ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช | โรคพืช

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

Evaluation of Transgenic Tomato for *Cucumber mosaic virus* Resistance

นามผู้วิจัย นางสาวอัญญรัตน์ ฤทธิ์พิทักษ์พงศ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์สุพัฒน์ อรรถธรรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์คนึงนิตย์ เหรียญวรากร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

Evaluation of Transgenic Tomato for *Cucumber mosaic virus* Resistance

โดย

นางสาวอัญญรัตน์ ฤทธิ์พิทักษ์พงศ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อัญญรัตน์ ฤทธิ์พิทักษ์พงศ์ 2553: การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุพัฒน์ อรรถธรรม, Ph.D. 92 หน้า

มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม 5 สายพันธุ์คือ L-1 L-6-3 L-13 L-25 และ L-29-3 ได้จากการถ่ายยีนเรพพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (defective replicase gene) ของเชื้อไวรัสใบด่างแตง (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ให้กับมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดรุ่น R_1 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย L-1 L-6-3 และ L-13 สามารถต้านทานต่อการปลูกเชื้อ CMV ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง ลักษณะการต้านทานเทียบได้กับ immunity คือ พืชไม่แสดงอาการของโรคและตรวจไม่พบเชื้อ CMV ในขณะที่ต้นอ่อนแอแสดงอาการของโรคและตรวจพบไวรัสในปริมาณสูง การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมจากรุ่น R_0 ไปยัง R_1 เมื่อวิเคราะห์โดยอาศัยวิธี chi-square test (χ^2-test) พบว่ามีอัตราการกระจายตัว <3:1 แตกต่างจากกฎของเมนเดล อัตราส่วนต้นต้านทานโรคต่อต้นอ่อนแอแตกต่างกันไปในรุ่น R_2 และ R_3 แต่ยังคงตรวจพบยีนเรพพริเคสที่ไม่สมบูรณ์ถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูก มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-47 L-13-76 และ L-13-90 ในรุ่น R_3 มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงสุดถึง 100% มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาให้เป็นพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อไวรัสใบด่างแตงในอนาคต

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Unyarat Ritpitakphong 2010: Evaluation of Transgenic Tomato for *Cucumber mosaic virus* Resistance. Master of Science (Agricultural), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Supat Attathom, Ph.D. 92 pages.

Five lines of transgenic tomato namely L-1, L-6-3, L-13, L-25 and L-29-3 were obtained by genetic transformation of Seedathip 3 tomato with defective replicase gene of *Cucumber mosaic virus* (CMV). Seedlings derived from R_1 seeds of L-1, L-6-3 and L-13 lines showed high percentages of resistance to CMV infection. The resistance was equivalent to immunity by which inoculated seedlings showed no symptom and no virus was detected. Susceptible seedlings showed severe disease symptoms with high virus concentration. Non-Mendelian inheritance of transgene from R_0 to R_1 populations was revealed by chi-square test (χ^2-test) as indicated by the segregation ratio of <3:1. The ratio of resistance versus susceptible varied in R_2 and R_3 populations although the transgene was consistently detected. The R_3 seedlings of L-13-47 L-13-76 and L-13-90 line exhibited 100% resistance. It is concluded that these 3 lines of transgenic tomatoes can serve as good germplasms for future development of tomato variety resistant to CMV.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ อรรถธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์คนึงนิตย์ เหรียญวรากร และผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชนี ฮงประยูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำ ในการเรียนการค้นคว้าวิจัยและด้านอื่นๆ อย่างเอาใจใส่เสมอมา ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนข้าพเจ้าประสบผลสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช ชั้น 4 อาคารเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร อาคารB และโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพและความปลอดภัยทางชีวภาพ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือ อุปกรณ์การวิจัย สารเคมี ตลอดจนสถานที่ในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณองค์กร ISAAA และโครงการไทย-เยอรมัน โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนงานวิจัยโครงการ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณปู่ บิดา มารดา ที่สนับสนุนการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา คุณประโยชน์ที่ พึ่งเกิดขึ้นจากการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ขอมอบแด่ทุกท่านด้วยความเคารพ

อัญญรัตน์ ฤทธิ์พิทักษ์พงศ์

พฤษภาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	24
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
สรุป	58
ข้อเสนอแนะ	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	68
ภาคผนวก ก ตารางแสดงผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA	69
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	89
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	92

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสของ CMV (ประกอบด้วย RNA1, RNA2 หรือทั้งคู่)	11
2	อัตราส่วนของการกระจายตัวของ transgene ที่มีการสอดแทรกของยีน 1 ถึง 4 ตำแหน่ง	14
3	เปอร์เซ็นต์ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อโรค และค่า χ^2-test ของการกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ที่ได้จากการตรวจสอบความต้านทานโรคของต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1	26
4	ความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 และ R_3	33
5	จำนวนผลและน้ำหนักผล (กรัม) ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และแสดงความต้านทานในสภาพโรงเรือน	35
6	ผลผลิตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ในสภาพโรงเรือน แสดงจำนวนผลและน้ำหนักผล (กรัม) ของแต่ละช่วงเวลาปลูก	41
7	ผลผลิตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ในสภาพโรงเรือน แสดงจำนวนผลและน้ำหนักผล (กรัม) ที่ทำการทดลองทั้งหมด	43
8	การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 และ R_3	48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ก1 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ในการทดลองครั้งที่ 1 จำนวน 5 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 วันโดยใช้เทคนิค ELISA 70

ก2 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ในการทดลองครั้งที่ 2 จำนวน 3 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 วันโดยใช้เทคนิค ELISA 72

ก3 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ในการทดลองครั้งที่ 1-3 จำนวน 3 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 และ 60 วันโดยใช้เทคนิค ELISA 74

ก4 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ในการทดลองครั้งที่ 1-3 จำนวน 9 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 และ 40 วันโดยใช้เทคนิค ELISA 81

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่พลาสมิดสายผสม pCMV N/B-23 ขนาด 13.8 กิโลเบส ที่ใช้สำหรับถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ให้กับมะเขือเทศ แสดงโครงสร้างของ Chimeric construct ของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ใน plant vector pROK2	18
2	ขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV รุ่น R_1 นำเมล็ดมะเขือเทศที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วย 0.6% sodium hypochlorite ก่อนที่จะนำไปเพาะในกระบะเพาะ ทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อไวรัส CMV เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 20 วันสังเกตอาการของโรคที่พัฒนาขึ้นบนต้นมะเขือเทศ ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA และตรวจสอบความสามารถในการถ่ายทอด transgene ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot สุดท้ายคัดเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงความต้านทานต่อโรคและปล่อยให้ผสมตัวเอง เพื่อเก็บเมล็ดมาทดสอบความต้านทานและความคงตัวของยีนต่อในรุ่นถัดไป	25
3	ลักษณะอาการของโรคบนต้นมะเขือเทศภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS 10 วัน	28
4	เปรียบเทียบลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับส่วนต่างๆ บนต้นมะเขือเทศภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV (จากซ้าย มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ มะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ และมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ)	29
5	การเกิดโรคจากเชื้อ CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 หลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน	30

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
6	ขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV รุ่น R_2 นำเมล็ดมะเขือเทศที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วย 0.6% sodium hypochlorite ก่อนที่จะนำไปเพาะในกระบะเพาะ ทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อไวรัส CMV เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 20 วันสังเกตอาการของโรคที่พัฒนาขึ้นบนต้นมะเขือเทศ ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA และตรวจสอบความสามารถในการถ่ายทอด transgene ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA ซ้ำมะเขือเทศมีอายุ 40 และ 60 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัส สุดท้ายคัดเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงความต้านทานต่อโรคและปล่อยให้ผสมตัวเอง เพื่อเก็บเมล็ดมาทดสอบความต้านทานและความคงตัวของยีนต่อในรุ่นถัดไป	32
7	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 45 วัน	36
8	ปริมาณผลผลิตจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 5 ต้น ต่อ 1 สายพันธุ์ ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 70 วัน	37
9	ค่าเฉลี่ยผลผลิตมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ ในรุ่น R_2 เมื่อเก็บเกี่ยวต้นมะเขือเทศ 70 วัน หลังการปลูกเชื้อ (ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน คือไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์)	38
10	ผลมะเขือเทศขนาดต่างๆ ที่เก็บจากต้นมะเขือเทศ 1 ต้น ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 70 วัน	39

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV รุ่น R_3 นำเมล็ดมะเขือเทศที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วย 0.6% sodium hypochlorite ก่อนที่จะนำไปเพาะในกระบะเพาะ ทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อไวรัส CMV เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 20 วันสังเกตอาการของโรคที่พัฒนาขึ้นบนต้นมะเขือเทศ ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA และตรวจสอบความสามารถในการถ่ายทอด transgene ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA ซ้ำมะเขือเทศมีอายุ 40 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัส สุดท้ายคัดเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงความต้านทานต่อโรคและปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อเก็บเมล็ดมาทดสอบความต้านทานและความคงตัวของยีนต่อในรุ่นถัดไป	42
12	มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 25 วัน	44
13	ปริมาณผลผลิตจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 5 ต้น ต่อ 1 สายพันธุ์ ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 70 วัน	45
14	ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_1 ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย เทคนิค PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนปลอดโรค D: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนเป็นโรค และ P: พลาสมิด pCMV N/B-23)	49
15	ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_2 ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย เทคนิค PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนปลอดโรค D: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนเป็นโรค และ P: พลาสมิด pCMV N/B-23)	50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

16 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_3 ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย เทคนิค PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนปลอดโรค D: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนเป็นโรค P: พลาสมิด pCMV N/B-23 และ L-13-76: มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-76 ต้นที่ 75-91) 51

17 ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization โดยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากนั้นใช้ replicase gene probe ที่ติดฉลากด้วยสาร Digoxigenin ตรวจผลไฮบริไดเซชัน ด้วยเทคนิค chemiluminescence โดยใช้ CDP *star*™ substrate 53

18 ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization โดยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากนั้นใช้ replicase gene probe ที่ติดฉลากด้วยสาร Digoxigenin ตรวจผลไฮบริไดเซชัน ด้วยเทคนิค chemiluminescence โดยใช้ CDP *star*™ substrate (H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีน และ P: พลาสมิด pCMV N/B-23) 54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CDP*star*™	=	Disodium-2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dixetane-3,2'-(5'-chloro) tricycle[3.3.1.1.^{3,7}]-decan}-4-yl)phenyl phosphate
CMV	=	*Cucumber mosaic virus*
CTAB	=	Cetyl trimethylammonium bromide
Na.DIECA	=	sodium diethyldithiocarbamate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
LSD	=	Least Significant Difference
L-1-22	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 ต้นที่ 22 จากการทดลองครั้งที่ 1 ในรุ่น R_2
L-1-46	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 ต้นที่ 46 จากการทดลองครั้งที่ 1 ในรุ่น R_2
L-6-3-23	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 ต้นที่ 23 จากการทดลองครั้งที่ 1 ในรุ่น R_2
L-6-3-34	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 ต้นที่ 34 จากการทดลองครั้งที่ 1 ในรุ่น R_2
L-13-3	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 ต้นที่ 3 จากการทดลองครั้งที่ 3 ในรุ่น R_2
L-13-10	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 ต้นที่ 10 จากการทดลองครั้งที่ 3 ในรุ่น R_2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

L-13-47	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 ต้นที่ 47 จากการทดลองครั้งที่ 2 ในรุ่น R_2
L-13-76	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 ต้นที่ 76 จากการทดลองครั้งที่ 2 ในรุ่น R_2
L-13-90	=	สายพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ที่เกิดจากการเก็บเมล็ดแบบแยกต้นเดี่ยว ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 ต้นที่ 90 จากการทดลองครั้งที่ 2 ในรุ่น R_2
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
µg	=	microgram
*npt*II	=	neomycin phosphotransferase II
$O.D._{405}$	=	Optical density at 405 nanometer wavelength
PAb	=	polyclonal antibody
PBS	=	Phosphate buffer saline
PBST	=	Phosphate buffer saline with Tween-20
PCR	=	Polymerase chain reaction
R_1	=	the first filial generation
R_2	=	the second filial generation
R_3	=	the third filial generation
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
χ^2	=	chi-square test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

Evaluation of Transgenic Tomato for *Cucumber Mosaic Virus* Resistance

คำนำ

มะเขือเทศจัดเป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการใช้ประโยชน์ 2 ประเภท คือ เพื่อการบริโภคสด และเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม (กรุง, 2543) อีกทั้งเป็นการปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสมของบริษัทเมล็ดพันธุ์ต่างชาติ (Rosset *et al*., 1999) จากสถิติการปลูกพืชเศรษฐกิจ พ.ศ. 2549 จำแนกตามชนิดพืช ของ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ แสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศทั้งหมด 50,000 ไร่ ผลผลิตทั้งหมด 201,000 ตัน และมีแหล่งผลิตมะเขือเทศแหล่งใหญ่อยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศูนย์สารสนเทศการผลิตทางการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550) แต่การปลูกมะเขือเทศในประเทศไทยประสบปัญหาด้านโรคและแมลงจำนวนมาก โรคที่สำคัญได้แก่ โรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจาก *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) โรคใบด่างเรียวเล็กที่เกิดจาก *Cucumber mosaic virus* (CMV) และโรคใบด่างที่เกิดจาก *Tomato mosaic virus* (ToMV) และ *Tobacco mosaic virus* (TMV) (ธีระ, 2532) และ โรคยอดไหม้ที่เกิดจาก Tospovirus serogroup IV (Pongsapich and Chiemsombat, 2002)

โรคใบด่างเรียวเล็กที่เกิดจาก *Cucumber mosaic virus* หรือ CMV เป็นโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดหนึ่งที่ทำความเสียหายให้กับมะเขือเทศพันธุ์การค้าในแหล่งปลูกที่สำคัญ เชื้อนี้สามารถถ่ายทอดโรคและแพร่ระบาดได้ดีโดยวิธีสัมผัสและโดยอาศัยแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อน (Roossinck, 2001) มะเขือเทศที่เป็นโรค จะแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับกับสีเขียวอ่อนและลดรูป ในต้นที่แสดงอาการโรครุนแรงใบจะมีขนาดเล็กและเรียวยาวเป็นเส้นคล้ายเชือกผูกรองเท้า (ธีระ, 2532) และมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ โดยพบว่ามะเขือเทศที่ปลูกในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบ หลังจากถูกเชื้อไวรัสใบด่างแตงเข้าทำลาย จะมีอาการแคระแกร็นและปริมาณผลผลิตลดลงมากกว่า 1.4 เท่า (สุพัฒน์ และคณะ, 2548)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ในอดีตนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะและการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรค แต่การใช้สารเคมีเป็นจำนวนมากมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้นมีข้อจำกัดที่ใช้เวลานานและแหล่งของความต้านทานมีจำกัด (Agrios, 2005) ต่อมาจึงได้มีการนำเทคนิคพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคการถ่ายยีนให้กับพืช (Plant transformation) มาใช้ในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) ให้มีความต้านทานต่อโรคไวรัสโดยการตัดต่อยีนของไวรัสเข้าไปในโครโมโซมของพืช ส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อไวรัสชนิดนั้นและไวรัสชนิดอื่นที่ใกล้เคียง (สุพัฒน์ และคณะ, 2535) มีการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV ด้วยการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (defective replicase gene) ของเชื้อ CMV เข้าไปในยาสูบแล้วทำให้ยาสูบต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ CMV ได้ (Anderson *et al*., 1992) อัญจนา (2544) ทำการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส CMV เข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์การค้า 2 พันธุ์ คือ สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134-1-2 ด้วยวิธีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีความต้านทานต่อเชื้อ CMV

อย่างไรก็ตาม มีรายงานที่พบว่าการแสดงออกของ transgene ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมมักจะหายไปในพืชรุ่นหลังๆ ตัวอย่างเช่น ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีความต้านทานสูงมากต่อเชื้อ *Pea early browning virus* ในรุ่น R_2 และ R_3 แต่ความต้านทานกลับหายไปในรุ่น R_4 และ R_5 (Boogaart *et al*., 2001) เช่นเดียวกับ Liu *et al*. (2003) พบว่ายาสูบดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นแรกที่ผ่านการคัดเลือกความต้านทานต่อเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* เมื่อนำมาผสมตัวเองหลายๆ รุ่น เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ต้านทาน จะได้ทั้งสายพันธุ์ที่มีความเสถียรของความต้านทานไปยังรุ่น R_9 ในขณะที่อีกหลายสายพันธุ์ พบว่าการแสดงออกของความต้านทานเริ่มลดลงตั้งแต่รุ่น R_2

เนื่องจากความเสถียรของการแสดงออกของความต้านทานมีความจำเป็นอย่างมากในพืชดัดแปลงพันธุกรรม และเพื่อให้สามารถคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานโรคจากเชื้อ CMV ได้สมบูรณ์ จึงนำต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_0 มาปลูกและผสมตัวเองเพื่อเก็บเมล็ด แล้วนำเมล็ดที่ได้มาปลูกขยายเป็นต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 - R_3 เพื่อตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของ CMV บนโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม ติดตามการกระจายตัวและความคงตัวของยีนบนโครโมโซม ตลอดจนประเมินความต้านทานโรคเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ประเมินความต้านทานของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV)

2. ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของ transgene ไปยังรุ่นลูกในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของมะเขือเทศ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชในสกุล *Lycopersicon* วงศ์ Solanaceae เชื่อว่ามีถิ่นกำเนิดมาจากทวีปอเมริกาใต้ และถูกนำมาปลูกเพื่อบริโภคเป็นครั้งแรกในประเทศเม็กซิโก จากนั้นจึงกระจายไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา สเปน และ ฟิลิปปินส์ มะเขือเทศพันธุ์ที่ปลูกในปัจจุบันเป็นพันธุ์ที่พัฒนามาจากมะเขือเทศพันธุ์ป่า (cherry tomato) ชนิด *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* ที่พบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เพื่อให้มีลักษณะตรงกับความต้องการของผู้บริโภค (Jones, 1999) สำหรับพันธุ์มะเขือเทศที่นิยมปลูกในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ การปลูกเพื่อส่งตลาดสำหรับบริโภคสดและเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม พันธุ์มะเขือเทศที่ส่งโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยที่โรงงานที่รับซื้อผลผลิตเป็นผู้จัดหามาให้เกษตรกร สำหรับพันธุ์มะเขือเทศที่ปลูกเพื่อบริโภคสดส่วนใหญ่พัฒนาและส่งเสริมแก่เกษตรกรโดยศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีลักษณะผลเล็ก สีชมพู ได้แก่ พันธุ์สีดาทิพย์ 1 สีดาทิพย์ 2 และสีดาทิพย์ 3 ซึ่งเป็นพันธุ์แท้ และมะเขือเทศลูกผสมสีดาทิพย์ 92 (กรุง, 2543) การปลูกมะเขือเทศเพื่อบริโภคสด มีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และนครพนม ส่วนมะเขือเทศที่ปลูกส่งโรงงานอุตสาหกรรม มีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในจังหวัดหนองคาย นครพนม และเชียงราย เป็นต้น (ศูนย์สารสนเทศการผลิตทางการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550)

ลักษณะการเจริญเติบโตของมะเขือเทศแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ แบบเลื้อย สามารถเจริญเติบโตสูงขึ้นเรื่อย ๆ ไม่มีสิ้นสุด แบบพุ่ม ที่เมื่อตายอดเกิดช่อดอกแล้วจะหยุดการเจริญเติบโต และแบบกึ่งเลื้อยที่แม้ว่าตายอดเกิดช่อดอกแล้วก็สามารถสร้างกิ่งแขนงที่ข้อใต้ช่อดอกเจริญเติบโตต่อไปได้ (กรุง, 2543) ดอกมะเขือเทศเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วยส่วนของเกสรตัวเมีย คือ รังไข่ (ovary) ก้านชูเกสรตัวเมีย (style) ส่วนเกสรตัวผู้ประกอบด้วยอับละอองเกสรตัวผู้ (anther) 5-10 อัน ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย เรียกว่า anther cap หรือ anther cone ซึ่งอยู่ล้อมรอบส่วนของเกสรตัวเมีย โดยปกติก้านชูเกสรตัวเมียสั้นกว่าอับละอองเกสรตัวผู้ ดังนั้นเมื่อละอองเกสรตัวผู้พร้อมที่จะผสมเกสร จะฟุ้งกระจายอยู่ภายใน anther cap และตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย (จานุลักษณ์, 2535) ทำให้มีการผสมตัวเองสูงประมาณ 98% (มณีฉัตร, 2538)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มะเขือเทศสีดาทิพย์ 3

เป็นพันธุ์มะเขือเทศที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศสีดาทิพย์ 1 (ที่ได้มาจากคู่ผสมที่ 26 ของคู่ผสมพันธุ์ Cl 1131-0-0-13-0-6 มีลักษณะดีเด่นคือทนร้อนกับพันธุ์สีดาที่มีผลสีชมพู รูปไข่ เป็นที่ต้องการของตลาด แต่ไม่ทนร้อน) ที่มีลักษณะทนร้อนได้ดี ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์สีดา แต่สีผลสุกเป็นสีชมพูอมส้ม ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด จึงทำการผสมกลับไปหาพันธุ์สีดา แล้วทำการคัดเลือกจนได้เป็นพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่มีผลสีชมพู รูปไข่ และทนร้อนได้ดี (กรุง, 2537)

ลักษณะประจำพันธุ์ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นมะเขือเทศพันธุ์แท้ มีการเจริญเติบโตแบบกึ่งเลื้อย ทนร้อนได้ดีมาก ผลรูปไข่ มีสีชมพู ผลไม่แตก น้ำหนักเฉลี่ยต่อผล 22 กรัม (กรุง, 2543)

โรคใบด่างเรียวเล็กที่เกิดจากเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV)

โรคใบด่างเรียวเล็กที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) พบระบาดและทำความเสียหายให้กับมะเขือเทศที่ปลูกเป็นการค้า โดยเฉพาะมะเขือเทศพันธุ์สีดา พันธุ์ L22 และพันธุ์ VF 145 พบแพร่ระบาดในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เป็นแหล่งปลูกขนาดใหญ่ เช่น เชียงใหม่ ลำปาง และหนองคาย เป็นต้น มะเขือเทศที่ปลูกเป็นการค้าโดยทั่วไปเมื่อถูก CMV เข้าทำลาย จะแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบลดขนาดกว่าปกติ ถ้าพืชแสดงอาการรุนแรง ใบมะเขือเทศจะมีลักษณะเรียวยาวเป็นเส้นเหลือแต่เส้นใบ มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายหรือเชือกผูกรองเท้า เรียกอาการแบบนี้ว่า fern leaf หรือ shoe string (ธีระ, 2532) เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์ช่อดอกที่ได้จะมีขนาดเล็ก กลีบดอกลดขนาดลง ดอกร่วงหรือติดอยู่กับช่อดอกเพียง 1-2 ดอก (สุพัฒน์ และคณะ, 2548) ต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการใบเรียวเล็กนี้จะไม่ติดผล หรือผลมีขนาดเล็ก (ศุภลักษณ์, 2536) และมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ ต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่ปลูกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองแบบระเหยน้ำ หลังจากถูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เข้าทำลาย จะแสดงอาการแคระแกร็นและปริมาณผลผลิตลดลงมากกว่า 1.4 เท่า และมีน้ำหนักผลต่อต้นลดลงมากกว่า 2.4 เท่า (สุพัฒน์ และคณะ, 2548) เชื้อไวรัสชนิดนี้มีรายงานว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านเมล็ดมะเขือเทศได้ในอัตราที่ต่ำ (Cerkauskas, 2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Cucumber mosaic virus (CMV) จัดอยู่ในสกุล (Genus) *Cucumovirus* วงศ์ (Family) *Bromoviridae* (Gallitelli, 2000; Roossinck, 2001; ICTVdB Management, 2006) สามารถพบได้ทั่วโลก มีพืชอาศัยมากถึง 1000 ชนิดใน 85 วงศ์ (Roossinck, 2001) เช่น พืชในวงศ์ Amaranthaceae, Apocynaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Leguminosae-Papilionoideae, Malvaceae, Phytolaccaceae, Polygonaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Tetragoniaceae, Tropaeolaceae และ Umbelliferae เป็นต้น (ICTVdB Management, 2006) พืชอาศัยจะแสดงอาการแบบรอยแผลเฉพาะแห่ง (local lesions) และอาการแพร่กระจายไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช (systemic infection) (ธีระ, 2532) เชื้อ CMV สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกล (mechanical inoculation) โดยอาศัยแมลงพาหะ (insect transmission) คือ เพลี้ยอ่อน มากกว่า 60 ชนิด เช่น *Acyrthosiphon pisum, Aphis craccivora* และ *Myzus persicae* ซึ่งจะถ่ายทอดในลักษณะ non-persistent ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (seed transmission) ในพืช 19 ชนิด (ICTVdB Management, 2006) และถ่ายทอดผ่านทางต้นฝอยทอง (dodder transmission) (Roossinck, 2001)

เชื้อ CMV สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ subgroup I และ II ซึ่ง subgroup I ประกอบด้วยกลุ่มย่อยอีก 2 กลุ่มคือ subgroup IA และ IB subgroup IA เช่น สายพันธุ์ Fny, Sny, 117F, M, E5, D8, O, L, Y, N, CS, KM, SO, Pepo, Kor, MY17 และ Mf subgroup IB เช่น สายพันธุ์ Ly2, HL, M48, SD, K, As, PE, B2, IA, Ix, NT9, T-fn และ C7-2 ส่วน subgroup II เช่น สายพันธุ์ S, Trk7, Ly, Ls, Kin, Q, M2, R, Xb, GT และ Ta-8 (Masuta *et al*., 2002; Nunome *et al*., 2002; Roossinck, 2002) โดยที่ subgroup IB จะพบแต่ในแถบเอเชีย ในขณะที่ subgroup IA และ subgroup II พบแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก (Roossinck, 2001) แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในด้านของพืชอาศัย อาการของโรค และความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะ (Gallitelli, 2000)

เชื้อ CMV มีอนุภาครูปทรงกลม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 29 นาโนเมตร ไม่มี envelope ห่อหุ้ม ประกอบด้วย กรดนิวคลิอิก 18 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 82 เปอร์เซ็นต์ มีจีโนมเป็นแบบแยกส่วน (multipartite) ประกอบด้วย RNA สายเดี่ยวแบบ sense (+) จำนวน 3 ชิ้น คือ RNA1, RNA2 และ RNA3 ขนาด 3389, 3035 และ 2197 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ซึ่ง RNA ทั้ง 3 ชิ้น เมื่อประกอบเป็นอนุภาค จะอยู่ชิ้นละอนุภาคได้เป็น 3 อนุภาคที่มีขนาดแตกต่างกัน เมื่อเซลล์พืชที่ถูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อ CMV เข้าทำลาย RNA3 จะสร้าง subgenomic RNA หรือ RNA4 ที่มีขนาด 1027 นิวคลีโอไทด์ (ICTVdB Management, 2006) RNA ทั้ง 3 ชิ้น แปลรหัสให้โปรตีน 5 ชนิด (Roossinck, 2001) ได้แก่ โปรตีน 1a และ 2a ขนาด 110 และ 98 กิโลดาลตัน ที่ได้จาก RNA ขนาดใหญ่ 2 ชิ้นคือ RNA1 และ RNA2 ตามลำดับ เป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการเพิ่มปริมาณของไวรัส (Gallitelli, 2000) ส่วน RNA3 แปลรหัสให้โปรตีน 3a ขนาด 30 กิโลดาลตัน และ capsid protein ขนาด 24 กิโลดาลตัน ที่ได้จาก RNA4 โปรตีนทั้งสองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของไวรัสภายในต้นพืชและการห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ตามลำดับ (Roossinck, 2001)

