**การคัดเลือกพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเขียวและการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน**

Screening for bacterial wilt resistance in tomato and using molecular markers linked to disease resistance

นางสาวรัชนี ศิริยาน[๑/] นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[๒/] ว่าที่ร.ต.อรรถพล รุกขพันธ์[๑/]
นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[๓/] นางจิรภา ออสติน[๑/] นางสาวเสาวนี เขตสกุล[๑/]

**บทคัดย่อ**

โรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเป็นโรคที่สำคัญต่อการปลูกมะเขือเทศ การป้องกันที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การใช้พันธุ์ต้านทานโรค การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกมะเขือเทศที่มีลักษณะดีทางการเกษตร มีสารเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนสูง คัดเลือกให้มีลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียว โดยการปลูกเชื้อโรคเหี่ยวเขียวให้แก่มะเขือเทศสายพันธุ์คัดเลือกจำนวน ๔๒ สายพันธุ์ ตรวจสอบการตอบสนองต่อเชื้อโรคหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา ๔ สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า มะเขือเทศมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคเหี่ยวเขียว โดยทุกสายพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อโรคเหี่ยวเขียวโดยแสดงอาการเหี่ยวตั้งแต่ ๗๓-๑๐๐ เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกต้นที่ไม่แสดงอาการเหี่ยวคลุมดอกและเก็บเมล็ดผสมตัวเองรุ่นที่ ๑ (S๑) นำมาทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียวอีกครั้ง พบว่ามะเขือเทศมีความต้านทานเพิ่มขึ้น โดยมีความต้านทานปานกลางในระดับเดียวกับพันธุ์ H๗๙๙๖ ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบ หลังจากนั้นเก็บใบอ่อนจากมะเขือเทศต้นต้านทานมาสกัดดีเอ็นเอจำนวน ๒๐ ต้น และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCAR จำนวน ๒ เครื่องหมาย สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมะเขือเทศต้นต้านทานได้ ๑ เครื่องหมาย โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด ๒๐๐ bp. จำนวน ๑๓ ต้น ซึ่งมะเขือเทศต้านทานเหล่านี้จะได้นำมาใช้ในการพัฒนาพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรคเหี่ยวเขียวในอนาคต

---

[๑/]ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ
[๒/]ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
[๓/]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

**๖. คำนำ**

โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของมะเขือเทศที่ปลูกในเขตร้อน เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ชื่อเดิมคือ *Pseudomonas solanacearum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ลักษณะโคโลนีบนอาหารค่อนข้างกลม ผิวของโคโลนีเรียบเป็นมัน สีค่อนข้างขาว สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อชนิดรุนแรงและไม่รุนแรงออกจากกันได้ โดยลักษณะของเชื้อชนิดรุนแรงบนอาหาร TZC อายุ ๔๘ ชั่วโมง โคโลนีค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น มีจุดสีชมพูตรงกลางโคโลนี เชื้อชนิดไม่รุนแรง จะมีโคโลนีขอบเรียบ คล้ายเนยเหลว กลางโคโลนีสีแดงเข้มขอบใส ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ (เย็นจิตร, ๒๕๔๙) โรคนี้พบได้ทั่วไปในแหล่งปลูกมะเขือเทศของประเทศไทย ลักษณะอาการที่เด่นชัดของมะเขือเทศที่เป็นโรค คือ ใบจะเหี่ยวลู่ลงทั้งต้นในขณะที่ใบยังเขียวอยู่ เมื่อตัดขวางบริเวณโคนต้น นำมาแช่ในน้ำสะอาดสักครู่ จะพบของเหลวสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม (bacterial exudate) ไหลออกมาจากรอยตัดเป็นสาย ซึ่งเต็มไปด้วยเซลล์แบคทีเรียจำนวนมาก (ศศิธรและศักดิ์, ๒๕๓๘) อาการโรคในมะเขือเทศ เริ่มจากใบล่างเหี่ยวและเกิดการเหี่ยวทั้งต้นอย่างรวดเร็ว หลังจากอาการเริ่มแรกปรากฏ ๒-๓ วัน อาจมีรากอากาศแตกออกจากส่วนลำต้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งพบมากในกรณีที่การเกิดโรคมีการพัฒนาค่อนข้างช้า (เพชรรัตน์และพิศาล, ๒๕๔๗) การควบคุมโรคทำได้ยาก เนื่องจากเชื้ออาศัยอยู่ในดิน วิธีการควบคุมที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางคือ การใช้พันธุ์ต้านทาน หรือการเสียบยอดโดยใช้พันธุ์ต้านทานเป็นต้นตอ แต่ถึงแม้ว่าจะมีการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศต้านทานหลายๆพันธุ์ แต่ความต้านทานไม่คงที่ เนื่องจากความแตกต่างของสภาพแวดล้อม สายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรค ทำให้เป็นการยากในการใช้พันธุ์เหล่านี้ในหลายๆประเทศ (Miao et al., ๒๐๐๙)

