



การประเมินและการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกเชื้อพันธุกรรมมะเขือเทศต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง

Evaluation and study efficacy of using a molecular marker for selection tomato germplasm resistant to Tomato yellow leaf curl disease virus

สุदारัตน์ ผาไต้¹, พัชรารภรณ์ สุวอ^{1*}, กฤษณัย แก้วบุญเรือง², ลำไย โกวิทยากร², สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร^{3,4} และ สมศักดิ์ ครามโชติ¹

Sudarat Phatai¹, Patcharaporn Suwor^{1*}, Krisanai Kaewboonruang², Lumyai Kowithayakorn², Suchila Techawongstien^{3,4} and Somsak Kramchote¹

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

¹ Department of Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand

² บริษัท ที. เค. อาร์แอนดี จำกัด ขอนแก่น 40002

² TKR&D Co., Ltd., Khon Kaen, 40002, Thailand

³ ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 4002

³ Plant Breeding Research Center for Sustainable, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 4002, Thailand

⁴ สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

⁴ Horticulture section, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

บทคัดย่อ: เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์โดยเฉพาะกับลักษณะเชิงปริมาณที่ควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ดังนั้นวัตถุประสงค์นี้เพื่อประเมินลักษณะต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV-NP) ในเชื้อพันธุกรรมมะเขือเทศ และศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCAR-P1-16 และ SCAR-P6-25 ที่วางอยู่ใกล้ตำแหน่งยีน *Ty-2* และ *Ty-3* ตามลำดับ ประเมินในมะเขือเทศ 32 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการปลูกเชื้อแบบเสียบยอด (grafting) ประเมินการเกิดโรคทุกสัปดาห์ที่ 7 ถึง 42 วันหลังเสียบยอด (DAI) และให้คะแนนการเกิดโรค 5 ระดับ (0-4) ผลการประเมินพบว่ามะเขือเทศ 32 สายพันธุ์ตอบสนองต่อเชื้อ TYLCTHV-NP แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติตั้งแต่ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 DAI ผลการเกิดโรคที่ 42 DAI พบมะเขือเทศ 4 สายพันธุ์ ที่แสดงระดับความต้านทาน (R) ได้แก่พันธุ์ AVTO1008 AVTO1314 AVTO1422 และ KKU-T14009 แสดงค่าดัชนีความรุนแรง 1.00 1.13 1.25 และ 1.33 ตามลำดับ ผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCAR-P1-16 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 300 bp (ตำแหน่งอ้างอิงของยีน *Ty-2*) ในมะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ และ SCAR-P6-25 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขนาด 450 bp (ตำแหน่งอ้างอิงของยีน *Ty-3*) จำนวน 12 สายพันธุ์ และตำแหน่งอ้างอิงทั้งสองนี้สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อเชื้อ TYLCTHV-NP 81.25% และ 84.38% ตามลำดับ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพช่วยคัดเลือกในงานปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ

คำสำคัญ: บีโกโมไวรัส; ปรับปรุงพันธุ์พืช; Solanaceae; SCAR marker

ABSTRACT: DNA marker has been applied to increase the efficiency and shorten the breeding program, especially in quantitative traits. The objective of this experiment was to evaluate the resistance of tomato germplasm to Tomato yellow leaf curl virus disease (TYLCTHV-NP) and investigate the efficacy selection of DNA marker; SCAR-P1-16 and SCAR-P6-25 located nearby *Ty-2* and *Ty-3* genes, respectively. Thirty-two tomato germplasm were inoculated TYLCTHV-NP disease by grafting method, the disease symptoms were evaluated every week at the 7 to 42 days after inoculation (DAI) as scored 5 rates (0-4). All tomato germplasm showed significantly different responses

* Corresponding author: patcharaporn.su@kmitl.ac.th

to TYLCTHV-NP at 7,14, 21, 28, 35 and 42 DAI. The results showed that at 42 DAI, four tomato accessions showed resistance to TYLCTHV-NP, i.e., AVTO1008, AVTO1314, AVTO1422 and KKU-T14009, as disease severity of 1.00, 1.13, 1.25 and 1.33, respectively. For molecular assisted selection, SCAR-P1-16 amplified DNA banding size 300 bp (referenced to *Ty-2* gene) was found in 11 tomato germplasms, while SCAR-P6-25 amplified at 450 bp (referenced to *Ty-3* gene) was found in 12 tomato germplasms. Additionally, both DNA bands were associated with resistance to TYLCTHV-NP 81.25% and 84.38%, respectively. Therefore, these DNA markers have the potential for selection in tomato breeding programs.