การควบคุมป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส

วิธีการที่นิยมใช้ในการควบคุมป้องกันกำจัดโรค คือ การใช้พันธุ์ต้านทานต่อเชื้อไวรัสซึ่งเป็นวิธีการที่ดีที่สุด ค่าใช้จ่ายต่ำสุด ปลอดภัย และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม แต่มีข้อจำกัดที่ใช้เวลานานในการพัฒนาพันธุ์ต้านทาน และแหล่งของความต้านทานมีอยู่อย่างจำกัด (Agrios, 2005) อีกทั้งในปัจจุบันยังไม่มีพันธุ์มะเขือเทศที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV (Cornell Plant Pathology Vegetable Disease Web Page, 2006) ทำให้ไม่มีแหล่งของเชื้อพันธุกรรมที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อเชื้อ CMV ได้ การใช้เมล็ดพันธุ์ หัว หรือท่อนพันธุ์ที่ปลอดโรค (Agrios, 2005) การทำลายต้นพืชที่เป็นโรคเพื่อไม่ให้เป็นแหล่งของเชื้อไวรัส การใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะที่นำเชื้อมาสู่ต้นพืช แต่ไม่ใช่วิธีการที่ได้ผลดีเพราะแมลงพาหะมักมาจากนอกพื้นที่เพาะปลูก และสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสในระยะเวลาสั้น ๆ เช่น เพลี้ยอ่อนที่ใช้เวลาเพียง 5-10 วินาที (Blancard *et al*., 1994) อีกทั้งการใช้สารเคมีเป็นจำนวนมากเป็นการทำลายสิ่งแวดล้อม และยังไม่มีสารเคมีชนิดใดที่สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้ (Agrios, 2005)

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม

Abel *et al*. (1986) ประสบความสำเร็จในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคไวรัสเป็นครั้งแรก โดยการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ของเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) เข้าไปในต้นยาสูบแล้วทำให้ต้นยาสูบที่ได้ต้านทานต่อเชื้อ TMV แสดงให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนของไวรัสสามารถนำมาถ่ายให้กับพืชแล้วทำให้พืชต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้นได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุพัฒน์ และคณะ (2535) ถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคให้กับมะเขือเทศได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียในการชักนำยีนควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ของเชื้อไวรัส TYLCV เข้าสู่ใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์ VF134-1-2 เพื่อสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง พบว่าเนื้อเยื่อมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin 100 มก./ล. และตรวจพบยีนดังกล่าวในต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ผลิตได้

การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (defective replicase gene) ของ CMV และกลไกการสร้างความต้านทาน

Anderson *et al*. (1992) ศึกษาพบว่าการใช้ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (defective replicase gene) ของ CMV สามารถทำให้ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนดังกล่าวมีความต้านทานต่อ CMV โดยนำยีนบน RNA-2 ที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน replicase (replicase gene) ของ CMV Subgroup I สายพันธุ์ Fny (Roossinck and Palukaitis, 1990) มาตัดนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1857-1950 รวม 94 คู่เบสออก ทำให้เกิดการขยับลำดับการแปลรหัส (frameshift) และเกิดมี stop codon ขึ้นภายในยีน ทำให้โปรตีนที่ได้จากยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์นี้ มีความยาวประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนดั้งเดิม หลังจากถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์เข้าไปในยาสูบ *N. tabacum* cv. Turkish Samsun NN แล้วพบว่ายาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมด 18 ต้น มีอยู่ 7 ต้น ที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของ CMV เมื่อทำให้ต้นยาสูบเหล่านี้ผสมตัวเอง แล้วเก็บเมล็ดรุ่นลูก R_1 มาทำการทดสอบความต้านทาน พบว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมบางสายพันธุ์สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของ CMV ทั้งอนุภาค ที่ความเข้มข้นสูงถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ RNA ของ CMV ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลไกของความต้านทานนั้นอาจเกิดจากยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ไปยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัส หรือเกิดจากการผลิตเอมไซน์ replicase ที่ผิดปกติไปจากเดิมและในปริมาณมากจนสามารถที่จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ replicase ได้

Wintermantel and Zaitlin (2000) ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของ Fny-CMV โดยสร้างยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มี transgene เป็นแบบที่แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ หรือแปลรหัสไม่ได้ เพื่อศึกษาบทบาทของ transgene mRNA และ/หรือโปรตีนที่สร้างขึ้นจาก transgene ในการสร้างความต้านทานของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าว ผลการปลูกเชื้อทดสอบโดยวิธีกลและการใช้แมลงพาหะ พบว่ามียาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจำนวนมากที่มียีนแบบแปลรหัสเป็นโปรตีนได้แสดงลักษณะต้านทานต่อ CMV โดยเชื้อเข้าทำลายพืชได้ช้าลงและตรวจพบว่าต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยาสูบดังกล่าวมีการสร้างโปรตีน replicase ทั้งแบบที่สมบูรณ์และแบบที่ไม่สมบูรณ์ ในทางกลับกัน ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีโครงสร้างของ transgene เป็นแบบที่ไม่แปลรหัสมีเพียง 1 ใน 61 สายพันธุ์เท่านั้นที่แสดงความต้านทานโรค เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดของยีน ปริมาณของ mRNA และ โปรตีนที่สร้างจาก transgene ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรรมที่ต้านทานโรคระดับต่างๆ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชุดของ transgene กับระดับความต้านทานโรค ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค ตรวจพบ mRNA ในระดับต่ำมาก แต่มี steady-state transgene mRNA มากกว่าในสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความต้านทานที่เกิดขึ้นไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของโปรตีนที่สร้างขึ้นจาก transgene ความต้านทานโรคที่เกิดขึ้นจากการใช้ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ อาจเป็นผลของกลไกอันซับซ้อนที่เกี่ยวข้องกับ transgene mRNA และโปรตีนที่สร้างขึ้น โดยอาจต่างช่วยกันส่งเสริมให้เกิดความต้านทาน

อัญจนา (2544) ทำการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส CMV เข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์การค้า 2 พันธุ์ คือ สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134-1-2 ด้วยวิธีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ภายหลังการถ่ายยีนมีเพียงชิ้นใบของมะเขือเทศพันธุ์วีเอฟ 134-1-2 ที่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกจนเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ได้ เมื่อตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส CMV พบแถบดีเอ็นเอของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ขนาดต่างกันจำนวน 1-2 ชุด ในโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม และทดสอบความต้านทานในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมโดยปลูกเชื้อ CMV ด้วยวิธีกล พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีความต้านทานต่อเชื้อ CMV โดยตรวจพบปริมาณ CMV ในระดับต่ำหรือไม่พบเลย รวมทั้งมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสามารถเจริญเติบโตออกดอกและติดผลภายหลังย้ายปลูกแล้ว 70 วัน ได้เช่นเดียวกับมะเขือเทศที่ไม่ได้ถ่ายยีน

วรพงศ์ (2547) ทำการถ่ายยีนของเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ ยีนเรพลิเคสของเชื้อไวรัส TYLCV กับยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส CMV เข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่บรรจุพลาสมิดพาหะสำหรับถ่ายยีนของแต่ละชนิดไว้ มาถ่ายยีนพร้อมกันในคราวเดียวโดยการบ่มร่วมกับชิ้นใบเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 แล้วนำชิ้นใบมะเขือเทศที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกพบว่าสามารถชักนำเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เมื่อตรวจสอบมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR พบการปรากฏอยู่ของยีนเรพลิเคสของ TYLCV และ CMV ในมะเขือเทศต้นเดียวกัน ยีนเรพลิเคสของ TYLCV ชนิดเดียว และยีนเรพลิเคสของ CMV ชนิดเดียว ในรุ่น R_0 ในอัตรา 32.26% 3.22% และ16.13% ตามลำดับ และตรวจพบยีนเรพลิเคสของ TYLCV และ CMV ในรุ่น R_1 ในอัตรา 13.3% และ16.6% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสามารถถ่ายยีน 2 ยีนเข้าสู่โครโมโซมของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มะเขือเทศได้ในคราวเดียวโดยที่ยีนทั้งสองสามารถดำรงอยู่และถ่ายทอดจากรุ่น R_0 ไปสู่รุ่น R_1 ได้

และมีอีกหลายงานวิจัยที่มีการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ (defective replicaes gene) ของ CMV เพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อเชื้อ CMV ดังที่แสดงในตารางที่ 1 (Morroni *et al*., 2008)

การกระจายตัวของ transgene และการถ่ายทอดความต้านทานไวรัสของพืชดัดแปลงพันธุกรรมไปยังรุ่นลูก

พืชที่เพาะเลี้ยงได้จากการถ่ายยีนแต่ละครั้งจะเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมหนึ่งสายพันธุ์ และจะต้องได้รับการขยายพันธุ์ให้มีจำนวนมากพอที่จะทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการให้เปลี่ยนแปลงไป เช่น ความต้านทานโรค แมลง ความคงทนต่อสภาพแวดล้อม ในกรณีความต้านทานโรคหรือแมลง ยังไม่ควรทดสอบความต้านทานดังกล่าวกับพืชที่เพิ่งได้รับการชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช เนื่องจากการได้รับฮอร์โมนพืชในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืชอาจเกิดความเครียดและแสดงลักษณะที่ไม่ได้มาจากพันธุกรรม (epigenetic effects) นอกจากนั้น การทดสอบความต้านทานโรคกับพืชต้นเดียวหรือมีจำนวนน้อย เมื่อพืชแสดงอาการไม่ต้านทานต่อไวรัสอาจทำให้การวิเคราะห์ผลการทดลองผิดพลาดได้ (Kaniewski and Lawson, 1997)

วิธีการที่ใช้คัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยทั่วไปจะเป็นการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าสู่พืช ลักษณะความต้านทานโรคและแมลง ตลอดจนความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้จำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบยีน selectable marker หรือ screenable marker เพื่อประโยชน์สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Kaniewski and Lawson, 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 แสดงพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสของ CMV (ประกอบด้วย RNA1, RNA2 หรือทั้งคู่)

สายพันธุ์ไวรัส (subgroup) ผู้ให้	พืชทดสอบ	สายพันธุ์ไวรัส (subgroup) ที่ใช้ทดสอบความต้านทาน	Inoculum	ระดับความต้านทาน (%)[ก]
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a[ข]	ยาสูบ	Fny (IA)	Virions 500 µg/ml	0 ถึง 56
			RNA 50 µg/ml	64
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	11 สายพันธุ์ (IA)	น้ำคั้นพืช	100
			Virions $\leq$ 500 µg/ml	100
			RNA 50 µg/ml[ค]	100
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	3 สายพันธุ์ (IB)	น้ำคั้นพืช	0 ถึง 100
			Virions 200 µg/ml	90 ถึง 100
			RNA 200 µg/ml	100
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	4 สายพันธุ์ (II)	น้ำคั้นพืช	0
			Virions $\leq$ 100 µg/ml	0
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	PSV, TAV[ง]	น้ำคั้นพืช	0
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	K (IB)	RNA	0
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	Fny (IA)	RNA	100
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	F1K2F3[จ]	RNA	0 ถึง 13
Y (IA) RNA1	ยาสูบ	Y (I)	Virions $\leq$ 5 µg/ml	0
			RNA 0.5 µg/ml	14
			RNA 200 µg/ml	0
Y (IA) RNA2	ยาสูบ	Y (I)	Virions $\leq$ 5 µg/ml	0
			RNA 0.5 µg/ml	14
			RNA 200 µg/ml	0
Y (IA) RNAs 1 และ 2	ยาสูบ	Y (I)	Virions $\leq$ 5 µg/ml	0 ถึง 40
			RNA 200 µg/ml	0 ถึง 77

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ไวรัส (subgroup) ผู้ให้	พืชทดสอบ	สายพันธุ์ไวรัส (subgroup) ที่ใช้ทดสอบความต้านทาน	Inoculum	ระดับความต้านทาน (%)[ก]
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	มะเขือเทศ	Fny (IA), K (IB)	Virions $\leq$ 1 mg/ml, เพลี้ยอ่อน	100
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	มะเขือเทศ	LS (II)	Virions $\leq$ 1 mg/ml เพลี้ยอ่อน	7 ถึง 67 27 ถึง 71
Fny (IA) RNA1	ยาสูบ	Fny (IA)	Virions 500 µg/ml	50
Fny (IA) RNA1	ยาสูบ	F1F2M3[จ]	น้ำคั้นพืช	0 ถึง 100
Fny (IA) RNA2 with truncated 2a	ยาสูบ	Fny (IA)	น้ำคั้นพืช, Virions 50 µg/ml	ND
Fny (IA) RNA2 with restored 2a	ยาสูบ	Fny (IA)	น้ำคั้นพืช, Virions 50 µg/ml	ND
Fny (IA) RNA2 with nontranslatable 2a	ยาสูบ	Fny (IA)	น้ำคั้นพืช, Virions 50 µg/ml	ND

[ก] เปอร์เซ็นต์ของต้นพืชที่ไม่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายต่อจำนวนต้นพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อทั้งหมด ND คือ ไม่มีข้อมูล

[ข] ข้อมูลแสดงสายพันธุ์ 1-2 และ 1-8 ที่เป็นสายพันธุ์ต้นแบบให้กับรุ่นหลัง (Anderson *et al*., 1992)

[ค] บางสายพันธุ์ปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นพืช หรือ อนุภาคไวรัส หรือ RNA

[ง] *Peanut stunt virus* และ *Tomato aspermy virus*

[จ] Pseudorecombinant ที่ประกอบด้วย RNAs 1 และ 3 จาก Fny-CMV (I) และ RNA2 จาก K-CMV (I)

[ฉ] Pseudorecombinant ที่ประกอบด้วย RNAs 1 และ 2 จาก Fny-CMV (I) และ RNA3 จาก M-CMV (II)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Morroni *et al*. (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรม (genetic analysis) ของการถ่ายทอด transgene และอัตราส่วนของการกระจายตัว (segregation ratios) ของ transgene ที่สอดแทรกในจีโนมพืชของประชากรรุ่นลูกของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ใช้วิธีวิเคราะห์ทางสถิติแบบ chi-square analysis โดยนำเมล็ดจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่นแรก (R_0) ไปปลูกแล้วเก็บเมล็ดรุ่นต่อมา (R_1) เพื่อนำไปวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน อัตราส่วนของการกระจายตัวของยีนในรุ่น R_1 ที่มีอัตราส่วนระหว่างต้นที่มี transgene ต่อ ต้นที่ไม่มี transgene เท่ากับ 3:1 ตามลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของเมนเดล (Mendelian manner) จะถือว่ามีการสอดแทรกของยีนเข้าสู่โครโมโซมพืช 1 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นลักษณะที่ต้องการ ต้น R_1 ที่ผ่านการทดสอบแล้ว จะปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อที่จะเก็บเมล็ดในรุ่น R_1 แล้วนำมาทดสอบการกระจายตัวอีกครั้งหนึ่ง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มียีนที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) (Kaniewski and Lawson, 1997)

ลักษณะความเป็นไปได้ของการกระจายตัวของ transgene ในประชากรรุ่นลูกของพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีดังนี้คือ อัตราส่วนของการกระจายตัวในประชากรรุ่นลูก ที่เกิดจากการผสมตัวเองและผสมกลับ ซึ่งเป็นผลมาจากการสอดแทรกของ transgene 1 ตำแหน่ง จะเท่ากับ 3:1 และ 1:1 ตามลำดับ แต่ถ้าจากการสอดแทรกของ transgene ในจีโนมพืชมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง อัตราส่วนของการกระจายตัวของยีนในประชากรรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมตัวเอง และการผสมกลับของพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะแตกต่างกันไป โดยถ้ามีการสอดแทรกของยีน 2 ตำแหน่ง อัตราส่วนของการกระจายตัวจะเท่ากับ 15:1 และ 3:1 หรือถ้ามีการสอดแทรกของยีน 3 ตำแหน่ง อัตราส่วนของการกระจายตัวจะเท่ากับ 63:1 และ 7:1 หรือถ้ามีการสอดแทรกของยีนถึง 4 ตำแหน่ง อัตราส่วนของการกระจายตัวจะเท่ากับ 255:1 และ 15:1 ตามลำดับ (Topping and Lindsey, 1997) ดังที่แสดงในตารางที่ 2 (Ellis, 1993)

Meixner *et al.* (1995, 1996) ศึกษาการแสดงออกและความเสถียรของการถ่ายทอดยีนในถั่ว *Vicia narbonensis* โดยการถ่ายยีน pGV3850 Hygro ซึ่งมียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน (hygromycin) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โนปาลีน (nopaline) เข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ C58 C1 นำต้นอ่อนที่ได้จากการถ่ายยีนจำนวน 3 ต้นมาตรวจสอบการกระจายตัวของยีนในบริเวณ T-DNA โดยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่ามีการสอดแทรกของยีนเข้าสู่โครโมโซมถั่วเพียง 1 ตำแหน่ง จากนั้นนำต้นอ่อนไปทาบส่วนบนของต้นถั่วปกติเพื่อให้ได้ปีนต้นที่สมบูรณ์ แต่ละต้นให้มีการผสมตัวเองแล้วเก็บเมล็ดนำไปปลูกในเรือนกระจก (greenhouse) ประชากรรุ่นลูกรุ่นที่ 1 (R_1) นำไปทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน โดยนำส่วนของใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน และทดสอบ nopaline assay พบว่ามี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อัตราส่วนของการกระจายตัวของยีนเท่ากับ 3:1 จากนั้นตรวจดูการคงอยู่และการถ่ายทอดยีนทั้ง 2 ชนิดไปยังประชากรรุ่นลูกจนถึงรุ่นที่ 4 (R_4) พบว่าในประชากรรุ่นลูกตั้งแต่รุ่นที่ 2 (R_2) เป็นต้นไปมีการกระจายตัวของยีนเป็นทั้งแบบ homozygous และ hemizygous สรุปว่าการคงอยู่และการกระจายตัวของยีนไปสู่ประชากรรุ่นลูกเป็นไปตามกฎของเมนเดล อย่างไรก็ตาม ยังมีประชากรรุ่นลูกบางส่วนที่ไม่มีการคงตัวของยีนและมีกระจายตัวของยีนไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล ซึ่งมักพบลักษณะเช่นนี้ในประชากรรุ่นลูกที่มีการกระจายตัวเป็นแบบ hemizygous

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของการกระจายตัวของ transgene ที่มีการสอดแทรกของยีน 1 ถึง 4 ตำแหน่ง

จำนวนการสอดแทรกของยีน	อัตราส่วนของการกระจายตัวของยีน	
	ผสมข้าม	ผสมตัวเอง
1	1:1	3:1
2	3:1	15:1
3	7:1	63:1
4	15:1	255:1

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ellis (1993)

Piamjit (2000) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปยังรุ่นลูก ในมะเขือเทศสีดาดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย B17, B18, B20 และ E10 และมะเขือเทศ TN#3 ดัดแปลงพันธุกรรมจำนวน 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วย TN#3-1 และ TN#3-2 ที่ได้รับการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (ยีน TYLCV-CP) ของเชื้อไวรัส TYLCV และยีนต้านยาปฏิชีวนะ Kanamysin (ยีน *nptII*) เข้าสู่พืชโดยอะโกรแบคทีเรีย นำทั้ง 6 สายพันธุ์มาวิเคราะห์ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Kanamysin ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อทดสอบการกระจายตัวของยีน *nptII* ด้วยเทคนิค Kanamysin resistance assay พบว่ายีน *nptII* มีการถ่ายทอดและการกระจายตัวเป็นไปตามกฎของเมนเดลในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ในสายพันธุ์ TN#3-1 และ TN#3-2 แต่ไม่ถ่ายทอดในสายพันธุ์ B17, B18, B20 และ E10 เมื่อนำสายพันธุ์ B17, B18, B20 และ E10 มาตรวจสอบยีน TYLCV-CP ด้วยเทคนิค PCR แสดงให้เห็นว่ายีน TYLCV-CP มีการถ่ายทอดในทุกสายพันธุ์ มีสายพันธุ์ B17, B18 และ E10 ที่มีการกระจายตัวของยีนในอัตราส่วน 3:1 เป็นไปตามกฎของเมนเดล และสายพันธุ์ B20 มีอัตราส่วนของการกระจายตัวของยีนไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ <3:1 การที่ยีน TYLCV-CP ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

R_1 มีการกระจายตัวในอัตราส่วนเท่ากับ 3:1 แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนเข้าสู่โครโมโซมพืช 1 ตำแหน่ง

สุภาภรณ์ (2544) ศึกษาและคัดเลือกพริกบางช้าง (C. *annuum* L.), CA 365 ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเส้นใบด่างประของพริก (ยีน CVbMV-CP) ของเชื้อไวรัส CVbMV สายพันธุ์กำแพงแสน ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พริกบางช้างดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ที่เก็บเมล็ดจากพริกดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_0 ที่ผ่านการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CP ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ มาปลูกเชื้อไวรัส CVbMV ด้วยวิธีกล เพื่อทดสอบความต้านทาน พบว่ามีพริกดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 จำนวน 497 ต้น จากทั้งหมด 1,992 ต้น ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส เมื่อนำมาวิเคราะห์การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโดยวิธี chi-square test (χ^2-test) พบว่ามีเพียง 9 สายพันธุ์ที่มีลักษณะความต้านทานโรคเป็นอัตราส่วน 3:1 ตามกฎของเมนเดล และไม่พบพริกบางช้างดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ใดที่มีอัตราส่วนดังกล่าวเป็น 15:1 ทำการคัดเลือกพริกบางช้างดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 สายพันธุ์ #161 มาศึกษาความต้านทานต่อในรุ่น R_2 เช่นเดียวกับในรุ่น R_1 พบว่ามีอัตราส่วนต้นต้านทานโรคในสัดส่วนแตกต่างกัน รวมทั้งพบว่า R_2 สายพันธุ์ #161-1/5-3, 161-1/13-3, 161-1/13-4, 161-1/13-5 และ 161-1/14-3 มีอัตราส่วนต้นต้านทานโรค 30:0 หรือ 100 เปอร์เซ็นต์

Boogaart *et al.* (2001) พัฒนาต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *Pea early browning virus* (PEBV) โดยถ่ายยีนเรพลิเคส (replicase gene) บริเวณนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 4,013-5,425 ที่สามารถแปลรหัสให้โปรตีนขนาด 54 kDa ของเชื้อไวรัส PEBV เข้าไปในต้นยาสูบ ได้ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีจำนวนชุดยีนหลายชุดในโครโมโซมพืชซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 loci คือ loci A และ B เมื่อตรวจสอบยีนเรพลิเคส ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ PEBV และตรวจสอบการแปลรหัส (transcript) ของยีนเรพลิเคส พบว่ายีนเรพลิเคสที่อยู่บน loci B จำเป็นในการชักนำให้เกิดความต้านทานให้กับพืช โดยความต้านทานที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับปริมาณ RNA หลังจากปลูกเชื้อโดยใช้ recombinant *Potato virus* X ที่แปลรหัสให้โปรตีนขนาด 54 kDa ของ PEBV ทำให้ทราบว่าความต้านทานที่เกิดขึ้นเป็นแบบ post-transcriptional gene silencing และเมื่อทดสอบความต้านทานไปยังรุ่นลูก พบว่ามีความต้านทานสูงมากในรุ่น R_2 และ R_3 แต่ความต้านทานกลับหายไปในรุ่น R_4 และ R_5 แสดงให้เห็นว่าความต้านทานที่ได้ไม่คงทนในพืชดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นหลัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nunome *et al.* (2002) ทำการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่อยู่บน RNA-2 ของเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ GT ที่อยู่ใน Subgroup II เข้าสู่มะเขือเทศสายพันธุ์ Shugyoku โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์จะไม่มีส่วน GDD amino acid motif และ NTP binding motif ที่ด้าน C-terminal ซึ่ง motif นี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการกระตุ้นและเป็นที่จดจำของเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ได้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้งหมด 137 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์นำมาประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV สายพันธุ์ Ta-8 ที่อยู่ใน Subgroup II เช่นเดียวกับสายพันธุ์ GT พบว่ามี 15 สายพันธุ์ใน 137 สายพันธุ์ หรือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีความต้านทานสูง และอีก 90 เปอร์เซ็นต์ มีความต้านทานปานกลางหรืออ่อนแอต่อเชื้อ CMV นำต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีความต้านทานสูง 15 สายพันธุ์ มาตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสโดยการปลูกเชื้อลงบนต้น *Chenopodium amaranticolor* พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ที่ไม่แสดงการสะสมของเชื้อ CMV ทั้งจากใบที่ได้รับและไม่ได้รับการปลูกเชื้อ คัดเลือก 6 สายพันธุ์มาวิเคราะห์การถ่ายทอด transgene และลักษณะความต้านทานต่อเชื้อ CMV ในรุ่น T_1 ด้วยวิธี χ^2-test พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่มีการกระจายตัวของ transgene ในอัตราส่วน 3:1 ตามทฤษฎีของเมนเดล ดังนั้นมีการสอดแทรกของ transgene 1 ตำแหน่ง ในขณะที่อีก 2 สายพันธุ์ มีการกระจายตัวของ transgene ในอัตราส่วนที่ต่างออกไป อันเกิดจากการสอดแทรกของ transgene มากกว่า 1 ตำแหน่งในโครโมโซมมะเขือเทศ ส่วนลักษณะความต้านทานต่อเชื้อ CMV พบว่ามี 4 สายพันธุ์ใน 9 สายพันธุ์ ที่มีอัตราส่วนของลักษณะความต้านทานเป็นไปตามค่าคาดหมายคือ 3:1 จากผลการทดลองสามารถสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อเชื้อ CMV สายพันธุ์ Ta-8 โดยที่ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์สามารถคงอยู่และถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้

Liu *et al.* (2003) ทำการถ่ายยีน nucleocapsid gene ของเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) isolate Hawaiian L เข้าไปในต้นยาสูบโดยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งชิ้นส่วนใบที่ใช้ในการถ่ายยีนจะมีโครโมโซมแบบ haploid จากนั้นนำแคลลัสที่ได้จากคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Kanamysin เข้มข้น 100 mg/l มาชักนำให้เป็นต้นยาสูบรุ่น R_0 เพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ TSWV isolate Hawaiian L นำต้นยาสูบรุ่น R_0 ที่แสดงความต้านทานสูงมาทำการเพิ่มปริมาณโครโมโซมเป็น 2 เท่า ได้เป็นต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นR_0 ที่มีโครโมโซมแบบ Doubled-haploid (DH- R_0) จากนั้นนำมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสและคัดเลือกต้นที่มีความต้านทานสูงมาปลูกให้เจริญเติบโตเพื่อให้ยาสูบมีการผสมตัวเองได้เมล็ดรุ่น R_1 นำต้นยาสูบรุ่น R_1 ของแต่ละสายพันธุ์มาอย่างละ 6 ต้น มาทดสอบความต้านทานต่อ isolate Hawaiian L และ isolate อื่นที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงอีก 4 isolate พบว่ามีหลายสายพันธุ์ที่แสดงระดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