เสรี (๒๕๔๓) ได้ทดสอบความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ โดยใช้พันธุ์มะเขือเทศที่มีรายงานความต้านทานโรคเหี่ยวจากแหล่งต่างๆทั่วโลก ๓๕ สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ ๒ สายพันธุ์ ในสภาพแปลงทดลองที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวเขียว ผลการศึกษา การให้ผลผลิตและการต้านทานโรค คัดเลือกได้พันธุ์ต้านทาน ๓ สายพันธุ์ คือ Hawaii๗๙๙๘, MT-II และ TML๔๖-N-๑๒-N early NT

Miao et al. (๒๐๐๙) ได้ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล amplified fragment length polymorphism (AFLP) ที่เชื่อมโยงกับความต้านทานโรคเหี่ยวเขียว โดยผสมข้ามระหว่างพันธุ์ T๕๑A ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน และพันธุ์ T๙๒๓๐ ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ มีการศึกษาการกระจายตัวของยีนในประชากร F๒ การคัดเลือกใช้ไพรเมอร์จำนวน ๒๕๖ ไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่ามีแถบดีเอ็นเอ ๑๓ แถบที่เชื่อมโยงกับความต้านทานและมี ๒ เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับความต้านทาน นำเครื่องหมาย AFLP เปลี่ยนเป็นเครื่องหมาย SCAR คือ $TSCAR_{AAT/CGA}$ และ $TSCAR_{AAG/CAT}$

โครงการสำรวจและรวบรวมมะเขือเทศเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ได้รวบรวมมะเขือเทศจากแหล่งต่างๆ นำมาปลูกศึกษาลักษณะทางการเกษตร และได้วิเคราะห์สารสำคัญ คือ เบต้าแคโรทีนและไลโคปีน ดังนั้น จึงน่าจะนำพันธุ์ที่มีศักยภาพเหล่านี้ มาทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียวและทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับความต้านทาน เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

**๗. วิธีดำเนินการ**

**- อุปกรณ์** ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์ต่างๆ เชื้อโรคเหี่ยวเขียว ถาดเพาะกล้า กระถางพลาสติกขนาด ๔ นิ้ว อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

**- วิธีการ**

**๑. การทดสอบปฏิกิริยาพันธุ์มะเขือเทศต่อโรคเหี่ยวเขียวจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum***

<u>การเตรียมต้นมะเขือเทศ</u>

ทำการเพาะเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในกระบะเพาะ เมื่อมีใบจริง ๑ คู่ ย้ายปลูกต้นมะเขือเทศลงกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๔ นิ้ว โดยใช้มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์เป็นพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบ ส่วนพันธุ์ต้านทานใช้พันธุ์ H๗๙๙๖ และ BWR#๑๔๐๕ เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ปลูกมะเขือเทศในเรือนปลูกพืชทดลองให้มีอายุ ๓๐ วัน โดยใช้ต้นมะเขือเทศในการทดสอบจำนวน ๒๐ ต้น/พันธุ์