Keywords: Begomovirus; breeding plant; Solanaceae; SCAR marker

บทนำ

มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ขนาดใหญ่ที่สำคัญในเอเชียเนื่องจากมีความเหมาะสมทางด้านสภาพภูมิอากาศ แรงงานในการผลิต และมีตลาดรองรับ ปัจจุบันการผลิตมะเขือเทศมักประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (Tomato Yellow Leaf Curl Virus : TYLCV) โดยแพร่ระบาดอย่างมากในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน (Sahu et al., 2012; Singh, 2014) โรคไวรัสดังกล่าวเกิดจากเชื้อในจีนัส *Begomovirus* เชื้อจะเข้าทำลายต้นพืชผ่านทางท่อน้ำเลี้ยง (xylem และ phloem) โดยมีแมลงหิวข้าวเป็นพาหะนำโรค (Hanley et al., 2013) ดังนั้นโรคจะแพร่ระบาดไปกับแมลงหิวข้าวโดยเฉพาะฤดูแล้งซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของแมลงหิวข้าว (พัชรภรณ์, 2560) จึงส่งผลให้เชื้อไวรัสดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคไวรัสใบหงิกเหลือง 3 ชนิด คือ *Pepper leaf curl virus* (PeplCV) *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) และ *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV) (Chomdej et al., 2012; Kenyon et al., 2014) โรคไวรัสใบหงิกเหลืองสร้างความเสียหายให้แก่พืชปลูกได้ทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ในระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว เมื่อพืชได้รับเชื้อ *Begomovirus* จะแสดงลักษณะอาการใบเหลือง หรือใบเหลืองร่วมกับใบด่าง ใบม้วนหยัก และลำต้นแคระแกร็น ส่งผลให้การติดดอกลดลง และเมื่อเกิดในระยะติดผลจะแสดงอาการต่างทั้งผล ขนาดผลเล็กลง จึงส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตและคุณภาพผลผลิตถึง 100% (Prasad et al., 2020; พัชรภรณ์ และคณะ, 2561) และยังพบว่าสามารถถ่ายทอดไปกับเมล็ดได้ (Kil et al., 2015) ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการคัดเลือกเพื่อย่นระยะเวลาและเพิ่มประสิทธิภาพมากขึ้น โดยแหล่งความต้านทานส่วนใหญ่อยู่ในมะเขือเทศพันธุ์ป่า *S. habrochaites* และ *S. chilense* และได้ถูกจำแนกยีนต้านทานต่อ *Begomovirus* จำนวน 6 ยีนที่วางอยู่บนตำแหน่งบนโครโมโซม ยีน *Ty-1* และ *Ty-3* เป็น allelic (ยีนที่เกี่ยวข้องกัน) วางอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 พบในมะเขือเทศพันธุ์ LA1969 (*S. chilense*) และ LA2779 (*S. chilense*) แสดงออกแบบยีนเด่น (dominant) (Zamir et al., 1994; Ji et al., 2007a; Verlaan et al., 2013) ยีน *Ty-2* วางอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 11 พบในมะเขือเทศสายพันธุ์ H24 (*S. habrochaites*) accession B6013 แสดงออกแบบยีนเด่น (Hanson et al., 2006) ยีน *Ty-4* อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 พบในมะเขือเทศพันธุ์ LA1932 (*S. Chilense*) แสดงออกแบบยีนเด่นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (incomplete dominant) และมีรายงานว่าเพิ่มระดับการต้านทานโรคมากขึ้นเมื่อรวมยีนกับ *Ty-3* (Ji et al., 2009; Kadirvel et al., 2012) สำหรับยีน *ty-5* ถูกค้นพบในมะเขือเทศพันธุ์ TY172 (*S. peruvianum*) พบยีนอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 แสดงออกแบบยีนด้อย (recessive) (Lapidot et al., 2015) และยีน *Ty-6* พบในมะเขือเทศสายพันธุ์ LA2779 (*S. Chilense*) พบยีนอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 แสดงออกแบบยีนเด่นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (Hutton and Scott, 2014) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของความต้านทานของยีนแต่ละตำแหน่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อโรค และพันธุ์มะเขือเทศ ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์จำเป็นต้องประเมินความต้านทานโรคก่อนนำไปพัฒนาพันธุ์ต้านทาน ในประเทศไทยได้มีรายงานว่ายีน *Ty-2* และ *Ty-3* สัมพันธ์กับการเกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลืองที่ระบาดในไทย (บุญสง และกรุง, 2557) และพบว่าพันธุ์มะเขือเทศที่มียีน *Ty-2* *Ty-3* และ *ty-5* ที่ผ่านการพัฒนาพันธุ์มาจาก WorldVeg แสดงความสามารถต้านทานต่อการเกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลืองในสภาพธรรมชาติ (natural infection) จากรายงานการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับความต้านทานไวรัสใบหงิกเหลืองพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล SCAR-Marker P1-16 และ P6-25 พบว่าวางอยู่ใกล้ตำแหน่งยีน *Ty-2* (Yang et al., 2014) และ *Ty-3* (*Ty-3a*) (*Ty-3b*) (Ji et al., 2007b;