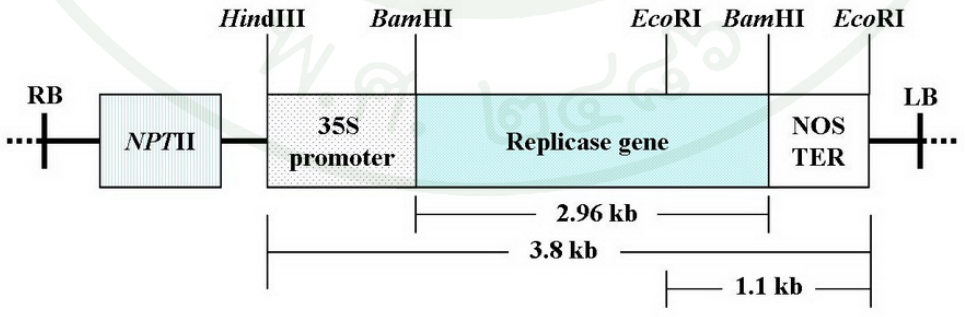
ความต้านทานสูงมากและไม่แสดงอาการหลังการปลูกเชื้อ และมีการสะสม RNA และโปรตีนในระดับต่ำ ในสายพันธุ์ที่แสดงระดับความต้านทานสูง พบว่ามีความต้านทานสูงต่อเชื้อ TSWV อีกหลาย isolate ส่วนสายพันธุ์ที่แสดงระดับความต้านทานต่อเชื้อ TSWV isolate Hawaiian L ปานกลาง จะอ่อนแอต่อ TSWV isolate อื่น ๆ เมื่อนำสายพันธุ์ที่ต้านทานสูงมาทดสอบในรุ่นลูกโดยการผสมตัวเอง พบว่ายาสูบดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นแรกที่ผ่านการคัดเลือกความต้านทานต่อเชื้อ TSWV เมื่อนำมาผสมตัวเองหลายๆ รุ่น เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ต้านทาน จะได้ทั้งสายพันธุ์ที่มีความเสถียรของความต้านทานไปถึงรุ่น R_9 ในขณะที่อีกหลายสายพันธุ์การแสดงออกของความต้านทานลดลงตั้งแต่รุ่น R_2 แสดงว่าความต้านทานที่ได้ไม่มีความเสถียร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ที่ใช้ทดลอง เป็นเมล็ดมะเขือเทศสีดาทิพย์ 3 ที่ได้รับยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อ CMV ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ L-1 L-6-3 L-13 L-25 และ L-29-3 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (วรพงศ์, 2547) มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้เกิดจากการนำพลาสมิดสายผสม pCMV N/B-23 ขนาด 13.8 กิโลเบส ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. M. Zaitlin, Cornell University, U.S.A. ที่ประกอบด้วยพลาสมิด pROK2 ซึ่งเป็น plant vector ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส และ cDNA ของยีนเรพลิเคส (replicase gene) ของ CMV ขนาด 2,962 คู่เบส cDNA ของยีนดังกล่าวได้จากการนำ cDNA ของ RNA-2 หรือยีนเรพลิเคสที่สมบูรณ์ขนาด 3,050 คู่เบส มาย่อยนิวคลีโอไทด์ออก 94 คู่เบส จากตำแหน่งที่ 1,857 ถึง 1,950 และเพิ่ม start codon (AUG) บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -4 ด้านปลาย 5′ ของยีนเรพลิเคสที่สมบูรณ์ ทำให้ได้ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ หรือ defective replicase gene ตัดดีเอ็นเอส่วนนี้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 และเชื่อมต่อเข้าไปในพลาสมิด pROK2 plant vector ตรงบริเวณที่ขนาบข้างด้วย CaMV 35S promoter และ nopaline synthase terminator (nos terminator) ยีนคัดเลือก (selectable marker) บนพลาสมิด pCMV N/B-23 คือยีน neomycin phosphotransferase II (*npt*II) ควบคุมการทำงานโดยใช้ CaMV 35S promoter และ nos terminator (ภาพที่ 1) มาบรรจุเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AgL1 โดยวิธี electroporation แล้วนำอะโกรแบคทีเรียที่ได้มาเพิ่มปริมาณเพื่อถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศสีดาทิพย์ 3



ภาพที่ 1 แผนที่พลาสมิดสายผสม pCMV N/B-23 ขนาด 13.8 กิโลเบส ที่ใช้สำหรับถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของ CMV ให้กับมะเขือเทศ แสดงโครงสร้างของ Chimeric construct ของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ใน plant vector pROK2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเตรียมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2- R_3

มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 เตรียมจากการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ CMV และตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์สอดแทรกอยู่บนโครโมโซม นำมาปลูกให้เจริญเติบโตในโรงเรือนปลูกพืชทดลองแบบระเหยน้ำ (evaporative greenhouse) ที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส ปล่อยให้มะเขือเทศรุ่น R_1 มีการผสมตัวเอง แล้วเก็บผลมะเขือเทศที่สุกแดงทั้งหมดใน 1 ต้น เมื่อต้นมะเขือเทศมีอายุ 70 วันหลังจากการปลูกเชื้อ ใช้มีดผ่าผลมะเขือเทศแยกเมล็ดออกมาใส่ในถุงพลาสติกหมักเมล็ดไว้ 1 คืน จากนั้นนำเมล็ดที่หมักไว้ไปล้างน้ำผ่านตะแกรงขนาดเล็กจนไม่มีเนื้อติดอยู่กับเมล็ด นำเมล็ดมาผึ่งลมให้แห้งประมาณ 3-5 วัน เมื่อเมล็ดแห้งดีแล้วนำมาใส่ในถุงพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเมล็ดที่ได้จากผลมะเขือเทศทั้งหมดใน 1 สายพันธุ์มารวมกันเป็นประชากรของมะเขือเทศสายพันธุ์นั้นๆ นำเมล็ดแห้งจากแต่ละสายพันธุ์มาเพาะในดินผสมอบฆ่าเชื้อที่ประกอบด้วย ดินร่วน 1 ส่วน ผสมทราย 1 ส่วน และขี้เถ้าแกลบ 1 ส่วน โดยเพาะเมล็ด 100 เมล็ดจาก 1 สายพันธุ์ ในกระบะเพาะกล้าหลุมละ 1 เมล็ด เมื่อต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ จึงนำมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ CMV และวิเคราะห์คุณสมบัติอื่นๆ เตรียมต้นกล้าเพื่อทำการตรวจสอบและคัดเลือกในลักษณะเดียวกันนี้ในมะเขือเทศรุ่น R_2 และ R_3

3. การปลูกเชื้อ CMV ให้กับมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1- R_3 เพื่อทดสอบความต้านไวรัส

CMV สายพันธุ์ 30RS ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และโพลีโคนอลแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัสได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. รัชนี ฮงประยูร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เตรียมน้ำคั้นสำหรับปลูกเชื้อโดยใช้ใบมะเขือเทศที่ได้รับเชื้อ CMV เป็นแหล่งไวรัส บดใบมะเขือเทศ 1 กรัม กับ 0.1 M phosphate buffer pH, 7.0 ที่เติม 0.2% mercaptoethanol กรองแยกเฉพาะส่วนน้ำคั้น จากนั้นผสมผงซีไลท์ (celite) อัตรา 1% กวนให้เข้ากัน ทาน้ำคั้นลงบนใบของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 10 วัน ย้ายต้นกล้าจากกระบะเพาะเมล็ดลงปลูกในกระถางขนาด 6 นิ้ว ปลูกพืชกระถางละ 1 ต้น เก็บต้นพืชที่ปลูกเชื้อแล้วในโรงเรือนปลูกพืชทดลองแบบระเหยน้ำ (evaporative greenhouse)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในใบพืชดัดแปลงพันธุกรรมภายหลังการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค ELISA

เก็บตัวอย่างใบพืชภายหลังการปลูกเชื้อ 20 วัน มาตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในใบพืชด้วยเทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ดัดแปลงจากวิธีการที่รายงานโดย Clark และ Adam (1977) เตรียม sample extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย coating buffer (ภาคผนวก ข) ที่เติม 0.2% Na.DIECA บดใบยาสูบใน sample extraction buffer อัตราส่วน 1:2 ของน้ำหนักต่อปริมาตร ใส่น้ำคั้นพืชที่ได้ลงในแต่ละหลุมของ microwell plate ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1.30 ชั่วโมง เทน้ำคั้นออกแล้วล้างหลุมด้วย PBST (ภาคผนวก ข) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติม anti-CMV PAb ที่เจือจางใน blocking buffer (ภาคผนวก ข) อัตราส่วน 1:1,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดี้ชนิดที่ 2 คือ goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase ที่เจือจางใน PBS (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:10,000 หลุมละ 50ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1.30 ชั่วโมง เทแอนติซีรัมออกแล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เตรียม substrate solution ทันทีก่อนใช้ โดยละลาย *p*-nitrophenyl phosphate เข้มข้น 1 มก./มล. ใน substrate buffer (ภาคผนวก ข) ใส่ในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 3 N NaOH ปริมาตร 50ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ($O.D._{405}$)

5. การสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของมะเขือเทศ (genomic DNA)

สกัด genomic DNA (chromosomal DNA) จากใบมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน และจากต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Fulton *et al*. (1995) เตรียม extraction buffer โดยผสม CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl) กับ 0.8% Na_2SO_3 ตัดใบยอดของมะเขือเทศมา 1-2 ใบ ชั่งน้ำหนักประมาณ 50-100 มก. ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. ใส่ extraction buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองและบดใบพืชให้ละเอียดมากที่สุด เติม extraction buffer อีก 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จนครบ 1.5 มล. ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับหัว-ท้ายประมาณ 200 ครั้ง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบน (ประมาณ 400 ไมโครลิตร) ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมโดยพลิกหลอดกลับหัว-ท้ายจนกว่าดีเอ็นเอจะตกตะกอนให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เห็น หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเท isopropanol ออก ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เท 70% ethanol ออก ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง และละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ได้นานที่ -20 องศาเซลเซียส

6. การตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมะเขือเทศในข้อที่ 5. มาเป็นต้นแบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของพลาสมิด pCMV N/B-23 (Carr *et al*., 1994) คือ RepCMV-F (5'-TATCGGATCCATGGCTTTCCCTGCCC-3') และ RepCMV-R (5'-ACGAGGATCCTCAGACTGGGTAAC-3') ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9.0, 15mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100) 10 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 0.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.8 มิลลิโมลาร์, RepCMV-F primer และ RepCMV-R primer อย่างละ 0.3 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase 2.5 Units เติมดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ อุณหภูมิที่ใช้สำหรับ denature, annealing และ extension คือ 94, 60 และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลาขั้นตอนละ 1, 1 และ 2 นาที ตามลำดับ เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดลง นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจดูขนาดดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

7. การตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค Genomic Southern hybridization

นำ genomic DNA จากมะเขือเทศที่เตรียมได้จากข้อ 5. มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ซึ่งจะย่อยลำดับเบสภายในของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และบริเวณปลายด้าน 3’ ของ nos terminator ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ภาพที่ 1) โดยปฏิกิริยาย่อยดีเอ็นเอของมะเขือเทศด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะประกอบด้วย genomic DNA 5-10 ไมโครกรัม 10x *Eco*RI buffer 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Eco*RI 20 units และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ 50 โวลท์ ย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจดูดีเอ็นเอที่ย่อยแล้วด้วยแสง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุลตราไวโอเลต ตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่ได้จากการย่อยดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Southern hybridization โดยแช่แผ่นเจลในสารละลาย 0.25M HCl เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว ปรับดีเอ็นเอสู่สภาพเป็นกลางโดยแช่ในสารละลาย 0.4N NaOH เป็นเวลา 20 นาที ย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นไนลอนโดยใช้สารละลาย 0.4N NaOH เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้น แยกแผ่นไนลอนมาล้างด้วยสารละลาย 2x SSC เป็นเวลา 10 นาที แล้วผึ่งพอหมาดบนกระดาษกรอง นำแผ่นไนลอนไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ replicase gene probe ที่ติดฉลากโดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) นำตัวตรวจมาทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอจากโครโมโซมที่เตรียมไว้บนแผ่นไนลอน ตรวจผลไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence detection โดยใช้สับสเตรท CDP star™ (Boehringer Mannheim) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

8. การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ CMV

การประเมินความต้านทานต่อไวรัสทำภายหลังการปลูกเชื้อ CMV 20 วัน โดยการสังเกตอาการบนใบพืช มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ต้านทานต่อไวรัสจะแสดงอาการใบด่าง ลดรูปและบิดเบี้ยวจนถึงมีลักษณะเป็นเส้นเรียวยาว ลำต้นแคระแกร็น เช่นเดียวกับในมะเขือเทศปกติที่เป็นโรค ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานโรค จะไม่แสดงอาการดังกล่าวเช่นเดียวกับในมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ CMV ยืนยันผลโดยการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส CMV ด้วยเทคนิค ELISA โดยกำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นบวกคือ ค่า $O.D._{405}$ ที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จากพืชปกติ (negative control) 2 เท่า (Jianxiang and Zhou, 2004) ทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งเมื่อมะเขือเทศมีอายุ 40 วันภายหลังการปลูกเชื้อ

9. การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

ทดสอบทางสถิติโดยวิธี chi-square test (χ^2-test) ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ถึง R_3 โดยตั้งค่าการกระจายตัวตามทฤษฎี Mendalian manner กล่าวคือ ถ้ามียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์สอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมของมะเขือเทศเพียง 1 ตำแหน่ง จะมีอัตราส่วนเป็น 3:1 ซึ่งค่า χ^2-test สามารถคำนวณได้จากสมการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\chi^2 = \frac{[(O-E)-1/2]^2}{E}$$

เมื่อ O = ค่าสังเกต (observed number)

E = ค่าคาดหมาย (expected number)

โดยมีอัตราความเป็นอิสระของเหตุการณ์ (degree of freedom, df) = n-1 เมื่อ n คือจำนวนเหตุการณ์

10. การเก็บเกี่ยวผลผลิตมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกสายพันธุ์พร้อมกันทั้งหมด เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 70 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV โดยเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้ทั้งหมด แล้วนำผลผลิตที่ได้มาบันทึกจำนวนผลผลิตและน้ำหนักที่ได้ต่อต้น

11. การเก็บเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

เก็บเมล็ดพันธุ์โดยเก็บเกี่ยวผลที่สุกแดงมาผ่าตามขวางแล้วบีบเอาเมล็ดออก มาหมักทิ้งไว้ในถุงพลาสติกนาน 1-2 วัน หลังจากนั้นนำไปล้างน้ำให้สะอาด เพื่อให้เนื้อที่ติดอยู่กับเมล็ดหลุดออกไป นำเมล็ดที่ได้ไปผึ่งลมให้แห้ง 3-5 วัน เมื่อเมล็ดแห้งสนิทดีแล้วนำมาบรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (กรุง, 2543)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ความต้านทานไวรัส CMV ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ รุ่น R_1 ถึง R_3

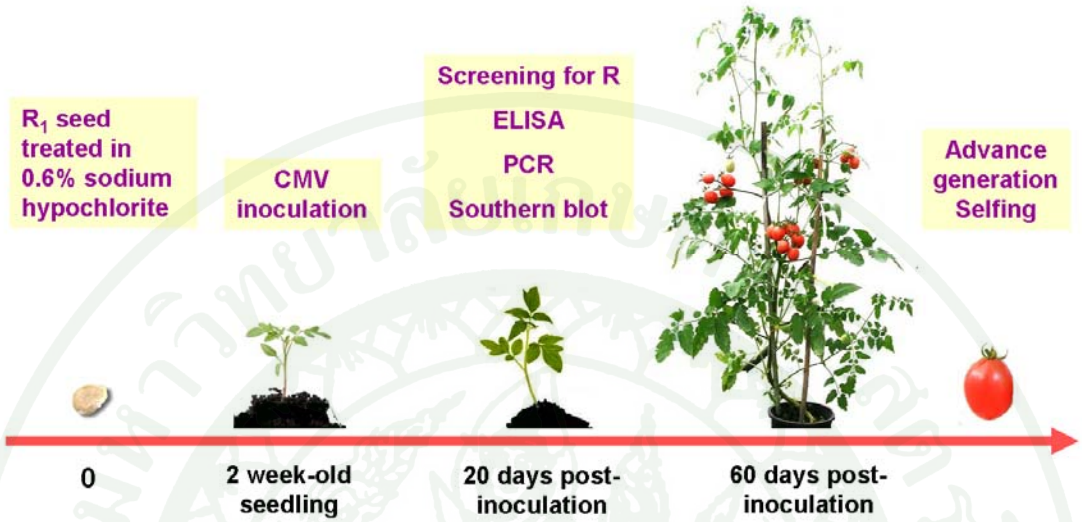
1.1 ความต้านทานของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1

จากขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ในภาพที่ 2 พบว่าลักษณะอาการที่เกิดจากการปลูกเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ 30RS บนมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่อ่อนแอต่อโรค เริ่มปรากฏให้เห็นภายใน 10 วัน ในระยะแรกจะแสดงอาการด่างและลดรูปของใบยอด ต่อมาใบย่อยจะแสดงอาการลดรูป บิดเบี้ยว (ภาพที่ 3) จนถึงมีลักษณะเป็นเส้นเรียวยาว คล้ายใบเฟิร์น (fern leaf) หรือเชือกผูกรองเท้า (shoe string) การเจริญเติบโตของลำต้นลดลง แคระแกร็นทำให้ลักษณะของต้นเป็นพุ่มเตี้ย ต้นที่แสดงอาการของโรคยังคงออกดอก แต่ดอกที่เกิดขึ้นมีลักษณะไม่สมบูรณ์ช่อดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกที่เป็นโรคลดขนาดกว่ากลีบดอกปกติมาก ในขณะที่มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส จะไม่แสดงอาการของโรค และมีการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับต้นมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 4) มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ที่นำมาทดสอบจำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือ L-25 และ L-29-3 ที่จำนวนต้นมะเขือเทศทั้งหมดแสดงอาการโรครุนแรงเหมือนต้นปกติที่ได้รับเชื้อไวรัส อย่างไรก็ตามมี 3 สายพันธุ์ คือ L-1, L-6-3 และ L-13 ที่มีจำนวนต้นมะเขือเทศที่ไม่แสดงอาการของโรค มีลักษณะเหมือนต้นปกติที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไวรัส (ภาพที่ 5) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าไม่มีการสะสมของเชื้อไวรัส CMV (ตารางผนวกที่ 1-2ก) หลังการปลูกเชื้อเช่นกัน แสดงว่าต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าวมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV

เมื่อตรวจสอบจำนวนต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคด้วยลักษณะอาการของโรคควบคู่ไปกับเทคนิค ELISA เมื่อมะเขือเทศมีอายุครบ 20 วัน ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV นำผลการตรวจสอบทั้งหมดที่ได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส CMV ดังที่แสดงในตารางที่ 3 พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงความต้านทานดีที่สุด คือ สายพันธุ์ L-13 L-1 และL-6-3 มีเปอร์เซ็นต์ความต้านทานเฉลี่ย 46.57% 46.41% และ 30.34% ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ L-25 และ L-29-3 มีเปอร์เซ็นต์ความต้านทานเฉลี่ย 0.00% และ 0.55% ตามลำดับ และมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้นใดในแต่ละสายพันธุ์ ที่แสดงความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV พบว่ายังคงความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต้านทานไปจนสิ้นสุดการทดลองคือ ไม่พบลักษณะอาการของโรคที่พัฒนาขึ้นมาภายหลังจนมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมมีอายุ 70 วัน ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV รุ่น R_1 นำเมล็ดมะเขือเทศที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วย 0.6% sodium hypochlorite ก่อนที่จะนำไปเพาะในกระบะเพาะ ทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อไวรัส CMV เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 20 วันสังเกตอาการของโรคที่พัฒนาขึ้นบนต้นมะเขือเทศ ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA และตรวจสอบความสามารถในการถ่ายทอด transgene ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot สุดท้ายคัดเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงความต้านทานต่อโรคและปล่อยให้ผสมตัวเอง เพื่อเก็บเมล็ดมาทดสอบความต้านทานและความคงตัวของยีนต่อในรุ่นถัดไป

ลักษณะความต้านทานที่มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมแสดงออก เป็นลักษณะความต้านทานที่เทียบได้กับ immunity คือ ตรวจไม่พบอาการของโรคและปริมาณของเชื้อไวรัส ในขณะที่ต้นมะเขือเทศปกติและต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่อ่อนแอต่อโรค จะแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงภายใน 20 วัน หลังการปลูกเชื้อ และตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในปริมาณที่สูง การที่เชื้อไวรัสไม่สามารถเพิ่มปริมาณภายในต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคได้เป็นกลไกความต้านทานแบบการใช้ยีน replicase เป็นสื่อกลาง หรือที่เรียกว่า Replicase-mediated resistance (Morroni *et al*.,2008) เกิดจากยีน replicase ไปยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส ในระดับ RNA และโปรตีน (Anderson *et al*., 1992; Wintermantel and Zaitlin, 2000; Morroni *et al*., 2008) แต่ลักษณะความต้านทานที่แสดงออกของพืชดัดแปลงพันธุกรรม บางครั้งพบว่าไม่ต้านทาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างสมบูรณ์เสมอไป มีรายงานว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส TSWV แสดงลักษณะความต้านทานแบบต้านทานโดยสมบูรณ์ และแบบแสดงอาการแผลจุด (local lesion) เฉพาะใบที่ได้รับการปลูกเชื้อ แต่ไม่แสดงอาการของโรคทั่วทั้งต้นเหมือนกับต้นมะเขือเทศปกติ และมะเขือทศดัดแปลงพันธุกรรมที่อ่อนแอต่อโรค (Liu *et al*., 2003)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อโรค และค่า χ^2-test ของการกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ที่ได้จากการตรวจสอบความต้านทานโรคของต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1

Line	Replication	Viral resistance				
		R/S[a]	Total	% Resistant	Average	χ^2 (3:1)[b]
SD_3	1	0/95	95	0.00	0.00	-
	2	0/100	100	0.00		-
L-25	1	0/90	90	0.00	0.00	270.00
	2	0/100	100	0.00		300.00
L-13	1	26/57	83	31.33	46.57	84.44
	2	55/34	89	61.80		8.27
L-29-3	1	1/90	91	1.10	0.55	265.05
	2	0/100	100	0.00		300.00
L-1	1	32/48	80	40.00	46.41	52.27
	2	47/42	89	52.81		23.37
L-6-3	1	9/71	80	11.25	30.34	173.40
	2	35/50	85	49.42		51.87

[a] R/S คือ จำนวนต้นที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ต่อ จำนวนต้นที่อ่อนแอต่อเชื้อไวรัส CMV

[b] ค่า χ^2 ที่ $P > 0.05$ (3.841), df = 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีรายงานไว้ว่าลักษณะความต้านทานที่เกิดจากการใช้ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส CMV มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเชื้อไวรัส โดยที่ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส CMV Subgroup IA สายพันธุ์ Fny นอกจากจะต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ Fny แล้ว ยังสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์อื่นๆ ที่อยู่ใน Subgroup IA และ IB ได้ แต่ไม่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV Subgroup II และเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Potato virus X* (PVX) *Tobacco mosaic virus* (TMV) *Tomato aspermy virus* (TAV) *Tobacco etch virus* (TEV) และ *Peanut stunt virus* (PSV) (Zaitlin *et al*., 1994; Morroni *et al*., 2008) และมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัส CMV Subgroup IA สายพันธุ์ Fny เช่นเดียวกัน และแสดงความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ 30RS ที่อยู่ใน Subgroup IB (Zhang, 2005) จึงมีความเป็นไปได้ว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมจะต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์อื่นๆ ในประเทศไทยที่ส่วนใหญ่อยู่ใน Subgroup IB (ภูวนารถ และคณะ, 2552) เช่นเดียวกัน

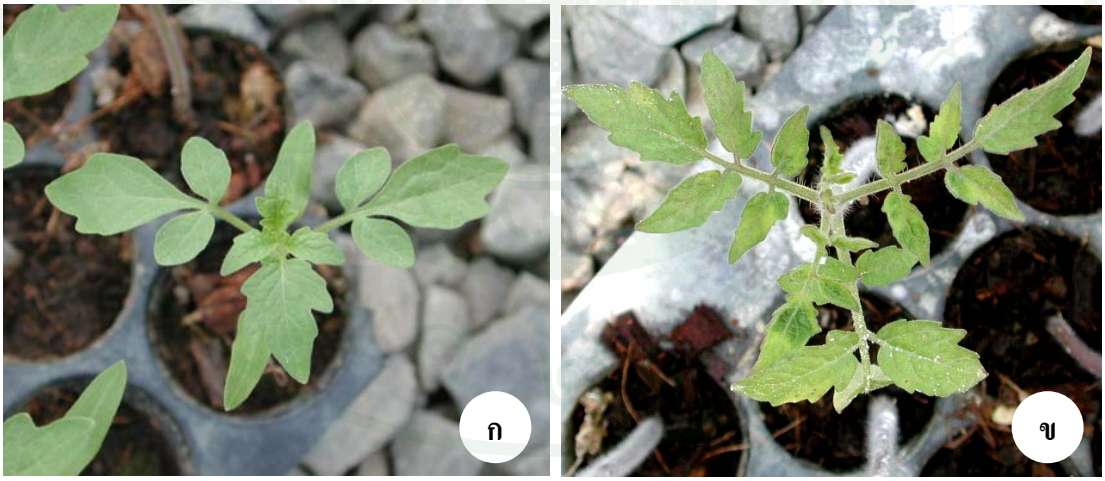
วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_0 ไปสู่รุ่น R_1 ของแต่ละสายพันธุ์ ทางสถิติโดยวิธี chi-square test (χ^2-test) โดยใช้ข้อมูลจากการตรวจสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ซึ่งมีค่าคาดหมายของอัตราส่วนต้นต้านทานต่อโรค : ต้นอ่อนแอต่อโรค เท่ากับ 3:1 หากมียีนสอดแทรกอยู่บนโครโมโซม 1 ตำแหน่ง โดยที่ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า χ^2 ในตาราง ที่ความน่าจะเป็น 0.05 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.841 แต่จากค่า χ^2 ที่คำนวณได้ในตารางที่ 3 พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ L-1 L-6-3 L-13 L-25 และ L-29-3 ให้ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ มากกว่า 3.841 แสดงว่าผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากอัตราส่วนทางทฤษฎีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ คือมีอัตราส่วนของต้นต้านทานต่อโรค : ต้นอ่อนแอต่อโรค ไม่เท่ากับ 3:1

การที่มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมมีการกระจายตัวของยีนไม่เป็นไปตามลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดล แต่มีอัตราส่วนเป็น 1:1 ในสายพันธุ์ L-1 L-6-3 และ L-13 อาจเกิดจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ในรุ่น R_0 มีลักษณะต้นเป็นแบบ chimera ที่เกิดจากเซลล์มากกว่า 1 เซลล์ พัฒนารวมกันจนเป็นยอดและต้นที่สมบูรณ์โดยมีเซลล์เริ่มต้นแตกต่างกัน (Schmülling and Schell, 1993) ทำให้มะเขือเทศแต่ละผลมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันตั้งแต่แรก คือต้นมะเขือเทศที่ได้มีทั้งผลที่มีหรือไม่มี transgene สอดแทรกอยู่ เมื่อเก็บเมล็ดที่ได้ทั้งหมดในหนึ่งต้นมารวมกัน จะทำให้ได้สัดส่วนของต้นที่ไม่มียีนเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมล็ดที่นำมาเพาะปลูกและทดสอบความต้านทานต่อในรุ่นลูก จึงมีอัตราส่วนต้นต้านทานต่อโรค : ต้นอ่อนแอต่อโรคน้อยกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3:1 อย่างไรก็ตาม การศึกษาในรุ่น R_1 นี้ ไม่ได้นำมะเขือเทศที่อ่อนแอต่อโรคมาวิเคราะห์ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ด้วยเทคนิค PCR ทุกต้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมอ่อนแอต่อโรคที่ถูกคัดทิ้งไปบางต้น อาจจะมียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์สอดแทรกอยู่ แต่ไม่มีการแสดงออกของลักษณะความต้านทาน ทำให้สัดส่วนของต้นที่มียีนลดลง การกระจายตัวของยีนจึงไม่เป็นไปในอัตราส่วน 3:1 ดังนั้นการวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ควรจะใช้ข้อมูลจากการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิค PCR โดยตรงจะมีความแน่นอนกว่า

คัดเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 สายพันธุ์ L-13 L-1 และL-6-3 ที่แสดงลักษณะต้านทานต่อโรคดีที่สุดจากทั้งหมด 5 สายพันธุ์ (family or line selection) เพื่อเก็บเมล็ดจากผลมะเขือเทศที่ได้จากการผสมตัวเอง มาศึกษาความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ต่อในรุ่น R_2 โดยเมล็ดมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ที่นำมาทดลองเกิดจากการรวมเมล็ดจากต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกต้นที่แสดงความต้านทานของสายพันธุ์นั้นๆ เข้าด้วยกันเป็น 1 สายพันธุ์ (bulk seed) แล้วทำการสุ่มเลือกขึ้นมาจำนวน 100 เมล็ด ต่อการทดสอบความต้านทาน 1 ครั้ง โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

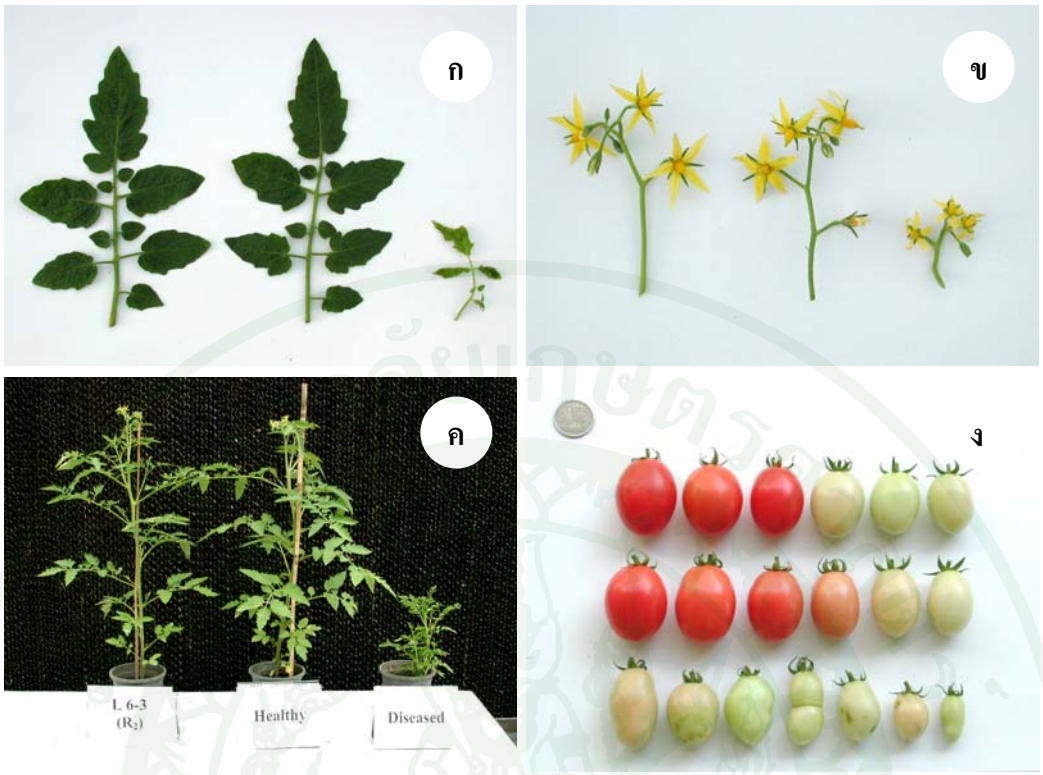


ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของโรคบนต้นมะเขือเทศภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS 10 วัน

ก. ต้นมะเขือเทศอายุ 2 สัปดาห์ ก่อนการปลูกเชื้อ

ข. อาการที่เกิดขึ้นบนต้นมะเขือเทศ ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 10 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับส่วนต่างๆ บนต้นมะเขือเทศ ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV (จากซ้าย มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการปลูกเชื้อ มะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ และมะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ)

ก. ใบมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรค ใบมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ และใบลักษณะผิดปกติ ด่าง ลดรูป บิดเบี้ยว ที่เกิดจากมะเขือเทศปกติที่อ่อนแอต่อโรค

ข. ดอกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรค ดอกมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ และดอกลักษณะผิดปกติ ช่อดอกมีขนาดเล็กและกลีบดอกลดขนาดลง ที่เกิดจากมะเขือเทศปกติที่อ่อนแอต่อโรค

ค. การเจริญเติบโตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรค การเจริญเติบโตของมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ และลักษณะการเจริญเติบโตผิดปกติ แคระแกร็น ที่เกิดจากมะเขือเทศปกติที่อ่อนแอต่อโรค

ง. จากบน ผลมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรค ผลมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ และลักษณะรูปทรงของผลที่ผิดปกติ มีขนาดเล็ก ของมะเขือเทศปกติที่อ่อนแอต่อโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 5 การเกิดโรคจากเชื้อ CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 หลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน

ก. มะเขือเทศปกติ แสดงความอ่อนแอต่อโรค

ข. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 แสดงความต้านทานต่อโรค

ค. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 แสดงความต้านทานต่อโรค

ง. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 แสดงความต้านทานต่อโรค

จ. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-25 แสดงความอ่อนแอต่อโรค

ฉ. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-29-3 แสดงความอ่อนแอต่อโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

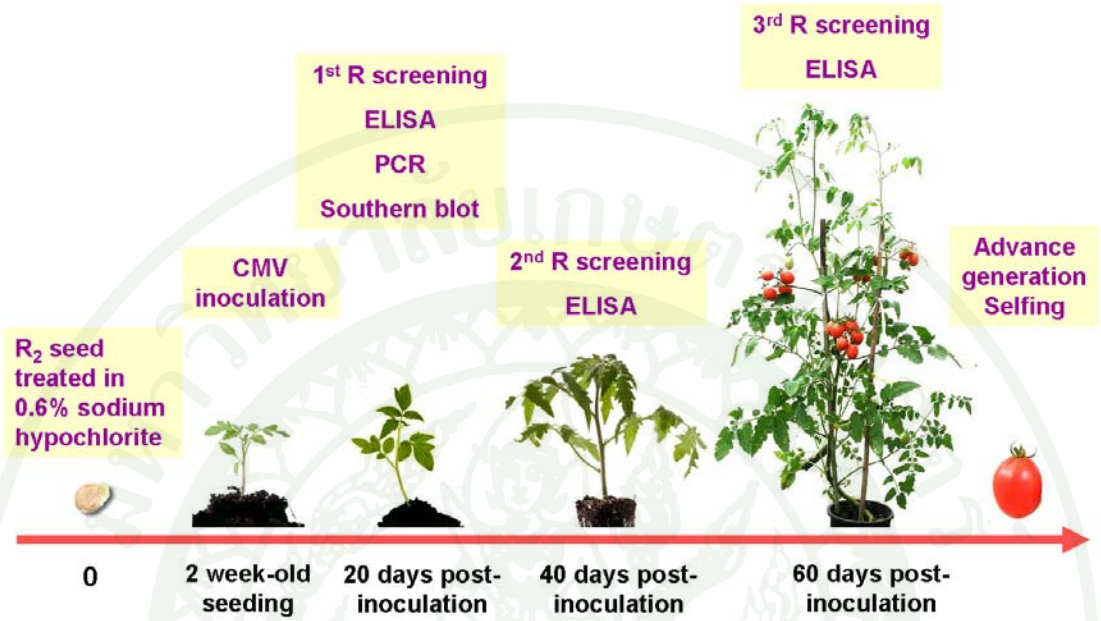
1.2 ความต้านทานของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2

ใน รุ่น R_2 นี้ จะทำการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV เหมือนกับในรุ่น R_1 แต่เพิ่มขั้นตอนการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA ซ้ำอีก 2 ครั้ง (ภาพที่ 6) เพื่อให้แน่ใจว่าอาการของโรคจะไม่พัฒนาขึ้นมาในภายหลัง จากผลการทดสอบความต้านทานของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 L-6-3 และ L-13 ยังคงมีต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอและต้านทานโรค (ภาพที่ 7) ในต้นที่ต้านทานต่อโรค ตรวจไม่พบลักษณะอาการของโรคและปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA (ตารางผนวกที่ 3ก) เมื่อมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมมีอายุ 20 40 และ 60 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV โดยที่แต่ละสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ต้นต้านทานโรคเพิ่มขึ้น จากการทดลองซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ สายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ต้นต้านทานโรคเฉลี่ยดีที่สุดคือ L-13 รองลงมาคือ L-1 และL-6-3 โดยมีเปอร์เซ็นต์การต้านทานโรคเฉลี่ยเท่ากับ 63.55% 62.94% และ 49.99% ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ทุกการทดลองจะทำการเก็บผลผลิตเมื่อต้นมะเขือเทศมีอายุครบ 70 วันภายหลังการปลูกเชื้อ พบว่าผลผลิตที่ได้มีความแตกต่างกันมาก โดยที่สายพันธุ์ต้านทาน L-1 L-6-3 และ L-13 จะให้ผลผลิตที่มีขนาดของผลและปริมาณที่เก็บได้มากกว่าต้นปกติที่เป็นโรคอย่างชัดเจน (ภาพที่ 8) ค่าเฉลี่ยจำนวนผลต่อต้นและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมจากการทดลองทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง จะแตกต่างกันตามช่วงเวลาปลูกดังที่แสดงในตารางที่ 5 จากผลผลิตมะเขือเทศที่เก็บได้ทั้งหมดพบว่า การทดลองครั้งที่ 1 อยู่ในช่วงเดือน พฤษภาคม-สิงหาคม 2548 สายพันธุ์ L-1 L-6-3 และ L-13 ให้จำนวนผลเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 12 20 และ 25 ผล ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นเท่ากับ 100 151 และ 181 กรัม ตามลำดับ การทดลองครั้งที่ 2 อยู่ในช่วงเดือน มกราคม-เมษายน 2549 สายพันธุ์ L-1 L-6-3 และ L-13 ให้จำนวนผลเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 10 20 และ 15 ผล ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นเท่ากับ 79 154 และ 97 กรัม ตามลำดับ และการทดลองครั้งที่ 3 อยู่ในช่วงเดือนเมษายน-กรกฎาคม 2549 สายพันธุ์ L-1 L-6-3 และ L-13 ให้จำนวนผลเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 4 6 และ 7 ผล ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นเท่ากับ 25 43 และ 54 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 9) การที่ผลผลิตที่ได้จาก 3 ช่วงฤดูปลูก มีความแตกต่างกัน น่าจะเป็นผลมาจากช่วงเดือนที่ทำการทดลองทั้ง 3 ครั้ง มีอุณหภูมิและความชื้นแตกต่างกัน ซึ่งการติดผลของมะเขือเทศต้องการสภาพอากาศที่ค่อนข้างเย็น อุณหภูมิกลางวันที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และอุณหภูมิกลางคืนอยู่ระหว่าง 16-20 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิกลางคืนสูงกว่า 22 องศาเซลเซียส จะทำให้มะเขือเทศไม่ติดผลหรือติดผลน้อยมาก (กรุง, 2543)



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV รุ่น R_2 นำเมล็ดมะเขือเทศที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วย 0.6% sodium hypochlorite ก่อนที่จะนำไปเพาะในกระบะเพาะ ทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อไวรัส CMV เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 20 วันสังเกตอาการของโรคที่พัฒนาขึ้นบนต้นมะเขือเทศ ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA และตรวจสอบความสามารถในการถ่ายทอด transgene ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA ซ้ำ มะเขือเทศมีอายุ 40 และ 60 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัสสุดท้ายคัดเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงความต้านทานต่อโรคและปล่อยให้ผสมตัวเอง เพื่อเก็บเมล็ดมาทดสอบความต้านทานและความคงตัวของยีนต่อในรุ่นถัดไป

นำผลผลิตที่เก็บได้จากต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรค ในการทดลองแต่ละครั้ง มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Post ANOVA analysis โดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 9) จากการวิเคราะห์พบว่า ผลผลิตที่ได้จากการทดลองครั้งที่ 1 มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ มี 2 สายพันธุ์คือ L-6-3 และ L-13 ที่ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและน้ำหนักผลไม่แตกต่างจากมะเขือเทศปกติปลอดโรค และให้ค่าเฉลี่ย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวนผลและน้ำหนักผลดีกว่าสายพันธุ์ L-1 และมะเขือเทศปกติที่เป็นโรค โดยที่สายพันธุ์ L-1 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลไม่แตกต่างจากมะเขือเทศปกติที่เป็นโรค แต่ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลดีกว่ามะเขือเทศปกติที่เป็นโรค อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 4 ความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 และ R_3

R_2						R_3			
Line	**Rep**	**R/S**	**Total**	**% R**	**Ave**	**Line**	**R/S**	**Total**	**% R**
L-1	1	44/12	56	78.57		L-1-22	1/81	82	1.22
	2	30/51	81	37.04	62.94	L-1-46	47/37	84	55.95
	3	41/15	56	73.21					
L-6-3	1	60/12	72	83.33		L-6-3-23	0/97	97	0.00
	2	5/64	69	7.81	49.99	L-6-3-34	7/76	83	8.43
	3	50/35	85	58.82					
L-13	1	43/14	57	75.44		L-13-3	89/1	90	98.89
	2	26/51	77	33.77	63.55	L-13-10	87/1	88	98.86
	3	57/13	70	81.43		L-13-47	96/0	96	100.00
						L-13-76	91/0	91	100.00
						L-13-90	92/0	92	100.00
NT	1	0/34	34	0.00		NT	0/44	44	0.00
	2	0/40	40	0.00	0.00	NT	0/50	50	0.00
	3	0/44	44	0.00		NT	0/50	50	0.00

R คือ จำนวนต้นมะเขือเทศที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV

S คือ จำนวนต้นมะเขือเทศที่อ่อนแอต่อเชื้อไวรัส CMV

Rep คือ จำนวนการทดลองที่ทำซ้ำ

% R คือ เปอร์เซ็นต์ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรค

Ave คือ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรค

NT คือ ต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการทดลองครั้งที่ 2 พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 และ L-13 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลไม่แตกต่างจากมะเขือเทศปกติปลอดโรค ส่วนสายพันธุ์ L-1 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลน้อยกว่าสายพันธุ์ L-6-3 L-13 และมะเขือเทศปกติปลอดโรค แต่ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลดีกว่ามะเขือเทศปกติที่เป็นโรค ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลพบว่า มีเพียงสายพันธุ์ L-6-3 ที่ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลดีกว่าสายพันธุ์ L-1 และ L-13 ที่ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลไม่แตกต่างจากมะเขือเทศปกติปลอดโรค และทุกสายพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตและน้ำหนักผลผลิตดีกว่ามะเขือเทศปกติที่เป็นโรค อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

และการทดลองครั้งที่ 3 พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 และ L-13 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและน้ำหนักผลไม่แตกต่างจากมะเขือเทศปกติปลอดโรค ในขณะที่สายพันธุ์ L-1 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและน้ำหนักผลน้อยกว่าสายพันธุ์ L-6-3 L-13 และมะเขือเทศปกติปลอดโรค แต่ดีกว่ามะเขือเทศปกติที่เป็นโรค อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% แสดงว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ ต่างก็ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและน้ำหนักผลดีกว่ามะเขือเทศปกติที่เป็นโรค และมีเพียงสายพันธุ์ L-1 ที่ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและน้ำหนักผลน้อยกว่ามะเขือเทศปกติปลอดโรค แสดงว่าชุดของ transgene ที่สอดแทรกเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 นอกจากจะทำให้มะเขือเทศมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสแล้วยังสามารถให้ผลผลิตเทียบเท่ากับมะเขือเทศปกติที่ปลอดโรค การที่มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมให้ผลวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตไม่แตกต่างจากมะเขือเทศปกติปลอดโรค แต่กลับให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตแตกต่างจากมะเขือเทศปกติปลอดโรค อาจเกิดจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตมะเขือเทศทั้งหมดภายในครั้งเดียวเมื่อมะเขือเทศมีอายุ 70 วันภายหลังการปลูกเชื้อ ไม่ได้ทยอยเก็บเมื่อผลมะเขือเทศสุกแดง ทำให้มะเขือเทศที่เก็บได้มีขนาดของผลหลายขนาด (ภาพที่ 10) ดังนั้นถึงจะมีค่าเฉลี่ยผลผลิตใกล้เคียงกัน ก็ทำให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักผลแตกต่างกันได้

ทำการเก็บเมล็ดมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ จากต้นที่แสดงความต้านทานในรุ่น R_2 การคัดเลือกในชั่วอายุนี้ เป็นการเปลี่ยนจากการคัดเลือกเป็นกลุ่ม (family or line selection) เป็นการคัดเลือกต้นเดี่ยว (single plant selection) โดยการเก็บผลผลิตรวมต่อต้นทั้งหมดเมื่อมะเขือเทศมีอายุครบ 70 วันภายหลังการปลูกเชื้อ แล้วรวมเมล็ดทั้งหมดที่ได้จาก 1 ต้น เป็น 1 สายพันธุ์ เพื่อนำไปศึกษาความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV โดยการสุ่มเลือกต้นที่ต้านทานจากทั้ง 3 สายพันธุ์เพื่อนำเมล็ดมาทำการทดลองในรุ่น R_3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 จำนวนผลและน้ำหนักผล (กรัม) ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และแสดงความต้านทานในสภาพโรงเรือน

ช่วงเวลาปลูก	สายพันธุ์	จำนวนผลทั้งหมด/จำนวนต้น	จำนวนผลเฉลี่ยต่อต้น[1)]	น้ำหนักผลทั้งหมด (กรัม)	น้ำหนักผลเฉลี่ย (กรัม) ต่อต้น[1)]
พฤษภาคม-สิงหาคม 2548	L-1	513/44	12 b	4,400	100.00 b
	L-6-3	1,218/60	20 a	9,090	151.50 a
	L-13	1,095/43	25 a	7,780	180.93 a
	Healthy	656/30	22 a	5,050	168.33 a
	Diseased	293/34	9 b	1,540	45.29 c
มกราคม-เมษายน 2549	L-1	302/29	10 c	2,305	79.48 b
	L-6-3	98/5	20 a	770	154.00 a
	L-13	375/25	15 b	2,435	97.40 b
	Healthy	721/40	18 ab	4,270	106.75 b
	Diseased	203/40	5 d	845	21.12 c
เมษายน-กรกฎาคม 2549	L-1	144/40	4 b	1,020	25.50 c
	L-6-3	295/50	6 a	2,135	42.70 b
	L-13	379/57	7 a	3,085	54.12 ab
	Healthy	291/34	7 a	2,675	62.20 a
	Diseased	33/44	1 c	205	4.65 d

[1)] ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน คือไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Post ANOVA analysis ใช้วิธีการ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 7 มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 45 วัน

ก. มะเขือเทศปกติ ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ข. มะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค

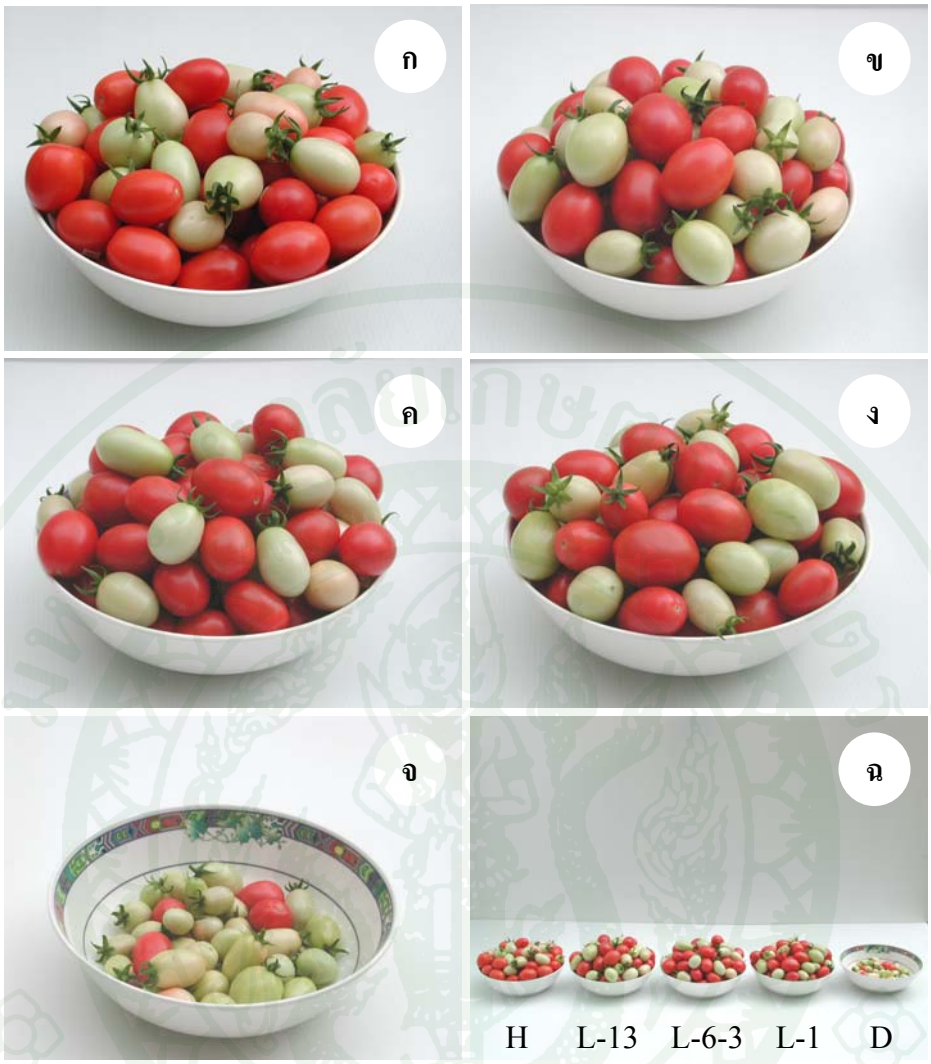
ค. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 แสดงลักษณะต้านทานต่อโรค

ง. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 แสดงลักษณะต้านทานต่อโรค

จ. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 แสดงลักษณะต้านทานต่อโรค

ฉ. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ปริมาณผลผลิตจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 5 ต้น ต่อ 1 สายพันธุ์ ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 70 วัน

ก. มะเขือเทศปกติ ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ข. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13

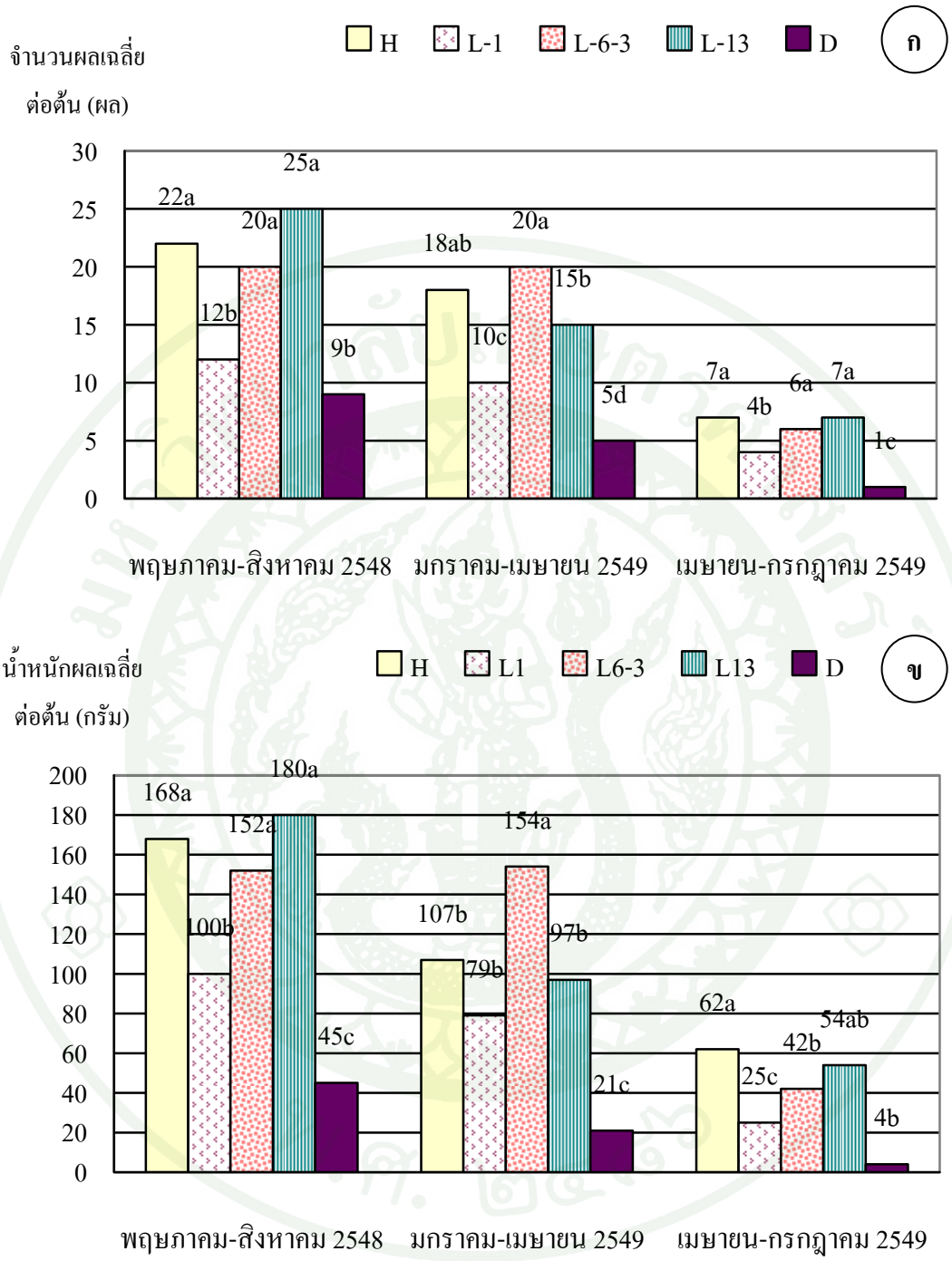
ค. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3

ง. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1

จ. มะเขือเทศปกติ ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ฉ. เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตของมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

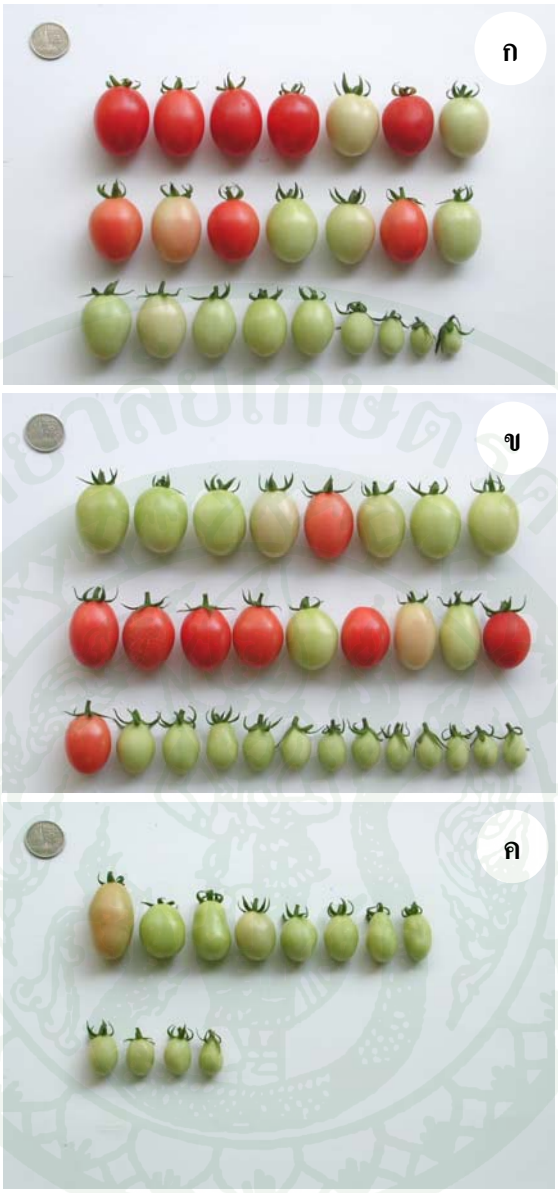


ภาพที่ 9 ค่าเฉลี่ยผลผลิตมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ ในรุ่น R_2 เมื่อเก็บเกี่ยวจากต้นมะเขือเทศ 70 วัน หลังการปลูกเชื้อ (ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน คือไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์)