<u>การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum*</u>

นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เก็บรักษาไว้ในหน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์โรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร นำมากระตุ้นให้มีชีวิตโดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) ที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๙๖ ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PSA มาเลี้ยงในอาหาร Kelmen's TZC agar ที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๔๘ ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวสีขาวตรงกลางโคโลนีเป็นสีชมพู รูปร่างไม่แน่นอนซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรง มาเลี้ยงในอาหารเหลว ๕๒๓ บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ ๒๕๐ รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อ ๑๐๐ µl มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง ๕๒๓ บ่มที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ละลายเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง ๖๐๐ นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ ๐.๓ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ ๑๐$^{๘}$ cfu/ml

<u>การทดสอบปฏิกิริยาพันธุ์มะเขือเทศต่อโรคเหี่ยวเขียว</u>

โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ต่างๆที่เตรียมไว้ข้างต้น มาปลูกลงบนต้นมะเขือเทศ ที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยก่อนปลูกเชื้องดการให้น้ำมะเขือเทศเป็นเวลา ๑ วัน ทำการปลูกเชื้อลงบนมะเขือเทศโดยใช้มีดหรือคัตเตอร์ที่สะอาดตัดส่วนรากห่างจากต้น ๑-๒ เซนติเมตร ราดด้วยสารละลายเชื้อที่เตรียมข้างต้นทันที โดยใช้อัตราส่วนสารละลายต่อดินในกระถาง ๑: ๑๐(v/v)(~ ๒๐ มิลลิลิตร/ต้น)

**บันทึกผล** ตรวจผลการทดลองทุกๆ ๗ วัน หลังการปลูกเชื้อ โดยให้ค่าคะแนนความรุนแรงของโรคตั้งแต่ ๑-๖ ตามอาการของต้นมะเขือเทศดังนี้

๑ = พืชปกติ (healthy plant)

๒ = ใบเหี่ยว ๑ ใบต่อต้น (one leaflet or leaf wilting)

๓ = ๑/๓ ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (๑/๓ of plant wilting)

๔ = ๒/๓ ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (๒/๓ of plant wilting)

๕ = แสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น (whole plant wilting)

๖ = ต้นตาย (plant dead)

**๒. การทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับความลักษณะต้านทานโรคในต้นมะเขือเทศ**

คัดเลือกต้นต้านทานที่ไม่แสดงอาการโรคมาย้ายปลูกในถุงดำขนาด ๗x๑๔ นิ้ว เก็บใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Fulton et al. (๑๙๙๕) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง และวัดคุณภาพดีเอ็นเอด้วย

๐.๘% agrarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองด้วยเครื่อง PCR ตามวิธีการของ Miao et al. (๒๐๐๙) โดยใช้ไพรเมอร์ SCAR จำนวน ๒ คู่ คือ

P๑/P๒ ๕'-TAGATGGAATCCAATATCAGG-๓/ ๕'-AACCACAGTGAAGGAATATACA-๓'

P๓/P๔ ๕'-AGAAGGTCACGGCGAGA-๓'/ ๕'-TGAGTCCTGAGTAACTGG-๓'

โดยได้ทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR ที่อุณภูมิต่างๆ ได้แก่ ๔๘°C ๕๐°C และ ๕๕°C กับไพรเมอร์ทั้งสองคู่ สำหรับปฏิกิริยาในการทำ PCR ประกอบด้วย Predenaturation อุณหภูมิ ๙๔°C เป็นเวลา ๕ นาที ขั้นที่ ๑ Denaturation อุณหภูมิ ๙๔°C เป็นเวลา ๓๐ วินาที ขั้นที่ ๒ Annealing อุณหภูมิตามที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา ๔๕ วินาที ขั้นที่ ๓ Extension อุณหภูมิ ๗๒°C เป็นเวลา ๑ นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ ๑-๓ จำนวน ๓๑ รอบ และขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิ ๗๒°C เป็นเวลา ๗ นาที เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดนำมาตรวจสอบผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอด้วย ๑% agrarose gel electrophoresis เป็นเวลา ๔๐ นาที หลังจากได้อุณหภมิที่เหมาะสมแล้ว เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากต้นต้านทานเปรียบเทียบกับต้นอ่อนแอเพื่อตรวจสอบความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับความต้านทานโรคเหี่ยวเขียว