Nevame et al., 2020) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า SCAR-marker P1-16 และ P6-25 มีความสัมพันธ์ทางบวกกับระดับของความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองที่ระบาดในไทย (TYLCTHV) ในมะเขือเทศกลุ่มรับประทานสดผลเล็ก (พัชรภรณ์ และคณะ, 2561) ดังนั้นงานทดลองนี้จึงประเมินลักษณะต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย และศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCAR marker P1-16 และ P6-25 ตรวจสอบยีนต้านทาน *Ty-2* และ *Ty-3* ในเชื้อพันธุ์กรรมมะเขือเทศอุตสาหกรรม

วิธีการศึกษา

พันธุ์มะเขือเทศ

นำมะเขือเทศจำนวน 32 พันธุ์ จากแหล่งจัดเก็บและรวบรวมเชื้อพันธุ์กรรม 5 แหล่ง คือ World Vegetable Center ประเทศไต้หวัน (WorldVeg) จำนวน 10 สายพันธุ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 9 สายพันธุ์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 3 สายพันธุ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อนจำนวน 1 สายพันธุ์ และพันธุ์จากบริษัท ที เค อาร์แอนดี จำนวน 9 สายพันธุ์ ใช้มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เป็นพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบ (Table 1) มาเพาะกล้าในวัสดุเพาะพีทมอส ระยะต้นกล้าอายุ 35 วัน หลังจากเพาะเมล็ดจึงนำมาปลูกเชื้อและประเมินความต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลืองในโรงเรือนโดยใช้พันธุ์ทดสอบเป็น root stock ในช่วงเดือน กรกฎาคม-ตุลาคม 2562 ที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การปลูกเชื้อ

