จำนวน 41 ไอโซเลท มีเพียง 3 ไอโซเลท ที่ทำให้เกิดโรคระดับ 4 ส่วนที่เหลือบางไอโซเลทไม่ทำให้เกิดโรค และทำให้เกิดโรคในระดับ 2 จึงคัดเชื้อส่วนนี้ออกไป และทำการแยกเชื้อใหม่ (re-isolate) จากมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคระดับ 4 จำนวน 20 ต้น พบว่าได้เชื้อชนิดเดิม จึงใช้ในการศึกษาต่อไป

2) การคัดเลือกวิธีการปลูกเชื้อและความรุนแรงในการเกิดโรค

เป็นการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาพันธุกรรมต่อไป วางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design in Randomized Complete Block มี 4 ซ้ำ และมี วิธีการในการปลูกเชื้อมี 3 วิธี คือ clipping technique, stem inoculation technique และ micropipette technique จัด เป็น Main plot และให้เชื้อไอโซเลทต่างกัน 20 ไอโซเลท กับ ชุดควบคุม คือการปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่น เป็น Sub plot ใช้ต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน 3 ต้น ต่อ 1 sub- plot ต่อ ซ้ำ

การเตรียมพืช เตรียมต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 อายุ 30 วัน จำนวน 300 ต้น

การเตรียมเชื้อ เตรียมแบคทีเรียแขวนลอยที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองก่อนหน้านี้ จำนวน 20 ไอโซเลท โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วย้ายเลี้ยงต่อใน Nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที นำเชื้อที่ได้มาปรับให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 108 หน่วย โคโลนีต่อมิลลิลิตรที่ 0.5 McFarland

วิธีการปลูกเชื้อ ใช้วิธีการปลูกเชื้อ 3 วิธี

Cliping technique โดยใช้มีดผ่าตัด ตัดก้านใบห่างจากลำต้น 0.5 เซนติเมตร เริ่มตัดจากใบ ที่ 3 นับจากยอดลงมา หยดแบคทีเรียแขวนลอยลงบนแผลทันที ใช้เชื้อ 10 ไมโครลิตรต่อก้าน ทำการทดลองไอโซเลทละ 4 ต้น

Stem inoculation technique ใช้เข็ม 5 เล่มมัดเป็นกลุ่มจิ้มทำแผลที่เหนือซอกตาของใบที่ 3 นับจากยอด หยดแบคทีเรียแขวนลอยลงบนแผลใช้เชื้อละ 10 ไมโครลิตรต่อต้น

Micropipette technique ใช้ micropipette tip ขนาด 10 ไมโครลิตร ดูดแบคทีเรียแขวนลอยแล้วปักลงในต้นที่ตำแหน่งเหนือซอกตาของใบที่ 3 ปลด micropipette tip ที่มีแบคทีเรียแขวนลอยที่เสียบคาไว้ ปล่อยให้พืชดูดซึมเข้าไปเองจนหมด ซึ่งใช้เวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง จากนั้น จึงดึง micropipette tip ออก

3) การปลูกทดสอบเพื่อดูลักษณะเบื้องต้น ของพันธุ์มะเขือเทศจาก AVRDC

สายพันธุ์มะเขือเทศที่ทดสอบ ได้แก่

1) CL 5915-153 D4 –3-3-0
2) CL 5915 – 206 D4-2-5-0
3) CL5915 – 22304-2-1-0
4) CLN 2116B
5) CLN294BC1F2-31-18
6) CLN294BC1F2-2-6-0

พันธุ์และสายพันธุ์ต่างๆที่กล่าวนี้ได้ปลูกทดสอบในสภาพเรือนกระจก ที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ ใน ช่วง เดือน พ.ย. 2548 ร่วมกับพันธุ์ สีดาทิพย์ 4 ของประเทศไทย พืชที่ปลูกออกดอก ติดผล ประมาณเดือน ก.พ. 2549 เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตโดยทั่วไป ไม่มีการใช้แผนการทดลองหรือ จัดให้มีซ้ำ ได้บันทึกภาพ ของต้นและผล ในระหว่างการเจริญเติบโต ดังภาพในผนวกภาพที่ 26-35

4) การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น

การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยชั่วรุ่น (generation mean analysis) ซึ่งเป็นวิธีการที่เสนอโดย Hayman (1958) วิธีการโดยย่อคือ การสร้างประชากรชั่วรุ่นต่างๆ จาก การผสมระหว่างพันธุ์ 2 พันธุ์ เรียกทั่วไปว่า เป็นพันธุ์ พ่อ –แม่ หรือ ชั่วรุ่น P_1 และ P_2 ชั่วรุ่นต่างๆที่เกิดจากการผสมระหว่าง P_1 และ P_2 คือ

F_1 เป็นชั่วรุ่นที่ 1 จากการผสมระหว่าง $P_1 X P_2$

F_2 เป็นชั่วรุ่นที่ 2 จากการผสมระหว่าง $P_1 X P_2$, เกิดจาก การผสมตัวเองของF_1

BC_1 เป็นลูกที่เกิดจากการผสมระหว่าง F_1 X P_1

และ BC_2 เป็นลูกที่เกิดจากการผสมระหว่าง F_1 X P_2

นำประชากรทั้ง 4 ชั่วรุ่น รวมทั้งพันธุ์พ่อ แม่ รวม 6 ชั่วรุ่น มาปลูก พร้อมกัน การปลูกทดสอบทั้ง 6 ชั่วรุ่นจะปลูกในกระถางและจัดวางไว้ในโรงเรือน ขนาดของหน่วยทดลองจะแตกต่างกันระหว่าง

ชั่วรุ่นกล่าวคือ ชั่วรุ่น P_1 , P_2 , F_1 ใช้ประมาณ20 ต้นต่อซ้ำ BC_1 และ BC_2 ใช้ประมาณ 20 ต้น ต่อซ้ำ และ F_2 ใช้ประมาณ 100 ต้น ต่อ ซ้ำ

พันธุ์ที่จะใช้เป็นพันธุ์แม่ (P_1) คือพันธุ์ที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมภาคใต้ ได้ดีและมีคุณสมบัติตรงกับความต้องการของตลาด ในการวิจัยนี้ใช้ พันธุ์ สีดาทิพย์ 1

ส่วนพันธุ์ที่จะใช้เป็นพันธุ์พ่อ(P_2) จะเลือกพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรค เหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย คือ พันธุ์ CLN2026 D ข้อมูลที่ได้จากการปลูกทดสอบ 6 ชั่วรุ่น ของแต่ละคู่ผสม จะต้องนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อทดสอบว่ามีความแตกต่างระหว่างชั่วรุ่น หรือไม่ โดยใช้ F- test เมื่อพบว่าลักษณะที่ศึกษามี ความแตกต่างระหว่างชั่วรุ่น ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น (Generation Mean Analysis)

ตามโมเดลที่เสนอโดย Hayman (1958) ค่าเฉลี่ยของแต่ละชั่วรุ่นสามารถคาดหมายหรืออธิบายได้ด้วย ค่าพารามิเตอร์ เพียง 6 ค่า คือ m , [d] , [h] , [i] , [j] และ [l] โดย

m : mean ; ซึ่งคือค่าเฉลี่ยของชั่วรุ่น F2

[d] : additive

[h] : dominance

[i] : additive x additive interaction

[j] : additive x dominance interaction

[l] : dominance X dominance interaction

ถ้าความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเป็นผลที่เกิดจากอิทธิพลของยีนหลายๆตำแหน่ง เราสามารถคาดหมายค่าที่จะวัดได้ ในแต่ละชั่วรุ่น จาก สมการ ที่มี เพียง 3 พารามิเตอร์ หากยีน ต่างตำแหน่งไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ดังนี้

$P_1 = m + d - (\frac{1}{2})[h]$

$P_2 = m - d - (\frac{1}{2})[h]$

$F_1 = m + (\frac{1}{2})[h]$

$F_2 = m$

$BC_1 = m + (\frac{1}{2})[d]$

$BC_2 = m - (\frac{1}{2})[d]$

และหากมี ปฏิสัมพันธ์ ระหว่างยีนที่อยู่ ต่างตำแหน่งกัน (digenic interaction) ค่าคาดหมายของ 6 ชั่วรุ่นที่กล่าว จะมีค่าคาดหมาย ที่ขึ้นอยู่กับ 6 พารามิเตอร์

$P_1 = m + d - (\frac{1}{2})[h] + [i] - [j] + (\frac{1}{4})[l]$

$P_2 = m - d - (\frac{1}{2})[h] + [i] + [j] + (\frac{1}{4})[l]$

$F_1 = m + (\frac{1}{2})[h] + (\frac{1}{4})[l]$

$F_2 = m$