ก. ค่าเฉลี่ยจำนวนผลต่อต้นของมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ

ข. ค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นของผลมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ผลมะเขือเทศขนาดต่างๆ ที่เก็บจากต้นมะเขือเทศ 1 ต้น ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 70 วัน

ก. มะเขือเทศปกติปลอดโรค

ข. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

ค. มะเขือเทศปกติเป็นโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 ความต้านทานของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3

จากการทดลองในรุ่น R_2 พบว่า ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้นใดที่แสดงความต้านทานต่อโรค จะคงความต้านทานไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ดังนั้น จึงทำการลดขั้นตอนการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 60 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัส ออกจากขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 (ภาพที่ 11) ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV ในการทดสอบความต้านทานครั้งที่ 1 พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-3 มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงสุดถึง 98.89% รองลงมาคือสายพันธุ์ L-1-22 ที่ต้านทานเพียง 1.22% ในขณะที่สายพันธุ์ L-6-3-23 ไม่มีความต้านทานเลย (ภาพที่ 12) เมื่อทดสอบความต้านทานครั้งที่ 2 พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-10 มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงสุดถึง 98.86% รองลงมาคือสายพันธุ์ L-1-46 ต้านทาน 55.95% และสายพันธุ์ L-6-3-34 ต้านทาน 8.43% จากการทดลองทั้ง 2 ครั้ง จะเห็นได้ว่ามีเพียงกลุ่มสายพันธุ์ L-13 ที่มีลักษณะความต้านทานเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มสายพันธุ์ L-1 และ L-6-3 มีลักษณะความต้านทานลดลงหรือหายไปในรุ่น R_3 เลยทำการทดลองเพิ่มในกลุ่มสายพันธุ์ L-13 ที่แสดงความต้านทานต่อเชื้อไวรัสดีที่สุด โดยสุ่มเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานในกลุ่มสายพันธุ์ L-13 จากรุ่น R_2 เพื่อนำเมล็ดมาทดสอบเพิ่ม 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ L-13-47 L-13-76 และ L-13-90 พบว่าภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงถึง 100% (ตารางที่ 4)

ลักษณะความต้านทานโรคของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม มีความต้านทานเพิ่มขึ้นในรุ่น R_2 แต่ลักษณะความต้านทานที่ได้กลับมีความผันแปรเกิดขึ้นเมื่อเข้าสู่รุ่น R_3 โดยที่สายพันธุ์ L-13 แสดงความต้านทานเพิ่มมากขึ้นถึง 100% ในขณะที่สายพันธุ์ L-1 และ L-6-3 แสดงความต้านทานลดลงหรือไม่แสดงความต้านทานเลย เห็นได้ชัดเจนว่าการแสดงออกของยีนมีความแตกต่างกันมาก ความผันแปรของลักษณะการแสดงออกของ transgene เกิดขึ้นได้บ่อยครั้งภายในประชากรพืชดัดแปลงพันธุกรรม แม้ว่าจะได้รับการถ่ายยีนจากชุดยีนเดิม สภาพแวดล้อม และวิธีการเดียวกัน ผลที่ได้กลับพบลักษณะการแสดงออกที่ไม่เป็นที่ต้องการในอัตราที่สูง และไม่สามารถคาดเดาลักษณะการแสดงออกของ transgene ได้ มีรายงานว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดความผันแปรที่เกิดจากการแสดงออกของ transgene มีอยู่หลายปัจจัย อันได้แก่ จำนวนชุดของ transgene (transgene copy number) การเกิด RNA silencing และ ตำแหน่งที่ transgene สอดแทรกบนโครโมโซม (transgene insertion site) เป็นต้น (Andow *et al*., 2004; Butaye *et al.*, 2004; Butaye *et al*., 2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

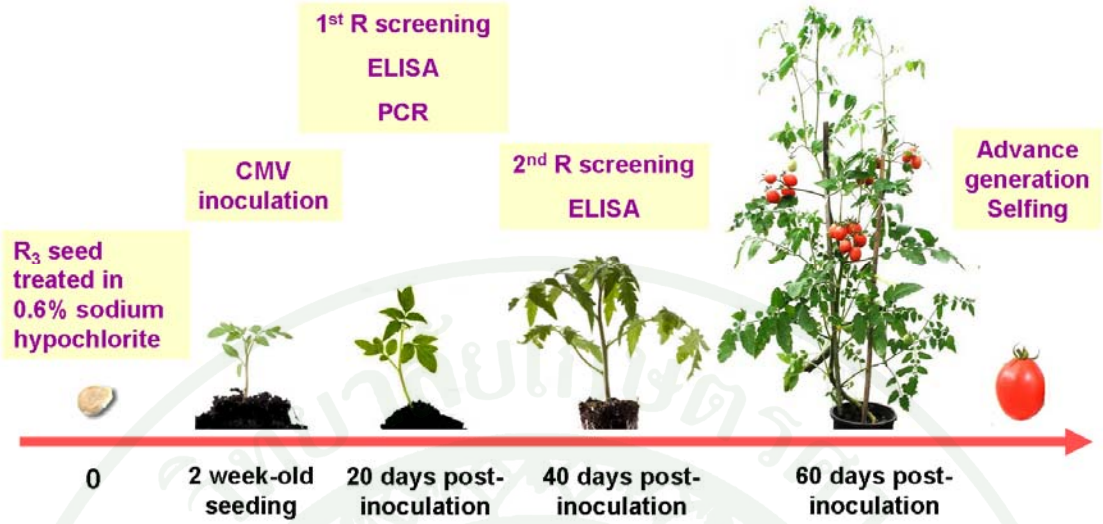
ตารางที่ 6 ผลผลิตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ในสภาพโรงเรือน แสดงจำนวนผลและน้ำหนักผล (กรัม) ของแต่ละช่วงเวลาปลูก

ช่วงเวลาปลูก	สายพันธุ์	จำนวนผลทั้งหมด/จำนวนต้น	จำนวนผลเฉลี่ยต่อต้น	น้ำหนักผลทั้งหมด (กรัม)	น้ำหนักผลเฉลี่ย (กรัม) ต่อต้น
พฤศจิกายน	L-1-22^{R}	47/1	47	270	270.00
2549-กุมภาพันธ์	L-1-22^{S}	984/81	12	3,760	46.42
2550	L-6-3-23^{S}	505/97	5	1,720	17.73
	L-13-3^{R}	2,794/89	31	16,990	190.90
	L-13-3^{S}	0/1	0	0	0.00
	Healthy	1,208/47	26	5,140	109.36
	Diseased	450/44	10	1,470	33.41
มีนาคม-	L-1-46^{R}	840/46	18	7,070	153.70
มิถุนายน 2550	L-1-46^{S}	60/37	2	355	9.59
	L-6-3-34^{R}	270/7	39	1,310	187.14
	L-6-3-34^{S}	266/76	3	1,275	16.78
	L-13-10^{R}	1,541/87	18	13,130	150.92
	L-13-10^{S}	0/1	0	0	0.00
	Healthy	495/37	13	5,035	136.08
	Diseased	164/50	3	990	19.80
พฤษภาคม-	L-13-47^{R}	1,209/96	13	10,960	114.17
กรกฎาคม 2552	L-13-76^{R}	1,170/91	13	11,320	124.40
	L-13-90^{R}	1,375/92	15	13,740	149.35
	Healthy	569/47	12	4,860	103.40
	Diseased	222/50	4	1,215	24.30

^{R} ผลผลิตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และต้านทานต่อโรค

^{S} ผลผลิตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และอ่อนแอต่อโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV รุ่น R_3 นำเมล็ดมะเขือเทศที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วย 0.6% sodium hypochlorite ก่อนที่จะนำไปเพาะในกระบะเพาะ ทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อไวรัส CMV เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 20 วันสังเกตอาการของโรคที่พัฒนาขึ้นบนต้นมะเขือเทศ ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA และตรวจสอบความสามารถในการถ่ายทอด transgene ด้วยเทคนิค PCR และ Southern blot ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA ซ้ำ มะเขือเทศมีอายุ 40 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัส สุดท้ายคัดเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงความต้านทานต่อโรคและปล่อยให้ผสมตัวเอง เพื่อเก็บเมล็ดมาทดสอบความต้านทานและความคงตัวของยีนต่อในรุ่นถัดไป

ทำการเก็บผลผลิตจากต้นมะเขือเทศ 70 วันภายหลังการปลูกเชื้อ พบว่าผลผลิตที่เก็บได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-47 L-13-76 และ L-13-90 ซึ่งมีลักษณะความต้านทานเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในรุ่น R_3 ต่างก็ให้ผลผลิตที่มีขนาดและปริมาณของผลที่เก็บได้มากกว่าต้นปกติที่เป็นโรคอย่างชัดเจน (ภาพที่ 13) เมื่อนำผลผลิตที่เก็บได้จากมะเขือเทศทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนผลต่อต้นและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันตามช่วงเวลาปลูก (ตารางที่ 6) โดยที่ สายพันธุ์ L-1-22 L-6-3-23 และ L-13-3 ทดลองอยู่ในช่วงเดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธ์ 2549 สายพันธุ์ L-1-46 L-6-3-34 และ L-13-10 ทดลองอยู่ในช่วงเดือนมีนาคม-มิถุนายน 2550 และสายพันธุ์ L-13-47 L-13-76 และ L-13-90 ทดลองอยู่ในช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม 2552 และพบว่าต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคจะให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลต่อต้นและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้น ดีกว่าต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่เป็นโรค และต้นมะเขือเทศปกติที่เป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรค อย่างชัดเจน ในขณะที่ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่เป็นโรคจะให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลต่อต้นและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นไม่แตกต่างจากต้นมะเขือเทศปกติที่เป็นโรค ทั้ง 3 ช่วงฤดูปลูก

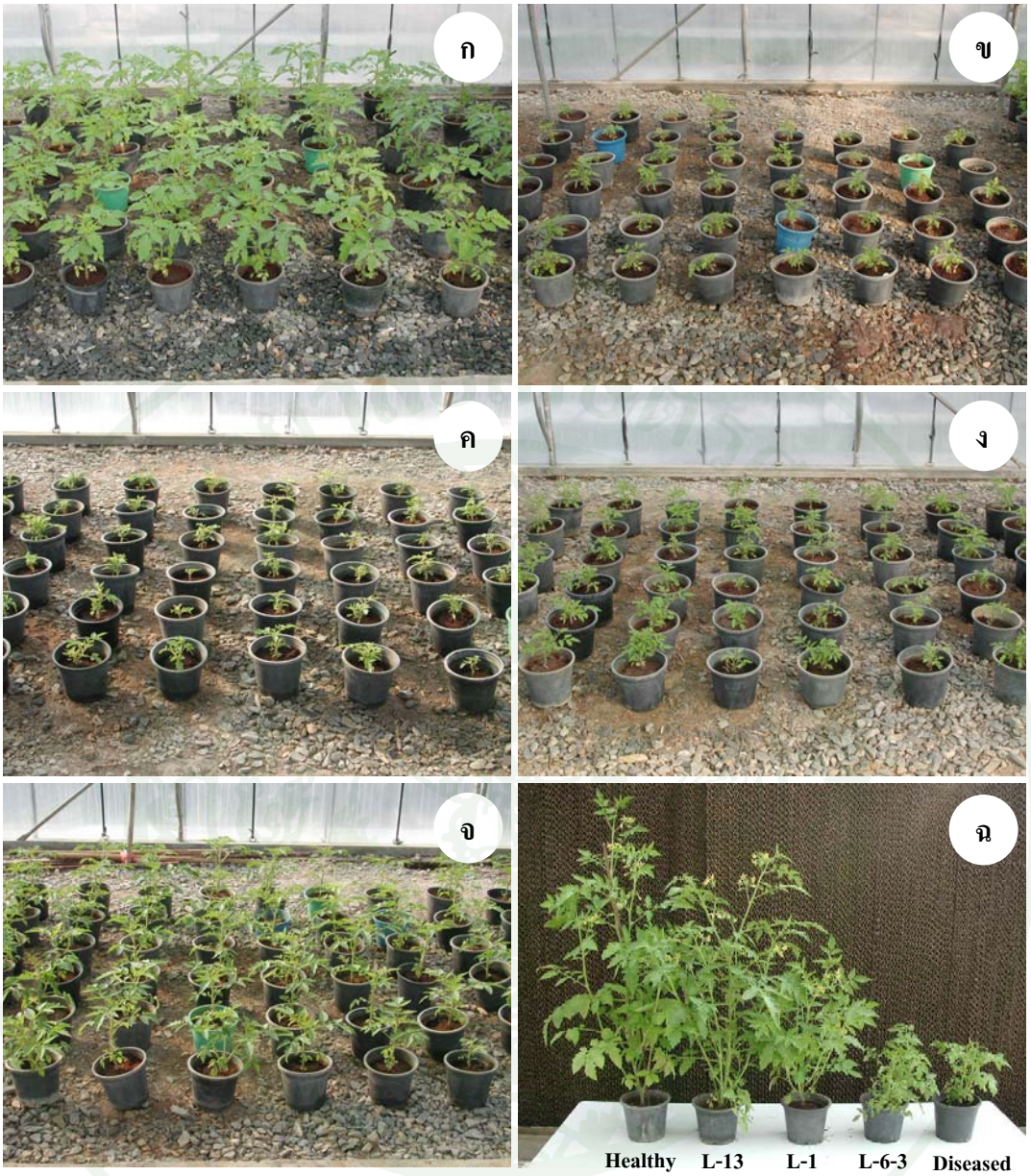
ตารางที่ 7 ผลผลิตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ในสภาพโรงเรือน แสดงจำนวนผลและน้ำหนักผล (กรัม) ที่ทำการทดลองทั้งหมด

สายพันธุ์	จำนวนต้นมะเขือเทศ	จำนวนผล		น้ำหนักผล (กรัม)	
	ทั้งหมด	ทั้งหมด	เฉลี่ยต่อต้น	ทั้งหมด	เฉลี่ยต่อต้น
L-1	165	1,931	12	11,455	69
L-6-3	180	1,041	6	4,305	24
L-13	457	8,089	18	66,140	145
Healthy	131	2,272	17	15,035	115
Diseased	144	836	6	3,675	26

เมื่อนำผลผลิตของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกสายพันธุ์ในรุ่น R_3 ที่เก็บได้จากการทดลองทั้ง 3 ช่วงเวลาปลูก มารวมเข้าด้วยกันภายในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกัน เพื่อหาค่าเฉลี่ยจำนวนผลต่อต้นและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลต่อต้นที่ทำการทดลองทั้งหมด (ตารางที่ 7) พบว่ามีเพียงกลุ่มสายพันธุ์ L-13 ที่ให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตดีที่สุด คือให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลมากกว่าต้นปกติที่เป็นโรคถึง 3 เท่า และ 6 เท่า ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่มสายพันธุ์ L-1 ที่ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลมากกว่าต้นปกติที่เป็นโรคถึง 2 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มสายพันธุ์ L-6-3 ที่เคยให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตดีเหมือนกับกลุ่มสายพันธุ์ L-13 ในรุ่น R_2 กลับมีความต้านทานลดลงจนถึงไม่มีความต้านทานเลย ทำให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลที่ได้เท่ากับต้นปกติที่เป็นโรค

ทำการเก็บเมล็ดมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ จากต้นที่แสดงความต้านทานในรุ่น R_3 การคัดเลือกในชั่วอายุนี้ เป็นการคัดเลือกต้น (single plant selection) เช่นเดียวกับในรุ่น R_2 คือเก็บผลผลิตรวมต่อต้นทั้งหมดเมื่อมะเขือเทศมีอายุครบ 70 วันภายหลังการปลูกเชื้อ แล้วรวมเมล็ดทั้งหมดที่ได้จาก 1 ต้น เป็น 1 สายพันธุ์ เพื่อนำไปศึกษาความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_4 ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 25 วัน

ก. มะเขือเทศปกติ ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ข. มะเขือเทศปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค

ค. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1-22 แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค

ง. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3-23 แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรค

จ. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-3 แสดงลักษณะต้านทานต่อโรค

ฉ. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ ภายหลังการปลูกเชื้อ 40 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 13 ปริมาณผลผลิตจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 5 ต้น ต่อ 1 สายพันธุ์ ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัส CMV เป็นเวลา 70 วัน

ก. มะเขือเทศปกติ ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ข. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-47

ค. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-76

ง. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-90

จ. มะเขือเทศปกติ ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ฉ. เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตของมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ถึง R_3

2.1 การตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคนิค PCR ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ที่แสดงความต้านทานจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ L-1 L-6-3 และ L-13 ในการทดสอบครั้งที่ 1 พบว่า มีจำนวนต้นต้านทานทั้งหมด 40.00% 11.25% และ 31.33% ตามลำดับ ส่วนการทดสอบครั้งที่ 2 มีจำนวนต้นต้านทานทั้งหมด 52.81% 49.42% และ 61.80% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ทั้งหมดสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 2.48 กิโลเบส (ภาพที่ 14)

เมื่อตรวจสอบการถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ไปยังมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมในรุ่น R_2 และรุ่น R_3 ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์สามารถถ่ายทอดจากต้นพ่อแม่สู่ลูกได้ โดยตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 2.48 กิโลเบส ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ทั้ง 3 สายพันธุ์ (ภาพที่ 15) ต้นที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในรุ่น R_2 เพิ่มขึ้นจากรุ่น R_1 คือ สายพันธุ์ L-1 L-6-3 และ L-13 คิดเป็น 70.00% 98.63% และ 78.08% ตามลำดับ ในการทดสอบครั้งที่ 1 ส่วนการทดสอบครั้งที่ 2 คิดเป็น 86.17% 98.57% และ 96.59% ตามลำดับ และการทดสอบครั้งที่ 3 คิดเป็น 78.08% 83.70% และ 77.78% ตามลำดับ นำผลการตรวจสอบยีนในรุ่น R_2 ที่ได้จากการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง มาวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ทางสถิติโดยวิธี chi-square test (χ^2-test) ซึ่งมีค่าคาดหมายของอัตราส่วนต้นมียีน : ต้นไม่มียีน เท่ากับ 3:1 และ 15:1 หากมียีน เรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์สอดแทรกอยู่บนโครโมโซม 1 และ 2 ตำแหน่งตามลำดับ โดยที่ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า χ^2 ในตาราง ที่ความน่าจะเป็น 0.05 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.841

จากผลการวิเคราะห์ (ตารางที่ 8) พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 ในการทดลองครั้งที่ 1 และ L-13 ให้ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ น้อยกว่า 3.841 ที่ค่าคาดหมายของอัตราส่วนต้นมียีน : ต้นไม่มียีน เท่ากับ 3:1 แสดงว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับอัตราส่วนทางทฤษฎี คือ มีอัตราการกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์เป็นอัตราส่วน 3:1 ในขณะที่สายพันธุ์ L-1 ในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ให้ค่า χ^2 ที่คำนวณได้เท่ากับ 6.255 และ 6.481 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มากกว่าค่า χ^2 ในตารางความน่าจะเป็น 0.05 (3.841) แต่น้อยกว่าค่า χ^2 ในตารางความน่าจะเป็น 0.01 (6.635) ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 1 แสดงว่าสายพันธุ์ L-1 ในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ให้ผลการทดลองแตกต่างจากอัตราส่วนทางทฤษฎี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีอัตราการกระจายตัวของยีน เรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ไม่เท่ากับ 3:1 ส่วนสายพันธุ์ L-6-3 ให้ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ น้อยกว่า 3.841 ที่ค่าคาดหมายของอัตราส่วนต้นมียีน : ต้นไม่มียีน เท่ากับ 15:1 แสดงว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับอัตราส่วนทางทฤษฎี คือ มีอัตราการกระจายตัวของยีน เรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์เป็นอัตราส่วน 15:1 แสดงว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 L-13 และ L-6-3 มีการกระจายตัวของยีนเป็นไปตามกฎการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของเมนเดล ที่เป็นผลมาจากการสอดแทรกของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์เข้าสู่โครโมโซม 1 และ 2 ตำแหน่ง (locus) เนื่องจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 นี้ มีลักษณะการกระจายตัวของยีน 3 แบบ คือ homozygous dominant heterozygous และ homozygous recessive ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ในประชากรรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้นแม่ที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แบบ heterozygous (อัญชลี, 2550) ต้นมะเขือเทศที่ตรวจไม่พบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์มียีนแบบ homozygous recessive ส่วนต้นมะเขือเทศที่ตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์มียีนแบบ homozygous dominant และ heterozygous และไม่สามารถจำแนกได้ว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้นใดมียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์แบบใด แต่สามารถคัดแยกความแตกต่างได้จากการกระจายตัวในรุ่นถัดไป คือ รุ่น R_3

การที่สายพันธุ์ L-1 ในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 มีอัตราการกระจายตัวของยีนไม่เท่ากับ 3:1 อาจเกิดจากการที่สายพันธุ์ L-1 มีต้นมะเขือเทศที่มีจำนวนชุดของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์แตกต่างกันในรุ่น R_1 คือ 2 และ 3 copies (ภาพที่ 17) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ต้นมะเขือเทศที่มีจำนวนชุดของยีน 2 และ 3 copies จะมีการสอดแทรกของ transgene บนโครโมโซมแตกต่างกัน คือ มีการสอดแทรกของ transgene 1 และมากกว่า 1 ตำแหน่ง เมื่อทำการเก็บรวบรวมเมล็ดแบบ bulk seed ทำให้ประชากรต้นมะเขือเทศที่ได้มีการสอดแทรกของ transgene บนโครโมโซม 1 และมากกว่า 1 ตำแหน่งปนกัน ทำให้ได้อัตราส่วนระหว่างต้นมียีน : ต้นไม่มียีน มากกว่า 3:1 และพบต้นมะเขือเทศที่มีจำนวนชุดของยีน 2 และ 3 copies เมื่อทำการสุ่มเมล็ดมะเขือเทศมาเพาะปลูกเพื่อทดสอบต่อในรุ่น R_2 (ภาพที่ 18)

จากการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ L-1-22 L-1-46 L-6-3-23 L-6-3-34 L13-3 L-13-10 L-13-47 L-13-76 และ L-13-90 สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ขนาด 2.48 กิโลเบส (ภาพที่ 16) ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกต้น หรือคิดเป็น 100% ของต้นมะเขือเทศดัดแปลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พันธุกรรมที่ทำการทดสอบทั้งหมดใน 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8) แสดงว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมต้นแม่รุ่น R_2 ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์แบบ homozygous dominant ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมในการเป็นแหล่งของ transgene ในการปรับปรุงพันธุ์ให้กับพืชปกติ เพราะลูกผสมที่ได้ในรุ่น R_1 จะมี transgene ทุกต้น (Johnston *et al.*, 2004)

ตารางที่ 8 การกระจายตัวของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 และ R_3

R_2						R_3		
Line	**Replication**	**+/-[1)]**	**Total**	**χ^2**		**Line**	**+/-[1)]**	**Total**
				3:1	**15:1**			
L-1	1	56/24	80	0.467[a]	-	L-1-22	82/0	82
	2	81/13	94	6.255[b]	-	L-1-46	84/0	84
	3	56/7	63	6.481[b]	-		-	-
L-6-3	1	72/1	73	21.740	2.963[a]	L-6-3-23	97/0	97
	2	69/1	70	20.743	2.386[a]	L-6-3-34	83/0	83
	3	85/3	88	21.879	1.212[a]		-	-
L-13	1	57/16	73	0.369[a]	-	L-13-3	90/0	90
	2	77/15	92	3.710[a]	-	L-13-10	88/0	88
	3	70/20	90	0.370[a]	-	L-13-47	96/0	96
						L-13-76	91/0	91
						L-13-90	92/0	92
NT[2)]	1	0/34	34	-	-	NT	0/44	44
	2	0/40	40	-	-	NT	0/50	50
	3	0/44	44	-	-	NT	0/50	50

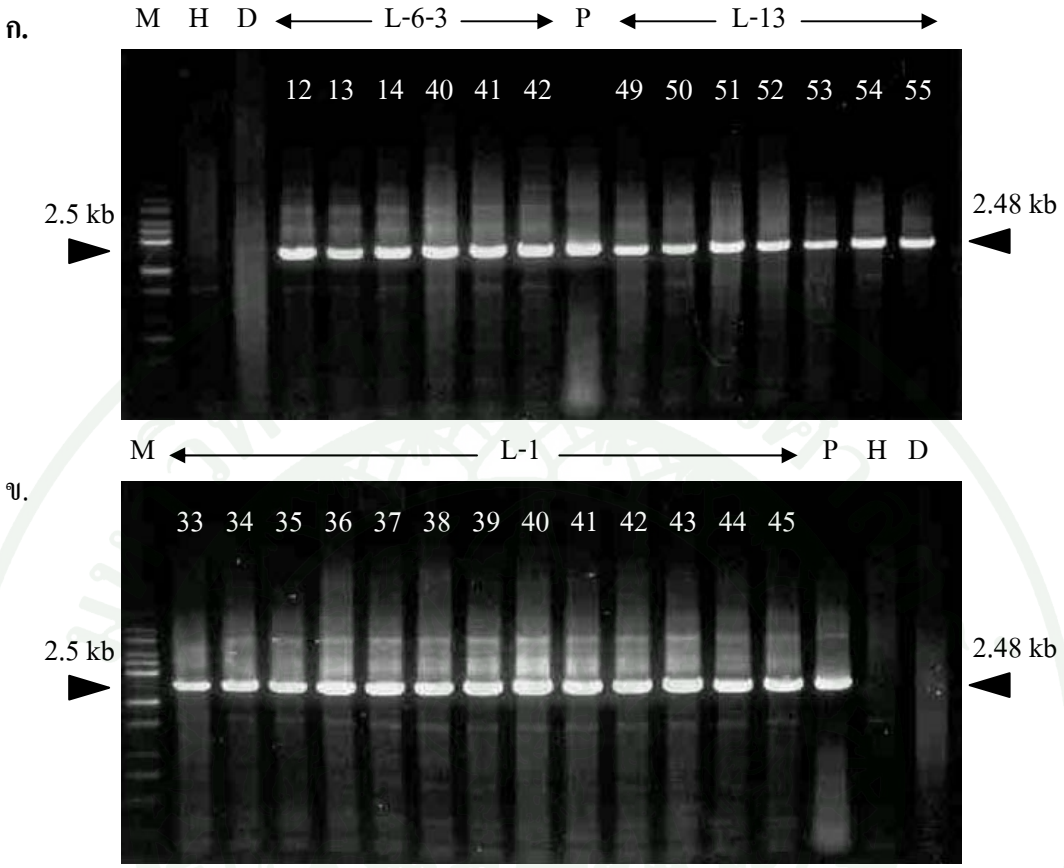
[1)] +/- คือ จำนวนต้นที่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ต่อ จำนวนต้นที่ไม่มียีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์

[2)] NT คือ มะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ และได้รับการปลูกเชื้อไวรัส