นำเชื้อไวรัสใบหงิกเหลือง *Tomato yellow leaf curl Thailand virus- Nakhon Pathom* (TYLCTHV-NP) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการไวรัสพืชและแบคทีรีโอพาจ-ศช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน มาเพิ่มปริมาณในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 เมื่อต้นกล้าอายุ 21 วัน ย้ายต้นกล้าลงวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ขุยมะพร้าว และมะพร้าวสับ ให้ปุ๋ยออสโมโค้ทสูตร 13-13-13 ต้นกล้าทดสอบอายุได้ 35 วัน จึงทำการปลูกเชื้อ TYLCTHV-NP ด้วยวิธีการเสียบยอด โดยใช้พันธุ์ทดสอบเป็น root stock และใช้ต้น inoculum เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองเป็น scion (Akhtar et al., 2019) วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น จากนั้นสังเกตอาการของโรค ทำการประเมินโรคทุก ๆ สัปดาห์ หลังจากย้ายปลูกเชื้อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (7 14 21 28 35 และ 42 วันหลังปลูกเชื้อ) ตามระดับอาการตอบสนองต่อการเกิดโรค 5 ระดับ (Table 2) คือ 0 = ไม่ปรากฏอาการ (highly resistant), 1 = เริ่มปรากฏอาการใบต่างเล็กน้อย 1-2 จุด (resistant), 2 = ปรากฏอาการใบต่างร่วมกับใบหงิกชัดเจนมากกว่า 2 จุด (moderate resistant), 3 = เริ่มปรากฏอาการใบต่างร่วมกับใบหงิก 25-50% ของต้น (susceptible) และ 4 = เริ่มปรากฏอาการใบต่างร่วมกับใบหงิก 50-100% ของต้น ลำต้นแคระแกร็น หยุดการเจริญเติบโต (highly susceptible) ดัดแปลงตามวิธีการของ (Akhtar et al., 2019) และนำค่าเฉลี่ยระดับการตอบสนองต่อการเกิดโรค 5 ระดับในสัปดาห์ที่ 6 มาจัดกลุ่มมะเขือเทศตามการตอบสนองต่อโรค โดยการจัดกลุ่มความต้านทานโรคใช้ค่าดัชนีความรุนแรงในการแบ่งกลุ่มออกเป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ค่าดัชนีความรุนแรงเท่ากับ 0 ต้านทานมาก (highly resistant; HR) กลุ่มที่ 2 ค่าดัชนีความรุนแรงเท่ากับ 0.1-1.4 = ต้านทาน (resistant; R), กลุ่มที่ 3 ค่าดัชนีความรุนแรงเท่ากับ 1.5-2.4 = ต้านทานปานกลาง (moderate resistant; MR), กลุ่มที่ 4 ค่าดัชนีความรุนแรงเท่ากับ 2.5-3.4 = อ่อนแอ (susceptible; S), และกลุ่มที่ 5 ค่าดัชนีความรุนแรงเท่ากับ 3.5-4.0 = อ่อนแอมาก (highly susceptible; HS) (Figure 1) และเปรียบเทียบข้อมูลดัชนีความรุนแรงการเกิดโรคในแต่ละสัปดาห์ โดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป statistic version 8

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบยีนต้านทานโรค (detection of assistant gene)

ตรวจสอบยีน *Ty-2* และ *Ty-3* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR markers P1-6 และ P6-25 ตามลำดับ (Yang et al., 2014; Ji et al., 2007b) (Table 3) ทดสอบกับมะเขือเทศจำนวน 32 สายพันธุ์ โดยนำใบอ่อนของมะเขือเทศอายุ 20 วัน จำนวน 2-3 ใบมาสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค CTAB method (Doyle and Doyle., 1987) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ปริมาตร 25 µl แต่ละปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย genomic DNA 1 µl primer ความเข้มข้น 10 µ dNTP ความเข้มข้น 50 µM Mg²⁺ เข้มข้น 2.5 µM และ Taq DNA polymerase 1 unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย dH₂O นำ PCR products ปริมาตร 5 µl มาแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยเทคนิค electrophoresis ด้วย 1.5 % agarose gel ใน 0.5 X TBE buffer ด้วยเครื่อง

gel electrophoresis (BIO-RAD, DNA SUB CELL Tm และ BIO-RAD, PROTEIN @II Xi CELL) กระแสไฟ 100 โวลต์ (BIO-RAD Modell 1000/500 power supply) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตบันทึกภาพด้วยกล้อง รุ่น Alpha Imager 3300 system และให้บันทึกผลตามขนาดของดีเอ็นเอที่ปรากฏ นำแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในมะเขือเทศแต่ละสายพันธุ์หาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลือง (TYLCTHV-NP) (validation) คือ SCAR-P1-6 ที่ตำแหน่ง 300 bp (*Ty-2*) เป็นตำแหน่งด้านทาน และ 600 bp (*ty-2*) เป็นตำแหน่งอ่อนแอ และ SCAR-P6-25 ที่ตำแหน่ง 450 bp และ 320 bp เป็นตำแหน่งด้านทานและอ่อนแอตามลำดับ (Table 3)

Table 1 List of 32 tomato germplasms used for screening to *Tomato yellow leaf curl Thailand virus-Nakhon*