**- เวลาและสถานที่** ปี ๒๕๕๗ สิ้นสุด ปี ๒๕๕๘ รวม ๒ ปี สถานที่ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

**๘. ผลการทดลองและวิจารณ์**

การทดลองนี้ดำเนินการต่อจากการทดลองเรื่อง เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับปริมาณเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ โดยเก็บผลมะเขือเทศจากการทดลองเรื่อง สำรวจและรวบรวมมะเขือเทศเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และได้วิเคราะห์สารสำคัญในผลมะเขือเทศ คือ เบต้าแคโรทีนและไลโคปีน สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีสารสำคัญและมีลักษณะดีทางการเกษตรได้ ๔๒ สายพันธุ์ จึงได้ปลูกสายพันธุ์เหล่านี้เพื่อเพิ่มปริมาณเมล็ดพันธุ์และเพาะกล้ามะเขือเทศชุดที่ ๑ ในโรงเรือนจำนวน ๒๔ สายพันธุ์และพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบ คือ สีดาทิพย์ และพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบ ๒ พันธุ์คือ line#๑๔๐๕ BWR และ H๗๙๙๖ หลังจากนั้นย้ายปลูกในกระถางพลาสติกดำขนาด ๔ นิ้ว โดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก เมื่อต้นกล้าอายุ ๓๐ วัน ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ให้แก่ต้นกล้า ก่อนปลูกเชื้อเตรียมต้นกล้าโดยใช้ใบมีดตัดลงไปบนวัสดุปลูกของกระถางต้นกล้าให้ห่างจากโคนต้น ๒ ซม. และใช้กรรไกรจุ่มเชื้อ ตัดใบล่างของมะเขือเทศออก ๒ ใบ หลังจากนั้นราดเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวเขียวปริมาณ ๒๐ มล. ลงไปบนวัสดุปลูก ปฏิบัติดูแล รดน้ำ ใส่ปุ๋ยและสังเกตอาการของโรคภายหลังการปลูกเชื้อทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนต้นมะเขือเทศที่ต้านทานหรืออ่อนแอทุก ๗ วัน

ผลการปลูกเชื้อโรคเหี่ยวเขียวให้แก่ต้นกล้ามะเขือเทศชุดที่ ๑ จำนวน ๒๔ สายพันธุ์เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ พบว่า มะเขือเทศเกือบทุกสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเขียว โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ๑๐๐ เปอร์เซ็นต์ มีเพียง ๓ สายพันธุ์มีต้นที่ไม่แสดงอาการโรคเหี่ยวเขียว ได้แก่ สายพันธุ์ ๐๓๔, ๐๔๕-๒ และ ๐๔๗ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ๙๒.๐๐, ๙๖.๐๐ และ ๘๓.๓๓ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ ๑) โดยแบ่งระดับการตอบสนองต่อโรคออกเป็น ๔ ระดับ (ศศิธรและศักดิ์, ๒๕๓๘) คือ

R = ต้านทาน เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ๐-๒๐ เปอร์เซ็นต์

MR = ต้านทานปานกลาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ๒๑-๔๐ เปอร์เซ็นต์

MS = อ่อนแอปานกลาง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ๔๑-๖๐ เปอร์เซ็นต์

S = อ่อนแอ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ๖๑-๑๐๐ เปอร์เซ็นต์

การทดสอบความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศชุดที่ ๒ ได้เพาะกล้ามะเขือเทศจำนวน ๒๔ สายพันธุ์ เมล็ดงอก ๑๘ สายพันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบ ๓ พันธุ์ ย้ายปลูกในกระถางพลาสติกและได้ปลูกเชื้อโรคเหี่ยวเขียวให้แก่ต้นกล้าแล้วตามวิธีการข้างต้น บันทึกข้อมูล จำนวนต้นมะเขือเทศที่ต้านทานหรืออ่อนแอทุก ๗ วัน จนกระทั่งครบ ๔ สัปดาห์ พบว่า มะเขือเทศพันธุ์ต่างๆ มีการตอบสนองต่อเชื้อโรคเหี่ยวเขียว ดังตารางที่ ๒

ผลการทดลองพบว่าทุกสายพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อโรคเหี่ยวเขียว มีเพียง no. ๓๓๓-๒, ๓๕๗-๒ และ ๓๙๗ ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอ โดยยังคงเหลือต้นที่ไม่แสดงอาการของโรค หลังจากนั้นนำต้นที่ไม่แสดงอาการเหี่ยว ย้ายปลูกในถุงดำขนาด ๗x๑๔ นิ้ว ปฏิบัติดูแลรักษา จนกระทั่งต้นมะเขือเทศออกดอก ใช้ถุงรีเมย์คลุมช่อดอกเพื่อป้องกันการผสมข้าม เมื่อผลมะเขือเทศสุก เก็บผลมะเขือเทศมาผ่าเก็บเมล็ด ตากเมล็ดให้แห้ง แล้วนำเมล็ดมาเพาะกล้าในถาดเพาะ ย้ายปลูกต้นกล้าใส่กระถางพลาสติกสีดำและปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ตามกรรมวิธีข้างต้น พบว่า การปลูกเชื้อให้ต้นกล้ามะเขือเทศที่ได้จากต้นต้านทานและผสมตัวเองรุ่นที่ ๑ ($S_1$) มีความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวเพิ่มขึ้น โดยพบว่า no.๐๓๔ และ ๐๔๕ มีระดับการตอบสนองต่อโรคเท่ากับพันธุ์ H-๗๙๙๖ ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบ (ตารางที่ ๓)

**๒. การทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับความลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียว**

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นของมะเขือเทศต้นต้านทานและต้นอ่อนแอ พบว่าไพรเมอร์ P๑/P๒ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในมะเขือเทศต้นต้านทานได้แภบดีเอ็นเอขนาดประมาณ ๒๐๐ bp ที่อุณหภูมิ ๔๘°C ในขณะที่มะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพที่ ๑) ส่วนไพรเมอร์ P๓/P๔ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งในพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ

หลังจากคัดเลือกได้ไพรเมอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว นำไพรเมอร์ P๑/P๒ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในมะเขือเทศต้นต้านทานจำนวน ๒๐ ต้น ตามขั้นตอนข้างต้น พบว่า มะเขือเทศจำนวน ๑๓ ต้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ ๒๐๐ bp ส่วนอีก ๗ ต้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และมะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอก็ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพที่ ๒ )

จากการทดลองมะเขือเทศต้นต้านทานที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ P๑/P๒ ได้นั้น เนื่องจากการทดลองนี้มีใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาโดย Miao et al. (๒๐๐๙) ซึ่งพัฒนามาจากการผสมระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ T๕๑A เป็นพันธุ์ต้านทาน และมะเขือเทศพันธุ์ T๙๒๓๐ เป็นพันธุ์อ่อนแอ ประชากร $F_1$ (T๕๑A x T๙๒๓๐) ประชากร $F_2$ $BC_1R$ (backcross กับพันธุ์ต้านทาน) และ $BC_1S$ (backcross กับพันธุ์อ่อนแอ) ซึ่งเป็นพันธุ์มะเขือเทศจากประเทศจีน ซึ่งกลไกความต้านทานอาจมีความแตกต่างกัน ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานจึงอาจเป็นยีนเดียวกันหรือคนละยีนกัน ดังนั้นจึงทำให้การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับความต้านทานโรคเหี่ยวเขียว ไม่สามารถใช้คัดเลือกมะเขือเทศต้านทานโรคได้อย่างแม่นยำ