[a] ค่า χ^2 ที่ $P < 0.05$ (3.841), df = 1

[b] ค่า χ^2 ที่ $P > 0.05$ (3.841) < 0.01 (6.635), df = 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

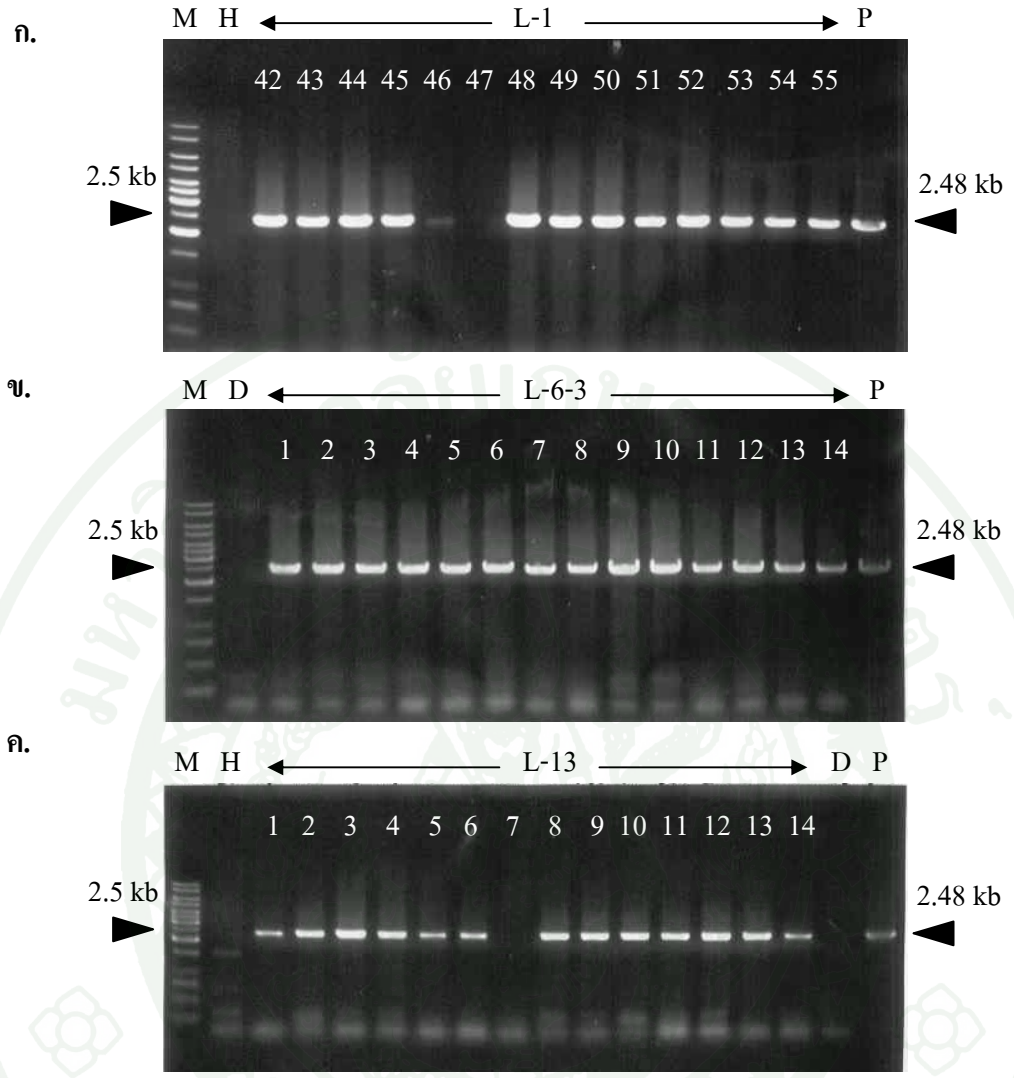


ภาพที่ 14 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_1 ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย เทคนิค PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนปลอดโรค D: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนเป็นโรค และ P: พลาสมิด pCMV N/B-23)

ก. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 ต้นที่ 12-14 และ 40-42 และ สายพันธุ์ L-13 ต้นที่ 49-55

ข. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 ต้นที่ 33-45

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



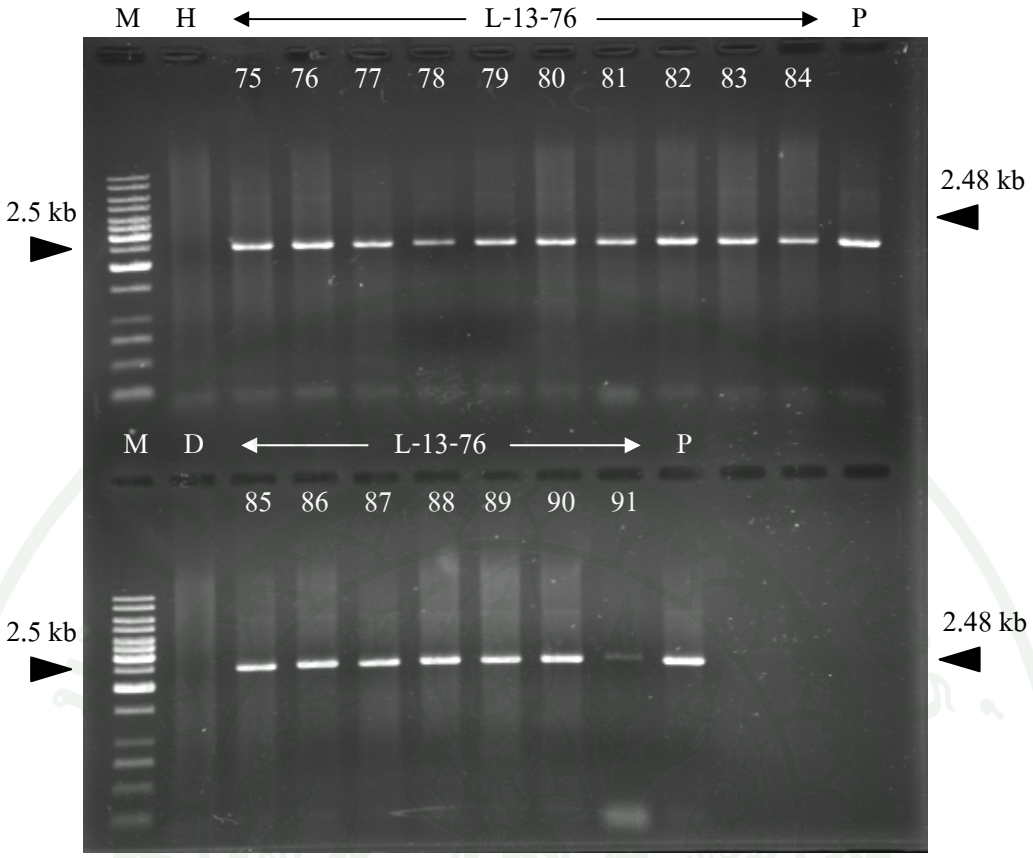
ภาพที่ 15 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_2 ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย เทคนิค PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนปลอดโรค D: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนเป็นโรค และ P: พลาสมิด pCMV N/B-23)

ก. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 ต้นที่ 42-55

ข. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 ต้นที่ 1-14

ค. มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 ต้นที่ 1-14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 ผลการตรวจหายีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_3 ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วย เทคนิค PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนปลอดโรค D: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีนเป็นโรค P: พลาสมิด pCMV N/B-23 และ L-13-76: มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-76 ต้นที่ 75-91)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

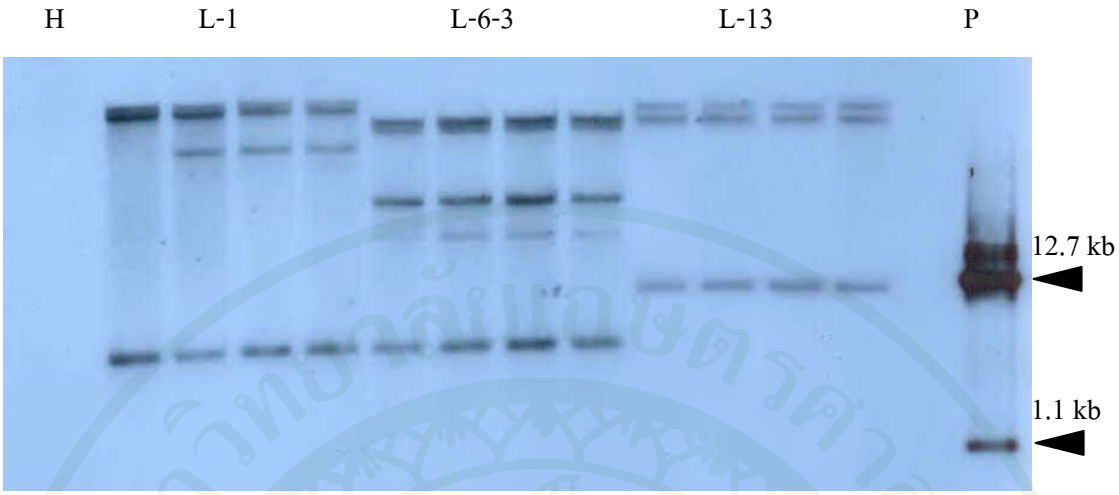
2.2 การตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization

ทำการสุ่มเลือกต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_1 ที่ตรวจพบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค PCR และต้นมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มาสกัด genomic DNA เพื่อตรวจสอบจำนวนชุดของยีนที่สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม หลังจากนั้นนำ genomic DNA ที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของ *Eco*RI บนพลาสมิด pCMV N/B-23 มีตำแหน่งย่อยดีเอ็นเอบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ 2,039 ของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์และที่ปลายด้าน 3' ของ nos terminator ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบสด้วย ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization พบแถบดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน ในสายพันธุ์ L-1 พบจำนวนชุดของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ 2-3 copies สายพันธุ์ L-6-3 พบจำนวนชุดของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ 4-5 copies และ สายพันธุ์ L-13 พบจำนวนชุดของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ 2 copies ในขณะที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 17)

เมื่อทำการตรวจสอบจำนวนชุดของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ให้ผลการตรวจสอบเหมือนกับรุ่น R_1 คือพบแถบดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน โดยที่มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 พบจำนวนชุดของยีน 2-3 copies สายพันธุ์ L-6-3 พบจำนวนชุดของยีน 4-5 copies และ สายพันธุ์ L-13 พบจำนวนชุดของยีน 2 copies ขณะที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 18)

จากผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 และ R_2 ด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค genomic Southern hybridization ให้ผลการตรวจสอบที่สอดคล้องกันคือ แสดงให้เห็นว่ามีการสอดแทรกของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์เข้าสู่โครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดไปยังมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นถัดไปได้ แต่เมื่อนำผลการตรวจสอบจำนวนชุดของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV แสดงให้เห็นว่าลักษณะความต้านทานที่ได้ไม่สัมพันธ์กับจำนวนชุดของยีน สังเกตได้จากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมในกลุ่มสายพันธุ์ L-13 ที่มีจำนวนชุดของยีน 2 copies มีลักษณะความต้านทานสูงสุดถึง 100% เมื่อเข้าสู่รุ่น R_3 ในขณะที่กลุ่มสายพันธุ์ L-1 มีจำนวนชุดของยีน 2-3 copies เช่นกัน แต่กลับมีความต้านทานลดลงเมื่อเข้าสู่รุ่น R_3 เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R_1 ด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization โดยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากนั้นใช้ replicase gene probe ที่ติดฉลากด้วยสาร Digoxigenin ตรวจผลไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence โดยใช้ CDP *star*™ substrate

H : ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีน

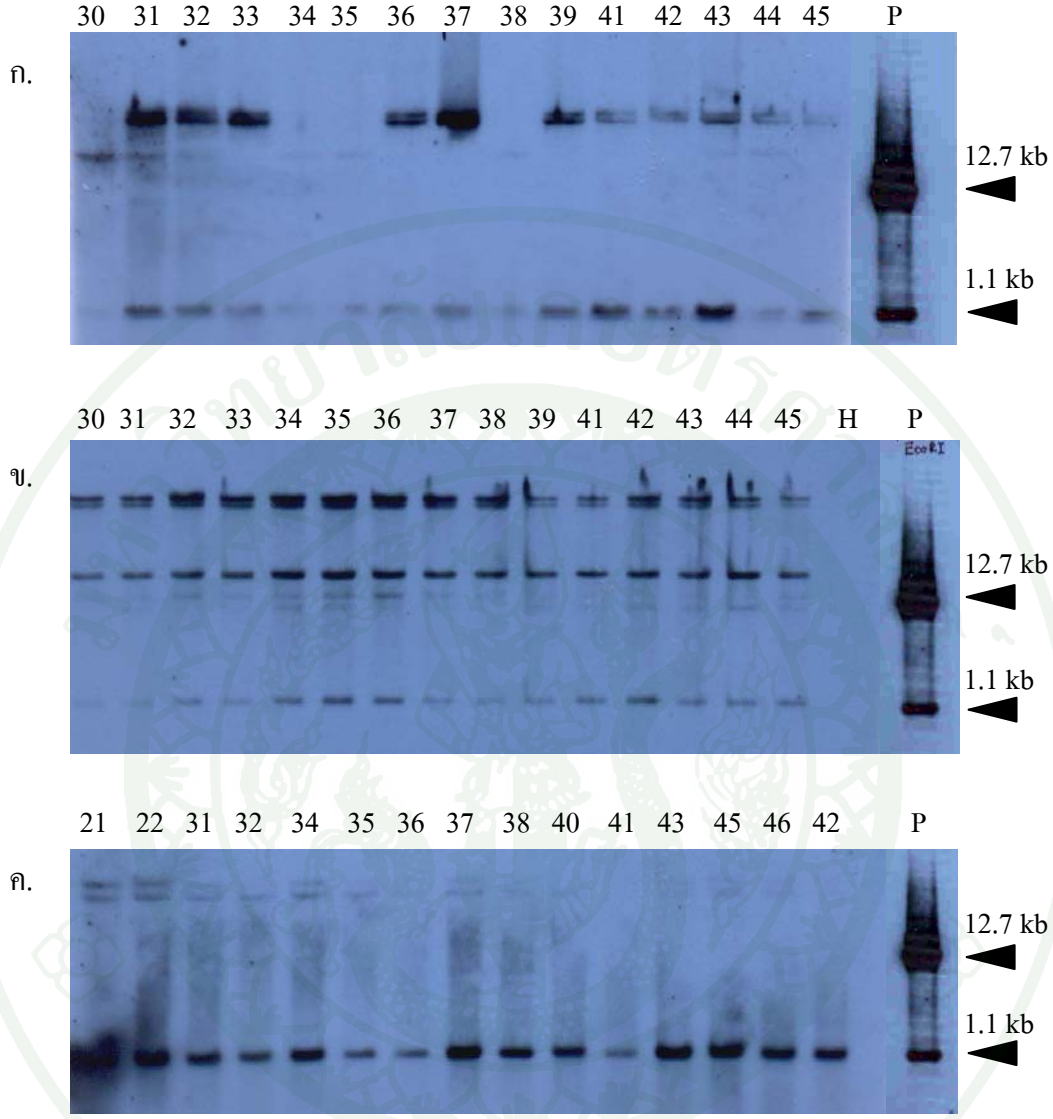
L-1 : ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 มี 2-3 copies

L-6-3 : ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 มี 4-5 copies

L-13 : ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 มี 2 copies

P : พลาสมิด pCMV N/B-23

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 ผลการตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซมมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ด้วยเทคนิค genomic Southern hybridization โดยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากนั้นใช้ replicase gene probe ที่ติดฉลากด้วยสาร Digoxigenin ตรวจผลไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence โดยใช้ CDP *star*™ substrate (H: ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศปกติไม่ถ่ายยีน และ P: พลาสมิด pCMV N/B-23)

ก. ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 มี 2-3 copies

ข. ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-6-3 มี 4-5 copies

ค. ดีเอ็นเอจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 มี 2 copies

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีรายงานว่า ความผันแปรของลักษณะการแสดงออกของ transgene เกิดจากความไม่แน่นอนของจำนวนชุดของ transgene ที่สอดแทรกบนโครโมโซม บ่อยครั้งพบว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการสอดแทรกจำนวนชุดของยีนเป็นจำนวนมาก มักจะมีการแสดงออกของ transgene ในระดับต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รูปแบบการสอดแทรกที่ซับซ้อนอย่างการที่ transgene มีการเรียงตัวซ้ำกันของลำดับเบสต่อเนื่องกันเป็นช่วงยาว (tandem repeat) หรือ โครงสร้างที่มีลำดับเบสที่กลับทิศทางกัน (inverted repeat (IR) structures) การลดการแสดงออกของ transgene ที่มีจำนวนชุดมากเป็นผลมาจากการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง homologous sequences (homology-dependent gene silencing: HDGS) คือ เกิดการเข้าคู่กันเองของ transgene ทำให้ไปลดการแสดงออกของ transgene ที่มีจำนวนชุดของยีนเป็นจำนวนมากในกระบวนการ transcriptional ทำให้เกิด transcriptional gene silencing (TGS) คือ เกิดการเข้าคู่กันเองของ transgene จนทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ RNA ได้ หรือในกระบวนการ post-transcriptional ทำให้เกิด post-transcriptional gene silencing (PTGS) คือ เกิดการเข้าคู่กันเองของ transgene ในระดับ RNA ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ (Jana *et al*., 2004; Butaye *et al.*, 2005) เช่นในรายงานของ Liu *et al*. (2003) พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ F-DH-13 ที่มีจำนวนชุดของ transgene 5 ชุด มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส TSWV ลดลงในรุ่น R_2 และมีต้นเป็นโรคมากถึง 91% ในรุ่น R_6 ในขณะที่สายพันธุ์ F-DH-02 ที่มีจำนวนชุดของ transgene เพียง 2 ชุด มีความต้านทานต่อโรคลดลงเล็กน้อยในรุ่น R_3 และมีต้นเป็นโรคเพียง 1 % ในรุ่น R_6 เมื่อนำสายพันธุ์ F-DH-13 รุ่น R_1–R_3 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Northern blot พบว่าต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมในรุ่น R_1 และ R_2 ที่ต้านทานต่อโรค มีการสะสมของ RNA ในระดับต่ำ ส่วนต้นที่อ่อนแอต่อโรครุ่น R_3 พบว่ามีการสะสมของ RNA ในระดับสูง แสดงให้เห็นว่าจำนวนชุดของ transgene ที่สอดแทรกเข้าไปเป็นสาเหตุของความไม่เสถียรของลักษณะความต้านทานในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นหลัง เนื่องจากการมีจำนวนชุดของยีนเป็นจำนวนมากเป็นการสนับสนุนให้เกิด TGS ได้ สามารถอธิบายการศึกษาจำนวนชุด (copy number) ของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 และ R_2 ถึงสาเหตุที่สายพันธุ์ L-6-3 ที่พบจำนวนชุดของยีน 4-5 copies แสดงความต้านทานต่อโรคลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีความต้านทานสูงสุดถึง 100% อย่างสายพันธุ์ L-13 ที่พบ 2 copies ทั้งที่ 2 สายพันธุ์นี้สามารถถ่ายทอดยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์จนเข้าสู่ homozygous ในรุ่น R_3 ได้เหมือนกัน หรือในบางกรณีอาจไม่เป็นไปตามนี้ เช่นในกรณีที่จำนวนชุดของยีนเท่ากันอย่างในสายพันธุ์ L-1 ที่มี 2-3 copies และ L-13 ที่มี 2 copies

การที่มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-1 กับสายพันธุ์ L-13 ที่มีจำนวนชุดของยีนเท่ากัน แต่สายพันธุ์ L-1 กลับแสดงความต้านทานต่อโรคลดลง ในขณะที่สายพันธุ์ L-13 แสดง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความต้านทานต่อโรคสูงขึ้นถึง 100% ในรุ่น R_3 พบว่าตำแหน่งบนโครโมโซมที่ transgene มีการสอดแทรกเข้าไปเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน แม้ว่าจะมีจำนวนชุดของ transgene เท่ากัน ถ้ามีการสอดแทรก transgene บนโครโมโซมที่ตำแหน่งเดียวกันระดับการแสดงออกของ transgene ที่ได้จะเหมือนกัน ในขณะเดียวกันถ้ามีการสอดแทรกในตำแหน่งที่ต่างออกไป ส่งผลให้การแสดงออกของ transgene เกิด silencing ได้เช่นกัน (Christopher *et al*., 2000)

จากรายงานการใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) ในการศึกษาตำแหน่งของ transgene บนโครโมโซมในระยะ metaphase ที่ปรายรากของพืช พบว่าไม่ว่าจะเป็นการถ่ายยีนโดยใช้ Agrobacterium เข้าสู่ต้นข้าว (Jin *et al*., 2002) หรือใช้ microprojectile bombardment เข้าสู่ต้นโอ๊ต (Svitashev *et al*., 2000; Svitashev and Somers, 2002) ต่างก็ให้ผลการทดลองที่เหมือนกันคือ ตำแหน่งที่ transgene สอดแทรกเข้าไปพบได้ทั้งบริเวณแขนสั้นและแขนยาวแตกต่างกันไปตามความยาวของโครโมโซม แต่พบว่า transgene มักจะสอดแทรกเข้าไปในบริเวณส่วนปลายของโครโมโซม ในขณะที่ไม่ค่อยพบ transgene สอดแทรกใกล้กับบริเวณ centromeres ซึ่งสัมพันธ์กับความจริงที่ว่าบริเวณส่วนปลายของโครโมโซมเป็นบริเวณที่มียีนของพืชอยู่เป็นจำนวนมาก ในขณะที่บริเวณ heterochromatin ส่วนใหญ่จะอยู่ใกล้กับ centromeres ดังนั้น transgene ที่มีการสอดแทรกเข้าไปในบริเวณ heterochromatin ผลที่ได้คาดว่า จะมีการแสดงออกของ transgene ในระดับที่ต่ำหรือเกิด silencing (Svitashev *et al*., 2000; Jin *et al*., 2002; Svitashev and Somers, 2002)

นอกจากปัจจัยที่เกิดจากตำแหน่งบนโครโมโซมแล้ว ยังพบว่า DNA methylation เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเช่นกัน มีรายงานว่า ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *Cp-gus* ด้วยวิธีการเดียวกัน ถูกนำมาตรวจสอบจนแน่ใจว่ามีจำนวนชุดของยีน *Cp-gus* เพียง 1 ชุด เพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อลักษณะการแสดงออกที่ผันแปรของ transgene พบว่ายาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ มีระดับการแสดงออกของยีน *Cp-gus* ต่างกัน เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค Southern blot โดยนำจีโนมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับตำแหน่งบน ยีน *Cp-gus* แล้วตรวจสอบด้วย probe ที่จำเพาะต่อยีน *gus* พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของ GUS มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอตรงตามที่คาดการณ์ไว้ ตรงข้ามกับต้นยาสูบที่ไม่มีการแสดงออกของ GUS พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดไม่ตรงตามที่คาดการณ์ไว้ เนื่องมาจากมีความปกติเกิดขึ้นกับลำดับเบสตรงตำแหน่งตัดจำเพาะทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะไม่สามารถตัดได้ และความผิดปกตินี้ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส แต่เกิดจาก DNA methylation (Christopher

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

et al., 2000) ที่มีการเติมหมู่ methyl ที่ตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine เป็น 5-methylcytosine (cytosine methylation) (Matzke and Matzke, 1998)

จากปัจจัยทั้งหมดที่กล่าวมาเบื้องต้น พบว่าลักษณะการแสดงออกของ transgene สามารถถูกควบคุมด้วยปัจจัยอื่นๆ เช่น MARs (Allen *et al*., 2000, 2005) และ การจัดเรียงตัวใหม่ของโครงสร้างโครโมโซม (Svitashev *et al*.,2000; Svitashev and Somers, 2002) ลำดับดีเอ็นเอบนโครมาตินที่มีตำแหน่งจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ nuclear matrix ในระยะที่มีการจัดเรียงตัวเป็นโครโมโซม ทำให้โครมาตินมีลักษณะคล้ายห่วง (loop domains) หรือที่เรียกว่า Matrix attachment regions (MARs) เมื่อนำ MARs มาเชื่อมติดกับบริเวณปลายด้าน 3’ และ 5’ ของ transgene พบว่า MARs ช่วยเพิ่มความคงตัวของการแสดงออกของ transgene และมีบทบาทในการลดการเกิด silencing ของ transgene แต่ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่ากลไกของ MARs ไปเพิ่มความคงตัวของการแสดงออกของ transgene ได้อย่างไร (Allen *et al*., 2005) แต่จากแบบจำลองของ Allen *et al*. (2000) แสดงการคาดเดาว่า การมีอยู่ของ MARs ที่ปลาย 3’ และ 5’ ของ transgene ส่งผลให้โครมาตินไปยึดเกาะกับ nuclear matrix ถี่เพียงพอที่จะช่วยป้องกันการเข้าคู่กันระหว่าง transgene ด้วยกัน อันเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิด gene silencing ตรงตำแหน่งของ transgene

เนื่องจากการแสดงออกของ transgene ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีความผันแปรเกิดขึ้นได้บ่อยครั้งภายในประชากรพืชดัดแปลงพันธุกรรม และไม่สามารถคาดเดาลักษณะการแสดงออกได้ (Butaye *et al*., 2005) เพราะฉะนั้น ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้จะได้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13-47 L-13-76 และ L-13-90 ที่แสดงลักษณะความต้านทานถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในรุ่น R_3 แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าลักษณะความต้านทานที่ได้จะยังคงอยู่และถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ถึงชั่วที่เท่าไร ลักษณะความต้านทานที่ได้อาจจะคงอยู่ไปจนถึงรุ่น R_9 เหมือนกับมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ TSWV ในงานวิจัยของ Liu *et al.* (2003) หรือผันแปรไปตั้งแต่รุ่นแรกๆ ก็เป็นได้ จึงได้นำมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ มาขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อผลิตต้นมะเขือเทศที่ยังคงลักษณะความต้านทานที่ดีไว้ใช้ประโยชน์ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม 5 สายพันธุ์ รุ่น R_1 ที่มาจากรุ่น R_0 พบว่าต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดรุ่น R_1 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย L-1 L-6-3 และ L-13 สามารถต้านทานต่อการปลูกเชื้อ CMV ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง ลักษณะการต้านทานเทียบได้กับ immunity คือ พืชไม่แสดงอาการของโรคและตรวจไม่พบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค ELISA ในขณะที่ต้นอ่อนแอแสดงอาการของโรคและตรวจพบไวรัสในปริมาณสูง เมื่อนำข้อมูลจากการตรวจสอบความต้านทานโรค มาวิเคราะห์การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมจากรุ่น R_0 ไปยัง R_1 ทางสถิติโดยวิธี χ^2-test พบว่าทุกสายพันธุ์มีอัตราการกระจายตัว <3:1 แตกต่างจากกฎของเมนเดล

เมื่อคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ที่มีความต้านทานโรคจากสายพันธุ์ L-1 L-6-3 และ L-13 มาทดสอบความต้านทานต่อในรุ่น R_2 และ R_3 พบว่าลักษณะความต้านทานสามารถถ่ายทอดไปอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะกลุ่มสายพันธุ์ L-13 ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ L-13-47 L-13-76 และ L-13-90 มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงสุดถึง 100% รองลงมาคือ L-13-3 และ L-13-10 มีความต้านทาน 98.89% และ 98.86% ในรุ่น R_3 ในขณะที่กลุ่มสายพันธุ์ L-1 และ L-6-3 คือ L-1-22 L-1-46 และ L-6-3-34 ต้านทานเพียง 1.22% 55.95% และ 8.43% ตามลำดับ ในขณะที่ L-6-3-23 ไม่มีความต้านทาน

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Post ANOVA analysis โดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD) พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV สามารถให้ค่าเฉลี่ยจำนวนผลและค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลได้ไม่แตกต่างจากต้นมะเขือเทศปกติปลอดโรค และดีกว่าต้นมะเขือเทศปกติที่เป็นโรค ทั้งด้านปริมาณและน้ำหนักของผลผลิต

การตรวจสอบยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1-R_3 ด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 2.48 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอบางส่วนของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ที่สอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมมะเขือเทศ เมื่อนำค่าการตรวจสอบยีนที่ได้จากเทคนิค PCR ในรุ่น R_2 มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี χ^2-test เพื่อศึกษาการกระจายตัวของยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ พบว่ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมมีอัตราการกระจายตัวของยีนเป็นอัตราส่วน 3:1 จำนวน 2 สายพันธุ์คือ L-1 และ L-13 และมีอัตราส่วน 15:1 จำนวน 1 สายพันธุ์คือ L-6-3 และสามารถตรวจพบยีนในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทุกต้นในทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบในรุ่น R_3

การใช้เทคนิค genomic Southern hybridization ตรวจสอบจำนวนชุดของยีนบนโครโมโซมมะเขือเทศ พบว่ามีจำนวนชุดของยีนแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ L-1 มีจำนวนชุดของยีน 2-3 copies สายพันธุ์ L-6-3 มีจำนวนชุดของยีน 4-5 copies และ สายพันธุ์ L-13 มีจำนวนชุดของยีน 2 copies

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่พัฒนาให้มีความต้านทานต่อโรค สามารถถ่ายทอด transgene จากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูก และมีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ homozygous ในรุ่น R_2 ในขณะที่ลักษณะของความต้านทานที่ได้มีความผันแปรแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ L-13 ในรุ่น R_3 มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงสุดเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาให้เป็นพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งต่อไปควรทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ L-13 เพิ่มเติมในรุ่น R_4 และ R_5 เพื่อดูความคงตัวของลักษณะการแสดงออกของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์บนโครโมโซม (phenotype) และทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันในประเทศไทย และเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ เพื่อดูความจำเพาะเจาะจงของลักษณะความต้านทานต่อชนิดของไวรัส รวมไปถึงศึกษากลไกความต้านทานต่อเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ในระดับอาร์เอ็นเอหรือโปรตีน ตลอดจนทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ เพื่อตรวจสอบความสามารถในการส่งผ่าน transgene ไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (horizontal transfer) ว่าไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับ transgene และสิ่งแวดล้อม ก่อนมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรุง สีตะธานี. 2543. **การปลูกมะเขือเทศ**. พิมพ์ครั้งที่ 1 ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

กรุง สีตะธานี, ธีรพล ครุฑรังสิต, ธีรวัฒน์ กษิรวัฒน์, เฉลย ดวงตา และ ดำรง จิรศานต์ชัย. 2537. การพัฒนาสายพันธุ์มะเขือเทศทนร้อน ผลเล็ก สีชมพู เพื่อรับประทานสด, น. 1-12. *ใน* **การประชุมสรุปผลงานวิจัยผักและถั่ว ครั้งที่ 2**. 12-13 มกราคม 2537, ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

จานุลักษณ์ ขนบดี. 2535. **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ธีระ สูตะบุตร. 2532. **โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย**. ห้างหุ้นส่วนจำกัดฟันนี่พับบลิชิง, กรุงเทพฯ.