<i>Pathom</i> (TYLCTHV-NP)							
No.	Code	Name/Pedigree	Original resource	No.	Code	Name/Pedigree	Original resource
1	AVTO1418	CLN3669A	WorldVeg	17	TP005	-	TKR&D
2	AVTO1420	CLN3670B	WorldVeg	18	TP007	-	TKR&D
3	AVTO1422	CLN3670F	WorldVeg	19	TP008	-	TKR&D
4	AVTO1424	CLN3682C	WorldVeg	20	KKU-T44064	-	TGRC
5	AVTO9801	CLN1621L	WorldVeg	21	KKU-T24141	PI269140	WorldVeg
6	AVTO1003	CLN3125L	WorldVeg	22	KKU-T34145	PI370072-73AISD	USDA
7	AVTO1008	CLN3078C	WorldVeg	23	KKU-T24060	L01251	WorldVeg
8	AVTO0102	CLN2366B	WorldVeg	24	KKU-T24063	L01321-A	WorldVeg
9	AVTO1219	CLN3241H-27	WorldVeg	25	KKU-T24065	L01346	WorldVeg
10	AVTO1314	CLN3212C	WorldVeg	26	KKU-T24064	L01321-B	WorldVeg
11	T1	-	TKR&D	27	KKU-T24127	NAN TZU	Hsin Ho Seed Co. Chia I
12	T2	-	TKR&D	28	KKU-T14009	CLN3022F2-154-44-14-3-15	TGRC
13	T3	-	TKR&D.	29	KM-T10018-3-5	Pettcure	Japan
14	TP001	-	TKR&D	30	KM-T10018-3-6	Pettcure	Japan
15	TP003	-	TKR&D	31	KM-T10018-3-2	Pettcure	Japan
16	TP004	-	TKR&D	32	Seedathip 3	Seedathip 3	TVRC

Remark: WorldVeg = The World Vegetable Center; TGRC = Tomato Genetics Resource Center; USDA = The United States Department of Agriculture; TVRC = Tropical Vegetable Research Center; TKR&D = Seed company

Table 2 Disease scale for rating of tomato leaf curl disease caused by TYLCTHV-NP

Disease rating	Symptoms	Severity index	Disease response
0	No visible symptom	0	highly resistant
1	Very slight yellowing and minor curling of leaflet margins on apical leaf	0.1-1.4	resistant
2	Obviously yellowing and curling of leaflet ends	1.5-2.4	moderate resistant
3	A wide range of leaf yellowing, curling and cupping, with some reduction in size, yet plants continue to develop	2.5-3.4	susceptible
4	Very severe plant stunting and yellowing, and pronounced cupping and curling	3.5-4	highly susceptible

adapted from Akhtar et al. (2019)

Table 3 SCAR markers P1-6 and P6-25 with their primer sequences and targeted resistance genes

Resistant gene (Chromosome)	Primer	Primer sequence	Product size and sources	Reference
<i>Ty-2</i> (Ch 11)	P1-16	F ^{1/} : CACACATATCCTCTATCTATTAGCTG R ^{2/} : CGGAGCTGAATTGTATAAACACG	R ^{3/} : 300 bp S ^{4/} : 600 bp	Yang et al.,2014
<i>Ty-3</i> (Ch 6)	P6-25	F ^{1/} : GGTAGTGAAATGATGCTGC C R ^{2/} : GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC	R ^{3/} : 450 bp S ^{4/} : 320 bp	Ji et al., 2007b

Remark: R = resistant band, S = susceptible band



Figure 1 Tomato yellow leaf curl Thailand virus-Nakhon Pathom (TYLCTHV-NP) scores in tomato seedling stage, 0: HR; highly resistant; 1: R; resistant; 2: MR; moderate resistant; 3: S; susceptible and 4: S; highly susceptible