**๙. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

การทดสอบความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวในสายพันธุ์มะเขือเทศที่มีลักษณะดีทางการเกษตร มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนสูง สามารถคัดเลือกได้ต้นมะเขือเทศที่มีความต้านทาน แต่เมื่อเก็บเมล็ดจากต้นต้านทานโดยการผสมตัวเองรุ่นที่ ๑ ($S_1$) แล้วนำมาทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียวพบว่า ความต้านทานเพิ่มขึ้นในระดับเดียวกับพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบ และเมื่อสกัดดีเอ็นเอจากต้นต้านทาน แล้วเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR

โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCAR จำนวน ๒ เครื่องหมาย สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ๑ เครื่องหมาย และการคัดเลือกต้นต้านทานโรคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลนี้ยังไม่มีความแม่นยำ ดังนั้นจึงควรที่จะพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากต้นมะเขือเทศต้านทานเหล่านี้ต่อไป

**๑๐. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

การทดลองนี้สามารถคัดเลือกได้ต้นมะเขือเทศที่มีความต้านทานโรคเหี่ยวเขียว ซึ่งมะเขือเทศเหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาพันธุ์มะเขือเทศที่ต้านทานโรคเหี่ยวเขียวได้ในอนาคต

**๑๑. คำขอบคุณ (ถ้ามี)**

**๑๒. เอกสารอ้างอิง**


เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ พิศาล ศิริธร. ๒๕๔๗. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียต้องห้ามในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อส่งออก. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ๓๗ น.

เย็นจิต เรเรือง. ๒๕๔๙. การคัดเลือกมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวเขียวโดยใช้แผนที่ละเอียดระดับโมเลกุลและการทดสอบมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรคเหี่ยวเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ๑๔๐ น.

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และ ศักดิ์ สุนทรสิงห์. ๒๕๓๘. การทดสอบพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ๒๙: ๔๓๕-๔๔๔.

เสรี พิศิลป์. ๒๕๔๓. การตรวจสอบและคัดเลือกมะเขือเทศลูกผสมพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ๑๐๓ น.

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. ๑๙๙๕. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Mol. Biol. Rep. ๑๓(๓): ๒๐๗-๒๐๙.

Miao, L., S. Shou, J. Cai, F. Jiang, Z. Zhu, and H. Li. ๒๐๐๙. Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. Mol Biol Rep ๓๖: ๔๗๙-๔๘๖.


**ตารางที่ ๑** การตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ ชุดที่ ๑

| ลำดับที่ | รหัสพันธุ์ | จำนวนต้นทั้งหมด | ต้นเกิดโรค | ต้นต้านทาน | % การเกิดโรค | ระดับการตอบสนองต่อโรค |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑ | ๐๑๑-๑-๕ | ๒๑ | ๒๑ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒ | ๐๒๑-๑ | ๒๓ | ๒๓ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๓ | ๐๒๖-๒ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๔ | ๐๓๔ | ๒๕ | ๒๓ | ๒ | ๙๒.๐๐ | S |
| ๕ | ๐๓๗-๑ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๖ | ๐๓๗-๙ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๗ | ๐๔๕-๒ | ๒๕ | ๒๔ | ๑ | ๙๖.๐๐ | S |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ๘ | ๐๔๗ | ๒๔ | ๒๐ | ๔ | ๘๓.๓๓ | S |
| ๙ | ๐๕๐-๙ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๐ | ๐๕๑-๓ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๑ | ๐๕๒-๒-๑ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๒ | ๐๖๔ | ๒๐ | ๒๐ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๓ | ๐๖๘-๑-๓ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๔ | ๐๗๐-๑ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๕ | ๐๗๑-๑-๔ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๖ | ๐๘๔ | ๒๓ | ๒๓ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๗ | ๐๙๙-๑-๑ | ๑๕ | ๑๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๘ | ๑๐๒-๑ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๑๙ | ๑๑๑-๑ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒๐ | ๑๒๖-๑ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒๑ | ๑๖๔-๑-๔ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒๒ | ๑๖๙-๑-๔ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒๓ | ๑๗๒-๒๐ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒๔ | ๑๙๐ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒๕ | สีดาทิพย์ (S) | ๑๑ | ๑๑ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |
| ๒๖ | H-๗๙๙๖ ( R) | ๒๒ | ๑๔ | ๘ | ๖๓.๖๔ | S |
| ๒๗ | line#๑๔๐๕ BWR | ๒๒ | ๒๒ | ๐ | ๑๐๐.๐๐ | S |