ภูวนารถ มณีโชติ, พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, ประสาทพร สมิตะมาน, ปริฉัตร พละพึง และ รัชนี ฮงประยูร. 2552. ความผันแปรทางพันธุกรรมและสมบัติบางประการของ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกได้จากแตงกวาในประเทศไทย, น. 67. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9**. โรงแรมสุนีย์ แกรนด์, อุบลราชธานี.

มณีฉัตร นิกรพันธุ์. 2538. **มะเขือเทศ**. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

วรพงศ์ ถิรธนกุล. 2547. **การถ่ายยีนเรพลิเคสของไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและไวรัสใบด่างแตงเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัต. 2536. **โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ**. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

ศูนย์สารสนเทศการผลิตทางการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร. 2550. **ข้อมูลเนื้อที่เพาะปลูก**. แหล่งที่มา: http://production.doae.go.th/, 14 มิถุนายน 2551.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2545. **พืชดัดแปลงพันธุกรรม**. หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมด้านพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. (อัดสำเนา)

สุพัฒน์ อรรถธรรม, พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, ทิพย์วดี อรรถธรรม, วิชัย โฆสิตรัตน, ธีระ สูตะบุตร, เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และ นุชนาถ แซ่อึ้ง. 2535. การสร้างพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานโรคโดยการถ่ายยีน, น. 193-200. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30 (สาขาพืช)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุพัฒน์ อรรถธรรม, อัญจนา บุญชด, เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ และ พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2548. การประเมินความเสียหายของผลผลิตมะเขือเทศที่ถูกเชื้อไวรัสใบด่างแตงเข้าทำลาย. **ว. วิทย.กษ.** 36 (5-6): 337-341.

สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง. 2544. **การศึกษาความต้านทานต่อไวรัสของพริกบางช้างจำลองพันธุ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2549. **สถิติการเกษตร**. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49/section4/sec4table65.pdf, 14 มิถุนายน 2551.

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

อัญชลี รวีโรจน์วิบูลย์ และ จุลภาค คุ้นวงศ์. 2550. การตรวจสอบยีน *nptII* ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์สีดาทิพย์ 3 โดยการพ่นสารกานามัยซิน. **ว. วิทย.กษ.** 38 (1): 15-24.

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

Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology**. Elsevier Academic Press, Burlington, USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Allen, G.C., S. Spiker and W.F. Thompson. 2000. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. **Plant Molecular Biology** 43: 361-376.

Allen, G.C., S. Spiker and W.F. Thompson. 2005. Transgene integration use of matrix attachment regions, pp. 313-326. *In* L. Peña, ed. **Transgenic Plants Methods and Protocols**. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

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. USA.** 89: 8759-8763.

Andow, D.A., D.A. Somers, N. Amugune, F.J.L. Aragão, K. Ghosh, S. Gudu, E. Magiri, W.J. Moar, S. Njihia and E. Osir. 2004. Transgene locus structure and expression of Bt maize, pp. 83-116. *In* A. Hilbeck and D.A. Andow, eds. **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Volume 1. A Case Study of Bt Maize in Kenya**. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Blancard, D., H. Lecoq and M. Pitrat. 1994. **A Colour Atlas of Cucurbit Diseases Observation, Identification and Control**. Manson Publishing Ltd, London.

Boogaart, T.van den., F. Wen, J.W. Davies and G.P. Lomonossoff. 2001. Replicase-derived resistance against *Pea early browning virus* in *Nicotiana benthamiana* is an unstable resistance based upon posttranscriptional gene silencing. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 14 (2): 196-203.

Butaye, K.M.J., B.P.A. Cammue, S.L. Delauré and M.F.C. De Bolle. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. **Molecular Breeding** 16: 79-91.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Butaye, K.M.J., I.J.W.M. Goderis, P.F.J. Wouters, J.M.-T.G. Pues, S.L. Delauré, W.F. Broekaert, A. Depicker, B.P.A. Cammue and M.F.C. De Bolle. 2004. Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. **The Plant Journal** 39: 440–449.

Carr, J.P., A. Gal-On, P. Palukaitis and M. Zaitlin. 1994. Replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus* in transgenic plant involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long-distance movement. **Virology** 199: 439-447.

Cerkauskas, R. 2004. Tomato diseases *Cucumber mosaic virus* (CMV). *In* T. Kalb, ed. **AVRDC–The World Vegetable Center Fact Sheet**. AVRDC–The World Vegetable Center, Taiwan.

Christopher, D.D., E. Lee, J. Kobayashi, L.D. Holappa, H. Albert and D.W. Ow. 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. **Genes & Development** 14: 2869-2880.

Clark, M.F. and A.N. Adam. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** 34: 475-483.

Cornell Plant Pathology Vegetable Disease Web Page. 2006. **Tomato: Disease Resistance Table**. Available Source: http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/Tables/TomatoTable.html, June 21, 2008.

Ellis, J.R. 1993. Plant tissue culture and genetic transformation, pp. 253-285. *In* R.R.D. Croy**,** ed. **Plant Molecular Biology Lab Fax**. BIOS Scientific Publishers Limited, St. Thomas House, Becket Street, Oxford, UK.

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.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gallitelli, D. 2000. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. **Virus Research** 71: 9-12.

ICTVdB Management. 2006. **Descriptions and lists from the VIDE Database *cucumber mosaic cucumovirus***. Available Source: http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk, June 20, 2008.

Jana, S., C. Chakraborty and S. Nandi. 2004. Mechanisms and roles of the RNA-based gene silencing. **Journal of Biotechnology** 7 (3): 324-335.

Jianxiang, C.Y., 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.

Jin, W.-W., Z.-Y. Li, Q. Fang, I. Altosaar, L.-H. Liu and Y.-C. Song. 2002. Fluorescence in situ hybridization analysis of alien genes in Agrobacterium-mediated Cry1A(b)-transformed rice. **Annals of Botany** 90: 31-36.

Johnston, J., L. Blancas and A. Borem. 2004. Gene flow and its consequences: a case study of Bt maize in Kenya, pp. 187-207. *In* A. Hilbeck and D.A. Andow, eds. **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Volume 1. A Case Study of Bt Maize in Kenya**. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Jones, Jr., J.B. 1999. **Tomato Plant Culture in the Field, Greenhouse, and Home Garden**. CRC Press LLC, Florida.

Kaniewski, W. and C. Lawson. 1997. Coat protein and replicase-mediated resistance to plant virus, pp. 65-78. *In* A. Hadidi, R.K., Khetarpal and H. Koganezawa, eds. **Plant Virus Disease Control**. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Liu, Y.S., J.S. Levin, J.S. Murray, E.A. Wernsman and A.K. Weissinger. 2003. A multi-generation analysis of the stability of transgenic virus resistance in doubled-haploid tobacco lines. **Molecular Breeding** 12: 145-156.

Masuta, C., Y. Seshimo, M. Mukohara, H.J. Jung, S. Ueda, K.H. Ryu and J.K. Choi. 2002. Evolutionary characterization of two lily isolates of *Cucumber mosaic virus* isolated in Japan and Korea. **J. Gen. Plant Pathol.** 68: 163-168.

Matzke, A.J.M. and M.A. Matzke. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. **Plant Biology** 1: 142-148.

Meixner, M., U. Schneider, O. Schieder and T. Pickardt. 1995. Studies on the stability of foreign genes in the progeny of transgenic lines of *Vicia narbonensis*, pp. 285-290. *In* M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna, eds. **Current Issue in Plant Molecular and Cellular Biology**. Kluwer Academic Publishers, London.

Meixner, M., S. Brinkmann, O. Schieder and T. Pickardt. 1996. Genetic stability and expression of foreign genes in transgenic lines of the legume *Vicia narbonensis*, pp. 249-260. *In* E.R. Schmidt and T. Hankeln, eds. **Transgenic Organisms and Biosafety**. Springer, Germany.

Morroni, M., J.R. Thompson and M. Tepfer. 2008. Twenty years of transgenic plants resistant to *Cucumber mosaic virus*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 21(6): 675-684.

Nunome, T., F. Fukumoto, F. Terami, K. Hanada and M. Hirai. 2002. Development of breeding materials of transgenic tomato plants with a truncated replicase gene of *Cucumber mosaic virus* for resistance to the virus. **Breeding Science** 52: 219-223.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pongsapich, P. and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of tospovirus infecting tomatoes in Thailand revealed the presence of serogroup IV-tospovirus but not serogroup I-tomato spotted wilt virus, p. 92. *In* **The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease**. 5-8 November 2002, The Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Roossinck, M.J. 2001. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. **Molecular Plant Pathology** 2 (2): 59-63.

Roossinck, M.J. 2002. Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. **Journal of Virology** 76 (7): 3382-3387.

Roossinck, M.J. and P. Palukaitis. 1990. Rapid induction and severity of symptoms in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) map to RNA1 of *Cucumber mosaic virus*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 3: 188-192.

Rosset, P., R. Rice and M. Watts. 1999. Thailand and the world tomato: globalization, new agricultural countries (NACs) and the agrarian question. **International Journal of Sociology of Agriculture and Food** 8: 71-94.

Schmülling, T. and J. Schell. 1993. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. **Plant Molecular Biology**. 21: 705-708.

Svitashev, S., E. Ananiev, W.P. Pawlowski and D.A. Somers. 2000. Association of transgene integration sites with chromosome rearrangements in hexaploid oat**. Theor. Appl. Genet.** 100: 872–880

Svitashev, S.K. and D.A. Somers. 2002. Characterization of transgene loci in plants using FISH: A picture is worth a thousand words. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 69: 205–214.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Topping, J.F. and K. Lindsey. 1997. Molecular characterization of transformed Plant, pp. 427-442. *In* M.S. Clark, ed. **Plant Molecular Biology A Laboratory Mannual**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.

Wintermantel, W.M. and M., Zaitlin. 2000. Transgene translatability increases effectiveness of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*. **Journal of General Virology** 81: 587-595.

Zaitlin, M., J.M. Anderson, K.L. Perry, L. Zhang and P. Palukaitis. 1994. Specificity of replicase-mediated resistance to *Cucumber Mosaic Virus*. **Virology** 201: 200-205.

Zhang, D. 2005. **Sequence Variability of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and its Effects on CMV-Resistance of *Capsicum* sp.**. Doctor rerum naturalium, Universität Hamburg.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ในการทดลองครั้งที่ 1 จำนวน 5 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 วันโดยใช้เทคนิค ELISA

ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน									
L-1		L-6-3		L-13		L-25		L-29-3	
ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$
1*	0.448	2	0.124	2	0.118	3*	1.117	4*	2.393
2	0.053	3*	0.947	3	0.116	14*	0.874	20*	1.584
6	0.032	13	0.105	4	0.090	21*	1.905	43*	0.900
9	0.034	18*	1.294	5*	0.920	39*	1.247	45	0.063
10	0.042	21*	0.479	6	0.101	50*	1.665	67*	0.672
12	0.042	22	0.099	10	0.069			91*	0.522
15	0.030	35*	1.199	15	0.069				
17*	0.300	38	0.121	18	0.115				
20	0.042	43	0.116	19	0.064				
21	0.055	49	0.093	21	0.075				
22	0.044	54*	0.927	22	0.063				
28	0.038	56	0.108	24*	0.889				
30	0.054	76	0.171	25	0.097				
32	0.047	80	0.107	27	0.052				
34	0.033			28	0.084				
38	0.052			30	0.074				
39*	0.348			36	0.082				
41	0.049			43	0.096				
42	0.038			45	0.096				
49	0.060			46	0.089				
52	0.041			47	0.150				
53	0.044			51*	0.729				
54	0.078			55	0.162				
57	0.036			56	0.090				
59	0.030			60	0.086				
60*	0.376			63*	0.842				

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน									
L-1		L-6-3		L-13		L-25		L-29-3	
ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$	ต้นที่	$O.D._{405}$
62	0.035			78	0.146				
64	0.032			80	0.124				
67	0.039			81	0.214				
69	0.041			82*	0.520				
71	0.038			83	0.003				
72	0.041								
76	0.045								
78	0.068								
79	0.071								
80	0.057								
81*	0.598								

* ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่แสดงอาการของโรค ที่ถูกสุ่มมาทดสอบ เพื่อเป็น positive control สายพันธุ์ละ 5 ต้น

ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส (negative control) เท่ากับ 0.094

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_1 ในการทดลองครั้งที่ 2 จำนวน 3 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 วันโดยใช้เทคนิค ELISA

ต้นมะเขือเทศที่นำมาทดสอบ	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13
1	0.117	0.105	0.107
2	0.100	0.109	0.088
3	0.101	0.097	0.085
4	0.095	0.095	0.089
5	0.093	0.095	0.082
6	0.100	0.092	0.104
7	0.095	-	0.088
8	0.093	0.091	0.090
9	0.102	0.095	0.086
10	0.104	-	0.091
11	0.109	0.107	0.092
12	0.130	0.115	0.104
13	0.107	0.102	0.105
14	0090	0.107	0.094
15	0.083	0.087	0.092
16	0.085	-	0.091
17	0.092	-	0.094
18	0.086	0.089	0.086
19	0.087	0.104	0.088
20	0.089	-	0.092
21	0.085	0.087	0.093
22	0.084	-	0.095
23	0.092	0.105	0.100
24	0.099	0.133	0.110
25	0.098	0.112	0.107
26	0.092	0.099	0.090
27	0.090	0.098	0.086
28	0.087	0.089	0.087

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ต้นมะเขือเทศที่นำมาทดสอบ	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13
29	0.082	0.096	0.080
30	0.087	0.099	0.089
31	0.086	0.105	0.082
32	0.085	0.097	0.085
33	0.083	0.100	0.086
34	0.086	0.099	0.098
35	0.084	0.121	0.090
36	0.101	0.125	0.124
37	0.097	0.102	0.126
38	0.081	0.096	0.110
39	0.083	-	0.098
40	0.076	0.098	0.094
41	0.084	0.089	0.087
42	0.081	0.099	0.093
43	0.081	-	0.137
44	0.083	-	0.107
45	0.078	-	0.113
46	0.080	-	0.109
47	0.084	-	0.115
48	-	-	0.099
49	-	-	0.113
50	-	-	0.105
51	-	-	0.109
52	-	-	0.100
53	-	-	0.103
54	-	-	0.123
55	-	-	0.132

ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อ (positive control) เท่ากับ 0.514
ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (negative control) เท่ากับ 0.118

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_2 ในการทดลองครั้งที่ 1-3 จำนวน 3 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 และ 60 วันโดยใช้เทคนิค ELISA

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13
1	0.102	0.820	1.147	0.144	1.304	1.574	1.368	1.238	1.519	1.463	0.930	0.583	0.597	0.163	0.266	1.113	0.121	0.129
2	0.095	0.152	0.128	0.135	0.161	0.222	0.587	1.656	1.284	1.368	0.892	1.479	0.135	1.498	0.987	0.126	0.398	1.355
3	0.107	0.138	0.114	0.154	0.115	0.139	1.157	1.225	0.091	0.747	1.582	0.193	0.212	0.127	0.137	0.148	0.153	0.193
4	0.099	0.127	1.237	0.199	0.153	1.819	0.108	2.653	0.637	0.204	1.507	1.423	0.205	1.003	0.137	0.139	1.277	0.124
5	0.115	0.128	0.731	0.174	0.132	1.305	0.110	1.946	1.261	0.148	0.957	1.069	0.158	1.562	0.199	0.193	1.173	0.220
6	0.113	0.127	0.741	0.104	0.187	1.446	0.105	1.183	0.084	0.138	0.702	0.143	0.201	0.930	0.142	0.211	1.692	0.135
7	0.105	0.128	1.557	0.156	0.139	1.236	0.109	2.639	1.045	0.133	1.135	1.379	0.216	0.142	0.174	0.209	0.178	0.132
8	0.104	0.129	0.125	0.191	0.166	0.162	0.116	0.881	1.203	0.130	1.222	1.213	0.195	0.153	0.204	0.208	0.210	0.163
9	0.116	0.140	0.128	0.142	0.126	1.864	0.105	0.989	0.083	0.207	0.887	0.145	1.295	0.136	0.156	1.266	0.136	0.146
10	0.124	0.141	1.234	0.105	0.127	1.641	0.100	2.204	1.154	0.201	1.478	0.439	0.245	1.142	0.142	0.188	0.400	0.137
11	0.127	0.546	0.162	0.127	1.438	0.105	1.954	1.203	1.275	1.049	1.561	1.045	0.123	0.214	0.117	0.106	0.819	0.128
12	0.139	0.167	1.815	0.188	0.105	0.522	1.485	2.226	0.937	1.354	1.083	0.956	1.143	0.187	0.211	1.594	0.137	0.122
13	0.106	0.863	0.136	0.199	1.305	0.183	0.742	1.482	1.311	0.825	0.948	0.507	0.225	0.138	0.263	0.123	0.149	0.139
14	1.096	0.989	0.124	1.413	1.742	0.220	1.436	2.819	1.228	0.627	1.838	1.426	0.902	1.549	0.203	0.454	1.093	0.188

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1]						การทดลองครั้งที่ 2[2]						การทดลองครั้งที่ 3[3]					
	20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13
15	0.088	0.118	0.121	0.137	0.155	0.131	0.836	1.781	0.096	0.500	1.584	0.112	0.267	1.252	0.219	0.152	1.316	0.198
16	0.100	0.104	0.130	0.146	0.182	0.136	1.091	2.399	1.382	0.618	1.345	1.206	0.185	0.201	0.195	0.191	0.166	0.122
17	0.089	0.107	0.131	1.043	0.134	0.171	1.285	0.201	1.181	1.396	0.137	1.422	0.173	1.624	0.496	0.129	1.203	0.434
18	0.104	0.109	0.121	0.101	0.139	0.204	0.112	2.841	0.571	0.135	1.424	0.648	1.066	1.442	1.495	1.236	1.299	1.141
19	0.098	0.112	0.977	0.119	0.187	1.430	0.101	1.332	1.118	0.203	1.369	1.163	0.144	0.119	0.143	0.194	0.156	0.131
20	0.102	0.111	1.120	0.114	0.169	1.221	1.099	2.173	1.647	0.834	0.685	1.005	1.509	0.143	0.129	1.343	0.124	0.208
21	0.101	0.118	0.123	0.102	0.192	0.102	0.111	2.802	0.084	0.177	0.607	0.141	1.559	0.125	0.691	1.301	0.119	0.443
22	0.097	0.121	1.149	0.151	0.133	1.217	2.213	2.626	1.309	1.262	1.227	1.567	1.917	1.521	0.151	1.269	1.156	0.128
23	0.099	0.120	0.133	0.134	0.144	1.739	0.103	1.843	0.090	0.130	1.416	0.138	1.415	1.086	1.346	0.396	1.365	0.375
24	1.222	0.135	0.156	1.295	0.141	0.196	0.112	2.665	2.255	0.209	1.675	0.749	0.138	0.200	1.632	0.176	0.125	0.398
25	0.100	0.140	0.126	0.117	0.174	0.838	0.099	2.226	0.942	0.139	0.945	1.486	1.267	0.503	0.149	0.812	1.336	0.212
26	1.165	0.125	0.129	1.395	0.183	0.162	1.626	2.677	0.112	0.627	0.651	0.171	0.144	0.817	0.213	0.132	1.475	0.187
27	0.090	0.115	0.866	0.137	0.183	0.352	2.915	0.182	1.228	1.402	0.201	1.121	1.311	0.110	1.519	1.743	0.196	0.943
28	0.088	0.099	0.126	0.136	0.183	0.166	2.904	1.697	1.059	0.541	1.039	1.342	0.194	0.198	0.204	0.149	0.195	0.124
29	1.125	0.106	0.117	1.367	0.133	0.157	0.138	1.547	2.195	0.145	0.838	1.377	0.202	1.662	0.151	0.129	1.401	0.220

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13
30	0.091	0.104	0.114	0.102	0.193	0.134	2.584	0.538	0.745	1.060	0.806	1.086	0.897	1.709	0.117	1.383	1.553	0.131
31	0.094	0.106	0.113	0.199	0.167	0.115	1.865	1.472	0.638	1.331	1.282	1.359	0.167	1.494	0.133	0.195	0.538	0.121
32	1.095	0.106	0.112	0.467	0.163	0.139	1.665	2.615	1.087	1.113	1.352	0.695	0.630	0.150	1.841	1.327	0.134	1.248
33	1.318	0.112	2.101	1.184	0.117	1.393	1.674	0.172	0.084	1.294	0.134	0.138	0.206	0.118	1.251	0.139	0.146	0.762
34	0.097	0.113	0.129	0.178	0.134	0.182	1.264	2.388	1.194	0.636	0.564	1.025	0.187	0.125	0.178	0.123	0.117	0.123
35	0.109	0.121	0.135	0.176	0.128	0.109	0.108	0.226	1.328	0.132	0.193	1.137	1.822	1.644	0.176	0.941	1.364	0.117
36	0.110	1.562	0.133	0.179	1.181	0.199	0.123	1.573	0.097	0.131	1.405	0.148	0.877	1.504	1.579	1.144	1.729	1.218
37	0.090	0.138	0.422	0.151	1.124	1.273	2.100	2.162	1.336	0.912	0.619	1.063	0.128	0.135	1.712	0.134	0.187	1.211
38	0.089	1.165	0.129	0.142	0.995	0.197	1.825	2.684	1.379	1.058	1.445	0.494	0.115	0.104	0.867	0.133	0.163	1.191
39	0.085	0.105	0.121	0.119	0.184	0.159	1.793	2.209	1.141	1.409	0.945	0.621	0.201	0.767	1.204	0.107	1.239	1.197
40	0.097	1.226	1.131	0.159	0.346	1.345	1.678	1.724	0.112	1.447	0.776	0.196	0.158	0.441	0.204	0.148	0.456	0.180
41	0.094	0.102	0.555	0.139	0.187	1.492	0.561	1.695	1.163	1.021	0.521	1.385	1.794	0.107	0.168	1.328	0.124	0.139
42	0.953	1.349	0.167	2.005	1.476	0.152	2.647	2.205	1.226	0.743	0.780	0.777	0.178	0.133	0.116	0.147	0.209	0.184
43	0.102	0.104	0.113	0.137	0.195	0.143	2.683	1.414	0.116	0.664	1.333	0.114	0.155	0.125	1.259	0.142	0.133	0.994
44	1.122	0.106	0.111	0.133	0.185	0.153	0.114	2.616	0.120	0.132	1.309	0.157	0.629	0.137	1.432	0.573	0.141	1.201

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1]						การทดลองครั้งที่ 2[2]						การทดลองครั้งที่ 3[3]					
	20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13
45	1.275	0.105	0.124	0.859	0.199	0.143	1.481	2.752	0.108	1.271	0.656	0.159	0.271	0.126	0.203	0.138	0.118	0.158
46	0.107	0.106	0.118	0.143	0.161	0.210	0.538	2.456	0.922	1.315	0.885	1.361	0.199	0.972	0.596	0.156	0.457	0.397
47	0.890	0.108	0.127	1.108	0.125	0.116	1.516	0.956	0.082	1.239	0.968	0.138	0.245	1.943	0.108	0.132	1.478	0.118
48	0.118	0.128	2.191	0.177	0.196	1.026	0.133	1.754	1.835	0.133	1.574	1.537	0.122	0.163	1.695	0.103	0.215	1.429
49	0.096	0.124	0.128	0.168	1.274	0.181	2.368	2.201	1.466	1.446	1.013	0.763	0.135	0.138	0.205	0.106	0.119	0.107
50	0.094	0.115	0.119	0.166	0.179	0.130	0.100	2.677	1.282	0.133	0.661	0.636	0.141	0.111	0.216	0.139	0.155	0.197
51	0.087	0.108	1.111	0.195	0.168	0.613	0.096	2.158	1.176	0.204	1.390	1.037	0.218	0.101	1.287	0.142	0.143	1.208
52	0.090	0.106	0.114	0.117	0.183	0.165	0.107	2.879	0.122	0.164	0.500	0.135	1.857	0.267	0.545	1.063	0.133	1.910
53	0.098	0.103	0.121	0.132	0.112	0.138	1.631	1.450	1.954	1.398	1.023	1.387	1.449	0.126	1.241	1.386	0.138	1.586
54	1.303	0.096	0.125	1.532	0.153	0.142	1.399	2.166	1.290	1.683	1.400	1.457	0.178	0.128	0.198	0.137	0.216	0.165
55	0.089	0.103	1.200	0.156	0.159	0.683	2.477	2.224	0.109	0.753	1.471	0.138	0.159	0.138	1.073	0.148	0.109	0.993
56	0.095	0.594	0.117	0.136	0.575	0.122	0.100	2.073	0.122	0.138	1.433	0.144	0.177	0.163	0.153	0.189	0.167	0.163
57	0.101	0.104	0.135	0.122	0.108	0.183	1.775	1.900	1.123	1.697	1.216	1.694	0.177	1.644	0.154	0.132	1.488	0.135
58	0.993	0.112	0.870	1.914	0.133	1.288	1.499	0.188	1.397	1.541	0.147	1.374	1.391	1.803	0.210	1.333	0.992	0.147
59	0.097	0.120	0.137	0.138	0.175	0.217	0.117	0.963	0.945	0.131	1.431	1.246	0.888	1.496	0.138	1.405	1.023	0.146