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการประเมินความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง (TYLCTHV-NP) ในมะเขือเทศในระยะต้นกล้าโดยใช้เทคนิควิธีการเสียยอดจำนวน 32 สายพันธุ์ พบว่าพันธุ์มะเขือเทศแสดงการตอบสนองต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึง 6 หลังปลูกเชื้อ (DAI) (Table 4) ในสัปดาห์ที่ 1 มะเขือเทศเริ่มแสดงอาการเกิดโรคคล้ายในพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบ (สัปดาห์ที่ 3) จนถึงสัปดาห์ที่ 6 หลังจากปลูกเชื้อพบว่าอาการเกิดโรคหยุดพัฒนาและสามารถจัดกลุ่มตามการตอบสนองต่อโรคได้ 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 แสดงระดับต้านทาน (R) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ AVTO1008 AVTO1314 AVTO1422 และ KKU-T14009 แสดงค่าดัชนีความรุนแรงอยู่ระหว่าง 1.00-1.33 กลุ่มที่ 2 ระดับต้านทานปานกลาง (MR) 9 สายพันธุ์ ได้แก่ AVTO1003 AVTO1420 AVTO1424 KM-T10018-3-2 KM-T10018-3-5 KM-T10018-3-6 TP003 TP004 และ TP007 แสดงค่าดัชนีความรุนแรงอยู่ระหว่าง 1.48-2.38 กลุ่มที่ 3 ระดับอ่อนแอ (S) 16 สายพันธุ์ ได้แก่ AVTO9801 AVTO0102 AVTO1418 AVTO1219 KKU-T24127 KKU-T24141 KKU-T24060 KKU-T24063 KKU-T24064 KKU-T24065 KKU-T44064 TP001 TP005 TP008 T1 และ T2 แสดงค่าดัชนีความรุนแรงอยู่ระหว่าง 2.45-3.40 และกลุ่มที่ 4 ระดับอ่อนแอมาก (HS) ได้แก่ KKU-T34145 T3 และสัปดาห์ที่ 3

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCAR-P1-16 และ SCAR-P6-25 ช่วยคัดเลือกพันธุ์ที่มียืนต้านทาน *Ty-2* และ *Ty-3* ตามลำดับพบว่า SCAR-P1-16 สามารถแยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอได้ 2 ขนาดคือ 300 bp (*Ty-2*) จำนวน 11 สายพันธุ์ คือ AVTO1008

AVTO1418 AVTO1420 AVTO1422 AVTO1424 KKU-T14009 KM-T10018-3-2 KM-T10018-3-5 KM-T10018-3-6 TP004 และ TP008 ส่วนในมะเขือเทศสายพันธุ์อื่น ๆ รวมทั้งมะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบกับ สีดาทิพย์ 3 ไม่พบยีนต้านทานโดยพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาด 600 bp (*ty-2*) ที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 300 bp เป็นตำแหน่งที่รายงานว่ามีอยู่ใกล้ยีน *Ty-2* ดังนั้นมะเขือเทศกลุ่มนี้จึงน่าจะมี ยีน *Ty-2* ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล SCAR-P6-25 สามารถแยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอได้ 2 ขนาด คือ 450 bp (*Ty-3*) และ 320 bp (*ty-3*) ผลจากการจำแนกพบว่าขนาดดีเอ็นเอ 450 bp เป็นตำแหน่งที่อยู่ใกล้ยีน *Ty-3* (Ji et al., 2007b) พบในมะเขือเทศ 12 สายพันธุ์ ได้แก่ AVTO1003 AVTO1008 AVTO1219 AVTO1418 AVTO1420 AVTO1422 AVTO1424 KKU-T14009 KM-T10018-3-2 KM-T10018-3-5 KM-T10018-3-6 และ TP003 ส่วนในมะเขือเทศสายพันธุ์อื่น ๆ รวมทั้งมะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบกับ สีดาทิพย์ 3 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 320 bp (*ty-3*) กล่าวคือไม่พบยีนต้านทานโรคไวรัสใบหงิกเหลืองและนอกจากนี้ยังพบมะเขือเทศที่ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ยีน *Ty-2* และ *Ty-3* ได้แก่ AVTO1008 AVTO1418 AVTO1420 AVTO1422 AVTO1424 KKU-T14009 KM-T10018-3-2 KM-T10018-3-5 และ KM-T10018-3-6 (Table 4, Figure 2)