**ตารางที่ ๒** การตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ ชุดที่ ๒

| ลำดับที่ | รหัสพันธุ์ | จำนวนต้นทั้งหมด | จำนวนต้นเกิดโรค | จำนวนต้นต้านทาน | % เกิดโรค | ระดับการตอบสนองต่อโรค |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑ | ๑๙๔ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๒ | ๒๗๗ | ๒๑ | ๒๑ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๓ | ๒๙๗-๒ | ๒๔ | ๒๓ | ๑ | ๙๖ | S |
| ๔ | ๓๒๒ | ๒๕ | ๒๔ | ๑ | ๙๖ | S |
| ๕ | ๓๓๑-๑ | ๒๕ | ๒๒ | ๓ | ๘๘ | S |
| ๖ | ๓๓๑-๒ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๗ | ๓๓๓-๒ | ๒๒ | ๑๕ | ๗ | ๖๘ | S |
| ๘ | ๓๓๗ | ๒๐ | ๑๙ | ๑ | ๙๕ | S |
| ๙ | ๓๓๘ | ๒๑ | ๒๑ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๑๐ | ๓๔๗ | ๒๑ | ๒๑ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๑๑ | ๓๕๗-๑ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐ | S |

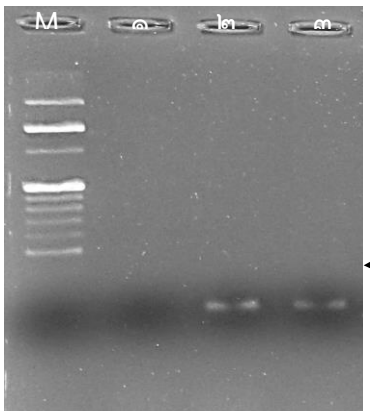
| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑๒ | ๓๕๗-๒ | ๒๔ | ๑๙ | ๖ | ๗๙ | S |
| ๑๓ | ๓๕๙-๒ | ๒๐ | ๑๗ | ๓ | ๘๕ | S |
| ๑๔ | ๓๘๒ | ๑๑ | ๑๑ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๑๕ | ๓๘๗ | ๒๓ | ๒๓ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๑๖ | ๓๙๖ | ๑๑ | ๑๑ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๑๗ | ๓๙๗ | ๒๒ | ๑๖ | ๖ | ๗๓ | S |
| ๑๘ | ๓๙๙ | ๒๔ | ๒๑ | ๓ | ๘๘ | S |
| ๒๕ | สีดาทิพย์ (S) | ๘ | ๘ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๒๖ | H-๗๙๙๖ ( R) | ๒๐ | ๐ | ๒๐ | ๐ | R |
| ๒๗ | line#๑๔๐๕ BWR | ๑๒ | ๔ | ๘ | ๓๓ | MR |

**ตารางที่ ๓** การตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวเขียวในมะเขือเทศที่ได้จากการผสมตัวเองรุ่นที่ ๑ ($S_๑$)