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13
60	0.109	0.118	0.982	0.156	0.149	1.358	1.114	2.480	1.532	0.747	1.241	0.849	0.234	2.165	0.156	0.105	1.294	0.121
61	0.123	0.123	0.125	0.135	0.121	0.148	2.186	1.981	1.218	0.953	1.504	1.290	0.128	0.151	0.177	0.128	0.135	0.114
62	0.103	1.333	1.750	0.163	0.681	1.356	0.937	0.536	1.401	1.245	0.676	1.599	0.119	0.109	0.149	0.133	0.115	0.191
63	0.111	0.110	0.127	0.159	0.106	0.143	1.700	1.637	1.469	1.302	1.124	0.812	1.414	0.200	1.047	1.233	0.169	1.201
64	0.101	0.102	0.118	0.138	0.147	0.199	1.257	0.714	1.305	0.844	0.507	1.173	-	0.225	0.185	-	0.119	0.129
65	0.097	0.100	1.056	0.153	0.154	1.525	1.522	1.771	1.382	1.099	1.174	0.948	-	0.123	0.184	-	0.106	0.198
66	0.113	0.101	0.143	0.134	0.128	0.214	0.107	2.440	1.301	0.145	0.522	1.479	-	1.339	0.483	-	0.983	1.317
67	0.733	0.104	0.136	1.703	0.117	0.198	1.907	1.068	0.118	1.242	0.736	0.159	-	0.164	0.643	-	0.197	1.247
68	0.098	0.111	0.126	1.646	0.127	0.156	1.169	2.177	1.046	0.505	0.528	1.502	-	1.395	0.177	-	1.439	0.157
69	0.099	0.112	1.356	0.145	0.118	0.837	2.505	1.714	0.780	0.918	1.348	1.675	-	1.041	0.216	-	1.283	0.138
70	0.102	0.113	1.087	0.131	0.116	1.326	0.121	1.763	1.086	0.142	0.677	1.037	-	0.169	1.405	-	0.138	1.179
71	1.543	1.749	0.145	1.445	1.342	0.215	1.260	-	1.604	0.919	-	1.573	-	1.638	0.145	-	0.353	0.129
72	0.118	0.135	0.137	0.158	0.114	0.151	1.388	-	0.106	2.069	-	0.166	-	0.136	0.158	-	0.134	0.118
73	0.120	0.131	0.122	0.177	0.123	0.152	1.150	-	1.367	1.383	-	0.689	-	0.116	0.164	-	0.199	0.114
74	0.087	-	-	0.149	-	-	1.511	-	0.124	1.038	-	0.144	-	0.114	1.454	-	0.176	0.729

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1]						การทดลองครั้งที่ 2[2]						การทดลองครั้งที่ 3[3]					
	20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13
75	0.092	-	-	0.127	-	-	0.109	-	1.531	0.174	-	0.696	-	0.195	0.159	-	0.161	0.126
76	0.096	-	-	0.140	-	-	2.162	-	0.632	1.168	-	1.471	-	1.441	0.101	-	1.433	0.126
77	1.098	-	-	0.977	-	-	2.011	-	0.564	0.554	-	1.092	-	1.500	0.106	-	1.531	0.229
78	1.087	-	-	1.389	-	-	0.975	-	0.100	1.038	-	0.139	-	0.135	0.195	-	0.122	0.229
79	0.093	-	-	0.154	-	-	0.991	-	1.115	1.684	-	1.575	-	0.122	0.185	-	0.138	0.117
80	0.090	-	-	0.139	-	-	1.397	-	1.187	1.171	-	1.381	-	1.411	1.861	-	1.328	1.482
81	-	-	-	-	-	-	0.125	-	0.113	0.154	-	0.167	-	1.479	0.155	-	0.352	0.223
82	-	-	-	-	-	-	1.253	-	0.106	1.093	-	0.153	-	0.222	0.639	-	0.177	1.297
83	-	-	-	-	-	-	1.284	-	1.686	0.999	-	1.114	-	0.180	0.317	-	0.187	1.818
84	-	-	-	-	-	-	1.174	-	1.593	0.968	-	1.022	-	0.143	0.109	-	0.148	0.173
85	-	-	-	-	-	-	1.055	-	0.545	1.381	-	0.579	-	1.253	1.599	-	1.065	1.227
86	-	-	-	-	-	-	0.101	-	2.017	0.128	-	0.498	-	1.418	0.122	-	1.242	0.210
87	-	-	-	-	-	-	1.514	-	1.712	1.041	-	1.054	-	0.199	0.981	-	0.146	2.218
88	-	-	-	-	-	-	0.128	-	2.001	0.152	-	1.431	-	1.429	1.712	-	1.276	1.357
89	-	-	-	-	-	-	2.259	-	0.888	1.223	-	1.199	-	-	0.171	-	-	0.207

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1]						การทดลองครั้งที่ 2[2]						การทดลองครั้งที่ 3[3]					
	20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน			20 วัน			60 วัน		
	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13	L-1	L-6-3	L-13
90	-	-	-	-	-	-	2.174	-	0.097	1.593	-	0.140	-	-	1.714	-	-	0.732
91	-	-	-	-	-	-	1.846	-	0.090	1.502	-	0.142	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	1.587	-	0.101	1.146	-	0.136	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-	0.128	-	-	0.139	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-	-	1.784	-	-	1.083	-	-	-	-	-	-	-	-

[1] หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของ positive control เท่ากับ 1.139 และ negative control เท่ากับ 0.109
หลังการปลูกเชื้อ 60 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของ positive control เท่ากับ 1.191 และ negative control เท่ากับ 0.162

[2] หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของ positive control เท่ากับ 2.014 และ negative control เท่ากับ 0.147
หลังการปลูกเชื้อ 60 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของ positive control เท่ากับ 1.162 และ negative control เท่ากับ 0.153

[3] หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของ positive control เท่ากับ 1.232 และ negative control เท่ากับ 0.178
หลังการปลูกเชื้อ 60 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของ positive control เท่ากับ 1.054 และ negative control เท่ากับ 0.145

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัส CMV ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_3 ในการทดลองครั้งที่ 1-3 จำนวน 9 สายพันธุ์ภายหลังการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ 30RS เป็นเวลา 20 และ 40 วันโดยใช้เทคนิค ELISA

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน		
	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-13-47	L-13-76	L-13-90	L-13-47	L-13-76	L-13-90
1	0.499	1.306	0.092	2.267	0.776	0.175	1.293	2.976	0.084	0.792	1.751	0.211	0.185	0.187	0.157	0.396	0.275	0.292
2	0.647	1.515	0.091	1.470	2.190	0.136	0.103	3.242	0.079	0.153	0.942	0.172	0.144	0.162	0.127	0.251	0.273	0.249
3	0.786	1.512	0.090	1.479	2.082	0.196	1.245	3.055	0.075	0.936	1.212	0.154	0.136	0.170	0.143	0.306	0.241	0.263
4	1.801	0.994	0.091	1.545	1.422	0.174	0.092	3.126	0.084	0.136	1.410	0.139	0.149	0.171	0.144	0.241	0.237	0.252
5	1.503	0.974	0.093	2.136	0.574	0.154	0.091	2.733	0.080	0.128	0.434	0.132	0.139	0.168	0.150	0.231	0.400	0.229
6	1.631	1.264	0.089	1.511	1.111	0.194	0.094	3.101	0.079	0.136	1.068	0.137	0.146	0.166	0.178	0.267	0.239	0.240
7	1.753	1.527	0.089	1.714	1.867	0.156	0.093	3.034	0.081	0.130	1.865	0.126	0.158	0.144	0.141	0.402	0.247	0.236
8	1.398	1.514	0.089	1.165	1.725	0.144	0.092	2.894	0.079	0.131	1.499	0.136	0.130	0.156	0.145	0.262	0.300	0.316
9	0.689	1.448	0.090	1.147	1.244	0.192	1.236	0.203	0.076	1.180	0.135	0.131	0.140	0.152	0.149	0.248	0.282	0.234
10	1.539	1.353	0.622	1.162	1.297	0.810	1.226	3.126	0.080	1.272	1.438	0.132	0.144	0.154	0.147	0.270	0.244	0.385
11	1.599	0.819	0.090	1.218	1.912	0.150	0.088	3.152	0.084	0.141	2.085	0.144	0.152	0.144	0.159	0.252	0.423	0.257
12	1.534	1.370	0.095	1.151	1.687	0.178	0.901	2.902	0.092	1.221	2.171	0.160	0.156	0.159	0.155	0.316	0.310	0.310
13	2.073	1.328	0.090	1.159	1.163	0.194	0.093	3.029	0.084	0.144	0.774	0.171	0.188	0.159	0.132	0.226	0.231	0.261

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน		
	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-13-47	L-13-76	L-13-90	L-13-47	L-13-76	L-13-90
14	1.272	1.380	0.086	1.421	1.821	0.172	0.082	3.161	0.077	0.133	1.800	0.142	0.119	0.140	0.125	0.373	0.205	0.220
15	1.283	1.482	0.088	1.981	1.613	0.154	1.103	3.090	0.073	1.237	0.328	0.139	0.118	0.140	0.119	0.245	0.200	0.300
16	2.077	1.274	0.088	1.253	1.468	0.156	0.350	3.245	0.075	0.556	1.588	0.116	0.116	0.127	0.121	0.232	0.190	0.212
17	1.461	1.349	0.094	1.923	1.050	0.122	0.807	0.196	0.075	0.481	0.120	0.124	0.120	0.131	0.129	0.208	0.337	0.207
18	1.534	1.469	0.088	2.280	0.886	0.170	1.075	3.048	0.735	0.346	1.171	0.683	0.118	0.125	0.133	0.260	0.332	0.203
19	1.421	1.465	0.087	0.867	1.457	0.135	1.000	3.112	0.082	1.498	1.249	0.109	0.119	0.141	0.132	0.207	0.326	0.200
20	1.002	1.570	0.088	0.910	1.643	0.116	0.090	3.011	0.071	0.120	1.464	0.106	0.130	0.172	0.133	0.274	0.179	0.203
21	1.324	0.844	0.090	0.556	1.453	0.140	1.080	3.090	0.072	1.772	1.946	0.109	0.124	0.135	0.131	0.297	0.237	0.226
22	1.557	1.233	0.087	1.944	1.606	0.261	0.091	3.048	0.078	0.124	0.448	0.118	0.128	0.163	0.139	0.226	0.349	0.206
23	0.990	0.521	0.087	1.647	1.876	0.150	1.063	3.187	0.079	0.814	2.013	0.133	0.142	0.142	0.143	0.336	0.252	0.203
24	1.639	1.690	0.090	0.631	1.295	0.175	0.093	3.029	0.081	0.143	0.452	0.143	0.144	0.148	0.149	0.289	0.369	0.229
25	1.294	1.045	0.090	1.163	1.131	0.195	0.932	2.905	0.086	1.428	1.425	0.175	0.146	0.157	0.136	0.248	0.232	0.275
26	0.851	1.668	0.091	1.361	1.510	0.166	1.033	3.006	0.079	0.813	0.990	0.128	0.138	0.145	0.140	0.217	0.203	0.223
27	1.561	1.797	0.091	1.116	1.648	0.194	0.085	3.163	0.089	0.121	1.786	0.120	0.162	0.136	0.155	0.210	0.267	0.202

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน		
	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-13-47	L-13-76	L-13-90	L-13-47	L-13-76	L-13-90
28	1.007	1.087	0.092	1.347	1.233	0.134	1.023	3.045	0.076	0.585	1.884	0.116	0.118	0.143	0.121	0.256	0.179	0.252
29	1.322	1.032	0.097	1.529	1.108	0.146	0.939	2.876	0.082	1.475	1.218	0.116	0.119	0.137	0.124	0.277	0.192	0.207
30	1.334	1.178	0.094	1.158	1.856	0.137	0.090	0.180	0.072	0.135	0.117	0.125	0.119	0.129	0.132	0.333	0.209	0.199
31	1.441	1.567	0.094	1.128	1.576	0.135	0.082	3.025	0.085	0.118	1.157	0.108	0.122	0.125	0.117	0.210	0.294	0.202
32	1.495	1.166	0.093	1.726	1.509	0.136	0.799	3.067	0.080	2.360	0.633	0.116	0.114	0.136	0.124	0.279	0.213	0.217
33	1.245	1.399	0.092	1.050	1.198	0.142	1.016	3.067	0.081	0.838	0.926	0.122	0.123	0.132	0.133	0.214	0.192	0.203
34	1.289	1.403	0.092	1.431	1.273	0.142	0.088	3.192	0.079	0.115	0.845	0.129	0.120	0.128	0.120	0.213	0.207	0.192
35	1.163	1.189	0.090	2.110	1.261	0.161	0.086	3.112	0.074	0.122	0.568	0.123	0.118	0.135	0.132	0.127	0.222	0.222
36	1.317	0.688	0.095	1.292	1.453	0.138	0.094	3.067	0.085	0.144	1.764	0.142	0.140	0.172	0.152	0.274	0.423	0.244
37	0.941	0.869	0.090	1.226	1.361	0.150	0.093	2.772	0.081	0.153	1.185	0.167	0.187	0.162	0.141	0.340	0.248	0.263
38	0.973	1.374	0.087	1.546	0.527	0.180	0.085	0.160	0.077	0.134	0.120	0.131	0.142	0.126	0.114	0.225	0.209	0.224
39	1.070	1.162	0.085	1.117	1.299	0.152	0.071	3.095	0.078	0.137	1.466	0.113	0.114	0.120	0.126	0.280	0.199	0.218
40	1.531	1.563	0.086	1.684	1.611	0.147	0.068	3.117	0.073	0.124	0.625	0.113	0.130	0.127	0.128	0.302	0.191	0.208
41	1.333	1.018	0.090	1.254	1.108	0.145	0.085	0.151	0.069	0.102	0.119	0.117	0.132	0.132	0.124	0.209	0.239	0.303

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน		
	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-13-47	L-13-76	L-13-90	L-13-47	L-13-76	L-13-90
42	1.500	0.715	0.086	1.152	1.865	0.138	0.739	3.117	0.073	1.255	1.394	0.115	0.130	0.121	0.127	0.214	0.312	0.221
43	1.869	0.960	0.091	0.777	0.924	0.130	0.903	3.015	0.072	1.425	0.928	0.100	0.118	0.119	0.123	0.296	0.207	0.208
44	1.208	1.675	0.088	1.540	2.165	0.160	0.077	3.095	0.069	0.108	0.657	0.109	0.124	0.121	0.118	0.199	0.335	0.205
45	0.520	1.004	0.089	1.156	0.438	0.142	0.085	3.053	0.077	0.120	0.893	0.112	0.132	0.115	0.126	0.300	0.233	0.209
46	1.310	1.487	0.090	1.311	0.798	0.146	0.979	3.095	0.071	1.259	1.382	0.120	0.127	0.122	0.109	0.284	0.332	0.223
47	0.623	1.008	0.087	1.941	1.748	0.170	0.078	3.140	0.075	0.102	1.059	0.113	0.122	0.128	0.113	0.303	0.406	0.221
48	1.052	0.886	0.089	1.138	0.791	0.210	0.750	3.073	0.077	0.643	1.720	0.131	0.140	0.159	0.163	0.340	0.240	0.232
49	1.305	0.873	0.092	1.344	1.331	0.202	0.925	2.956	0.080	1.225	1.191	0.179	0.167	0.147	0.134	0.272	0.234	0.275
50	1.599	1.299	0.089	2.304	1.611	0.190	0.856	2.882	0.078	1.589	1.155	0.127	0.137	0.127	0.126	0.223	0.218	0.214
51	1.252	0.522	0.091	2.406	1.207	0.166	0.102	3.308	0.081	2.213	1.013	0.120	0.126	0.136	0.134	0.248	0.185	0.217
52	1.438	1.383	0.090	1.363	1.214	0.128	0.080	3.086	0.075	0.134	1.975	0.119	0.122	0.136	0.115	0.253	0.184	0.227
53	1.310	0.949	0.093	1.350	1.476	0.162	0.895	2.940	0.076	1.683	1.401	0.120	0.116	0.140	0.122	0.243	0.214	0.249
54	0.444	0.923	0.089	1.126	1.616	0.130	0.892	3.045	0.067	0.510	0.490	0.114	0.115	0.137	0.121	0.215	0.194	0.218
55	0.155	1.693	0.095	0.240	1.599	0.174	0.079	2.989	0.072	0.118	1.554	0.113	0.124	0.130	0.116	0.248	0.217	0.205

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน		
	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-13-47	L-13-76	L-13-90	L-13-47	L-13-76	L-13-90
56	1.457	1.660	0.094	1.245	0.922	0.163	0.518	3.007	0.077	1.955	1.564	0.114	0.121	0.134	0.115	0.235	0.185	0.192
57	1.312	1.481	0.097	0.914	1.374	0.161	0.901	3.273	0.077	1.447	1.090	0.118	0.119	0.132	0.121	0.403	0.215	0.204
58	1.359	1.122	0.093	1.372	1.584	0.134	0.934	3.025	0.079	1.691	2.042	0.129	0.136	0.150	0.126	0.301	0.191	0.192
59	1.225	1.525	0.093	1.811	1.295	0.127	0.091	3.387	0.081	0.119	1.977	0.135	0.130	0.185	0.125	0.232	0.192	0.192
60	0.714	0.919	0.092	0.968	1.194	0.150	0.095	3.065	0.089	0.130	1.494	0.143	0.162	0.164	0.156	0.311	0.238	0.364
61	1.447	1.711	0.093	1.174	1.547	0.160	0.079	2.932	0.078	0.144	1.724	0.162	0.175	0.153	0.132	0.276	0.252	0.253
62	1.579	0.886	0.092	1.311	1.543	0.157	0.080	2.997	0.075	0.135	0.433	0.117	0.124	0.144	0.117	0.221	0.213	0.244
63	1.234	0.792	0.091	1.238	1.135	0.166	0.074	2.908	0.087	0.124	0.760	0.140	0.122	0.134	0.117	0.258	0.213	0.211
64	1.419	1.281	0.093	1.885	0.841	0.162	0.078	3.014	0.074	0.136	1.784	0.117	0.135	0.130	0.119	0.225	0.231	0.234
65	1.449	0.703	0.094	1.271	0.662	0.196	0.072	2.772	0.073	0.129	1.587	0.103	0.117	0.128	0.115	0.278	0.187	0.211
66	0.869	1.449	0.091	1.021	1.473	0.165	0.080	3.072	0.071	0.127	0.961	0.124	0.118	0.120	0.119	0.300	0.296	0.209
67	1.665	1.260	0.091	2.189	1.363	0.153	0.076	0.131	0.074	0.125	0.128	0.111	0.124	0.134	0.126	0.304	0.182	0.198
68	1.347	1.543	0.091	1.813	1.708	0.154	0.073	0.141	0.075	0.118	0.117	0.118	0.121	0.125	0.126	0.236	0.268	0.249
69	0.751	1.216	0.089	1.830	0.874	0.176	0.085	3.164	0.075	1.225	1.491	0.130	0.128	0.134	0.132	0.212	0.195	0.202

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1)]						การทดลองครั้งที่ 2[2)]						การทดลองครั้งที่ 3[3)]					
	20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน		
	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-13-47	L-13-76	L-13-90	L-13-47	L-13-76	L-13-90
70	1.231	1.493	0.091	1.614	1.653	0.182	0.078	3.094	0.076	0.127	1.150	0.122	0.125	0.133	0.122	0.252	0.228	0.202
71	0.711	1.093	0.093	2.411	1.298	0.144	0.855	3.139	0.079	0.349	0.818	0.132	0.132	0.159	0.135	0.257	0.201	0.218
72	0.961	1.388	0.091	0.651	1.446	0.197	0.086	3.116	0.084	0.144	0.578	0.147	0.139	0.183	0.161	0.281	0.256	0.239
73	1.331	1.557	0.091	1.370	1.311	0.156	0.084	2.934	0.075	0.150	1.266	0.141	0.210	0.168	0.141	0.319	0.423	0.258
74	1.321	1.752	0.089	1.144	1.441	0.189	0.794	2.767	0.074	1.307	0.843	0.127	0.134	0.145	0.124	0.255	0.277	0.197
75	1.297	1.711	0.090	1.001	1.441	0.155	0.077	2.919	0.072	0.118	1.136	0.121	0.135	0.123	0.129	0.307	0.341	0.272
76	1.335	0.847	0.089	1.661	1.515	0.155	0.070	2.979	0.069	0.131	1.664	0.114	0.115	0.133	0.117	0.259	0.215	0.209
77	1.209	1.447	0.088	1.441	1.012	0.159	0.830	2.996	0.071	0.469	0.818	0.120	0.123	0.132	0.124	0.304	0.238	0.206
78	0.807	1.732	0.090	1.697	1.541	0.163	0.080	3.132	0.073	0.126	1.371	0.113	0.127	0.125	0.123	0.305	0.358	0.203
79	1.271	1.766	0.090	1.119	1.935	0.155	0.080	3.049	0.076	0.465	0.637	0.105	0.129	0.128	0.130	0.219	0.175	0.204
80	1.371	0.802	0.088	1.355	1.587	0.143	0.880	2.996	0.083	0.747	0.933	0.117	0.135	0.127	0.126	0.236	0.194	0.200
81	1.199	1.015	0.088	2.158	0.641	0.145	0.078	3.206	0.077	0.168	0.889	0.107	0.131	0.131	0.138	0.264	0.195	0.264
82	1.518	2.180	0.087	1.653	1.309	0.166	0.075	3.088	0.075	0.121	0.982	0.119	0.144	0.128	0.126	0.294	0.213	0.222
83	-	1.596	0.087	-	1.893	0.131	0.857	3.013	0.078	0.435	1.336	0.132	0.135	0.135	0.131	0.227	0.192	0.249

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ต้นที่	ปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบในใบมะเขือเทศ ($O.D._{405}$) หลังการปลูกเชื้อ																	
	การทดลองครั้งที่ 1[1]						การทดลองครั้งที่ 2[2]						การทดลองครั้งที่ 3[3]					
	20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน			20 วัน			40 วัน		
	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-22	L-6-3-23	L-13-3	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-1-46	L-6-3-34	L-13-10	L-13-47	L-13-76	L-13-90	L-13-47	L-13-76	L-13-90
84	-	1.394	0.091	-	2.194	0.129	0.092	-	0.083	0.131	-	0.152	0.161	0.169	0.151	0.279	0.239	0.237
85	-	1.136	0.090	-	1.365	0.162	-	-	0.085	-	-	0.152	0.189	0.185	0.155	0.332	0.274	0.279
86	-	1.161	0.092	-	1.161	0.121	-	-	0.084	-	-	0.141	0.144	0.149	0.153	0.374	0.244	0.219
87	-	1.144	0.090	-	0.944	0.140	-	-	0.108	-	-	0.138	0.124	0.145	0.163	0.380	0.346	0.259
88	-	0.953	0.089	-	1.532	0.165	-	-	0.079	-	-	0.114	0.188	0.141	0.152	0.225	0.224	0.244
89	-	1.077	0.091	-	1.771	0.186	-	-	-	-	-	-	0.174	0.168	0.139	0.254	0.224	0.231
90	-	1.177	0.089	-	1.717	0.190	-	-	-	-	-	-	0.174	0.166	0.135	0.214	0.242	0.274
91	-	1.464	-	-	1.808	-	-	-	-	-	-	-	0.150	0.155	0.132	0.337	0.245	0.308
92	-	1.573	-	-	1.051	-	-	-	-	-	-	-	0.119	-	0.141	0.301	-	0.285
93	-	1.256	-	-	0.504	-	-	-	-	-	-	-	0.129	-	-	0.290	-	-
94	-	1.243	-	-	1.163	-	-	-	-	-	-	-	0.152	-	-	0.277	-	-
95	-	1.305	-	-	1.147	-	-	-	-	-	-	-	0.159	-	-	0.301	-	-
96	-	1.254	-	-	0.891	-	-	-	-	-	-	-	0.161	-	-	0.290	-	-
97	-	1.269	-	-	1.385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[1] หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 0.105 ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 1.280 ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.128 และ positive control (purify CMV 20 µg/ml) เท่ากับ 2.387

หลังการปลูกเชื้อ 40 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 0.170 ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 1.544 ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.148 และ positive control (purify CMV 20 µg/ml) เท่ากับ 2.674

[2] หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 0.139 ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 2.419 ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.120 และ positive control (purify CMV 20 µg/ml) เท่ากับ 1.892

หลังการปลูกเชื้อ 40 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 0.137 ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 1.214 ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.179 และ positive control (purify CMV 20 µg/ml) เท่ากับ 2.352

[3] หลังการปลูกเชื้อ 20 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 0.141 ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 1.808 ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.139 และ positive control (purify CMV 20 µg/ml) เท่ากับ 2.766

หลังการปลูกเชื้อ 40 วัน ค่าเฉลี่ยของค่า $O.D._{405}$ ของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 0.244 ของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส เท่ากับ 2.337 ของ negative control (coating buffer) เท่ากับ 0.202 และ positive control (purify CMV 20 µg/ml) เท่ากับ 2.784

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมสารเคมีในการทดสอบ ELISA

1. Phosphate buffer saline (PBS, pH7.4)

NaCl	8.0	กรัม
$Na_2HPO_4 12H_2O$	2.9	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม
ปรับ pH ให้ได้ 7.4		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1,000	มิลลิลิตร

2. Carbonate coating buffer , pH 9.6

$NaHCO_3$	2.93	กรัม
Na_2CO_3	1.59	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 9.6		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1,000	มิลลิลิตร

3. Blocking buffer

3% Skim milk

PBS	100	มิลลิลิตร
Skim milk	3	กรัม

4. Washing buffer (PBST)

PBS	100	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

สามารถเตรียมเป็นความเข้มข้น 10XPBST และ autoclave ก่อนเก็บที่ 4 องศาเซลเซียลได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. Substrate buffer; pH 9.8

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.2	กรัม
$MgCl_2 .6H_2O$	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 9.8	1,000	มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียล ในที่มืด

การเตรียมสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ

Extraction buffer ประกอบด้วย

a. DNA extraction buffer : 0.1M Tris-HCl, 0.005M EDTA
b. Sodium sulfite

เติม Sodium sulfite 1 กรัม ต่อ DNA extraction buffer 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอัญญรัตน์ ฤทธิ์พิทักษ์พงศ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	19 พฤศจิกายน 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2544 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนราชประชาสมาสัย ฝ่ายมัธยม รัชดาภิเษก ในพระบรมราชูปถัมภ์ พ.ศ. 2548 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม พ.ศ. 2552 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	พ.ศ. 2552 รางวัลผลงานวิจัยระดับชมเชย สาขาวิชาโรคพืชและจุลชีววิทยา เรื่อง มะเขือเทศเทคโนชีวภาพต้านทานเชื้อไวรัสใบด่างแตง การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	พ.ศ. 2548 ทุนอุดหนุนบางส่วนจากสภาวิจัยแห่งชาติ ภายใต้โครงการ “การประเมินความต้านทานของมะเขือเทศจำลองพันธุ์ต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus*”

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์