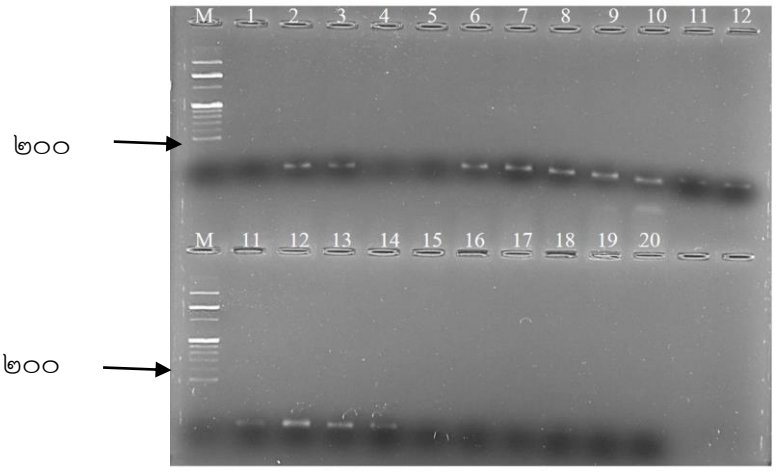
| ลำดับที่ | รหัสพันธุ์ | จำนวนต้นทั้งหมด | จำนวนต้นเกิดโรค | จำนวนต้นต้านทาน | % เกิดโรค | ระดับการตอบสนองต่อโรค |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑ | ๐๓๔$S_๑$ | ๒๘ | ๗ | ๒๑ | ๒๕ | MR |
| ๒ | ๐๔๕$S_๑$ | ๒๘ | ๘ | ๒๐ | ๒๙ | MR |
| ๓ | ๒๗๗$S_๑$ | ๒๕ | ๒๕ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๔ | ๓๒๒-๑$S_๑$ | ๒๖ | ๒๖ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๕ | ๓๓๗$S_๑$ | ๒๗ | ๒๗ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๖ | ๓๕๗-๒$S_๑$ | ๒๘ | ๑๙ | ๙ | ๖๘ | S |
| ๗ | ๓๙๗$S_๑$ | ๒๗ | ๑๑ | ๑๖ | ๔๑ | MS |
| ๘ | สีดาทิพย์ (S) | ๒๐ | ๒๐ | ๐ | ๑๐๐ | S |
| ๙ | line#๑๔๐๕ BWR | ๒๐ | ๖ | ๑๔ | ๓๐ | MR |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ๑๐ | H-๗๙๙๖ ( R) | ๒๐ | ๕ | ๑๕ | ๒๕ | MR |

**๑๓. ภาคผนวก**



**ภาพภาคผนวกที่ ๑** การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะเขือเทศด้วยไพรเมอร์ P๑/P๒ ที่อุณหภูมิ ๔๘°C
M = ๑๐๐ bp marker, lane ๑ มะเขือเทศอ่อนแอ (สีดาทิพย์),
lane ๒ และ ๓ มะเขือเทศพันธุ์ต้านทาน




**ภาพภาคผนวกที่ ๒** การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะเขือเทศด้วยไพรเมอร์ P๑/P๒ ที่อุณหภูมิ ๔๘°C
M = ๑๐๐ bp marker, lane๑ มะเขือเทศอ่อนแอ (สีดาทิพย์), lane ๒ มะเขือเทศพันธุ์ต้านทาน H๗๙๙๖, lane ๓-๒๐ มะเขือเทศต้านทาน no. ๓๓๗, ๑๔๐๕, ๐๓๔/๑, ๐๓๔/๒, ๐๓๔/๓, ๐๓๔/๔, ๐๓๔/๕, ๐๓๔/๖, ๐๓๔/๗, ๐๓๔/๘, ๐๓๔/๙, ๐๓๔/๑๐, ๐๓๔/๑๑, ๐๓๔/๑๒, ๐๓๔/๑๓, ๓๙๗/๑, ๓๙๗/๒, ๐๔๕/๑, ๐๔๕/๓ และ ๐๔๕/๒