จากการศึกษาความเชื่อมโยงของการใช้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลและลักษณะความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง (TYLCTHV-NP) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล SCAR-P1-16 ใช้ตรวจสอบยีน *Ty-2* มีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะต้านทานโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV-NP) แสดงประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล 81.25% และเครื่องหมายโมเลกุล SCAR-P6-25 ใช้ตรวจสอบยีน *Ty-3* มีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะต้านทานโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV-NP) แสดงประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล 84.38% (Table 4) และเมื่อวิเคราะห์ความรุนแรงการเกิดโรคพบว่ากลุ่มที่ไม่มียีน *Ty-2* และ *Ty-3* แสดงความรุนแรงของโรครุนแรงมากที่สุด คือ 73.50% กลุ่มที่มียีน *Ty-2* แสดงความรุนแรงของโรค 57.25% กลุ่มที่มียีน *Ty-3* แสดงความรุนแรงของโรค 51.50% และกลุ่มที่มียีน *Ty-2* และ *Ty-3* แสดงความรุนแรงของโรค 43.50% และมะเขือเทศในกลุ่มนี้ แสดงการตอบสนองต่อโรคช้ากว่ากลุ่มที่มีเพียงยีนใดยีนหนึ่ง (Figure 3) ดังนั้นจะเห็นได้ว่ามะเขือเทศที่มียีนทั้งสองยีนจะแสดง ประสิทธิภาพความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองได้สูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ว่ายีน *Ty-2* และ *Ty-3* สัมพันธ์กับการ เกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลืองที่ระบาดในไทยและสามารถส่งเสริมความต้านทานต่อไวรัสใบหงิกเหลืองได้ (บุญส่ง และกรุง, 2557) อย่างไรก็ตามจากงานทดลองนี้พบว่ามะเขือเทศพันธุ์ AVTO1314 ไม่พบยีน *Ty-2* และ *Ty-3* อาจเนื่องมาจากพันธุ์ดังกล่าวมียีนต้านทาน *ty-5* ซึ่งควบคุมด้วยยีนด้อย (บุญส่ง และ กรุง, 2557; ชีวาล และคณะ, 2559) จึงเป็นไปได้ว่าพันธุ์ดังกล่าวสามารถแสดงความต้านทานต่อ เชื้อ TYLCTHV-NP ได้

นอกจากนี้วิธีการปลูกเชื้อเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโดยทั่วไปมักนิยมประเมินในสภาพแปลงปลูกแต่มีข้อจำกัดเนื่องจากความ รุนแรงของเชื้อ สภาพแวดล้อม ความชอบของพาหะนำโรค ความต้านทานของพืชอาศัยต่อพาหะ อายุของพืช และสภาพดิน และ นอกจากนี้เทคนิค whitefly-mediated inoculation โดยใช้แมลงหิวข้าวเป็นพาหะนำโรคก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ยอมรับแต่ยังพบปัญหา เนื่องจากพันธุ์ทดสอบที่แสดงความต้านทานนั้นอาจมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสหรือปริมาณเชื้อไวรัสไม่เพียงพอ (Akhtar et al., 2010) และมีกลไกทางกายภาพที่ขัดขวางการเข้าทำลายของแมลง เช่น ใบมีชั้น cuticles ที่หนาหรือมี trichomes เฉพาะที่ยังไม่ให้แมลงหิว ข้าวไม่สามารถเกาะและดูดกินน้ำเลี้ยง (Bellotti and Arias, 2001; Lapidot, 2007) ในทางกลับกันเทคนิคการเสียบยอดสามารถ เอาชนะปัญหาเหล่านั้นได้และเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อสูง (Abou Jawdah et al., 1995; Fargette et al., 1996; Kasrawi et al., 1988) ข้อดีของการเสียบยอดคือช่วยให้พืชทดสอบได้รับเชื้อในระดับสูงอย่างต่อเนื่อง (Friedmann et al., 1998) ทำให้สามารถแยกลักษณะต้านทานและอ่อนแอได้อย่างชัดเจน ซึ่งกลไกความต้านทานของพืชที่แสดงในสายพันธุ์ที่ต้านทานนั้น พบว่าอัตราการสะสมดีเอ็นเอของไวรัสในพันธุ์ต้านทานสะสมช้ากว่าในพันธุ์อ่อนแอ เมื่อศึกษาการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอของไวรัสจากใบที่ ปลูกเชื้อ (ใบที่อายุน้อยที่สุดของแต่ละต้น) พบว่าในพันธุ์อ่อนแอนั้นดีเอ็นเอของไวรัสได้เคลื่อนย้ายไปยังใบบนและรากเป็นทางเดียวกัน กับการเคลื่อนย้าย photoassimilates ไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช ในทางตรงกันข้ามการเคลื่อนย้ายของดีเอ็นเอไวรัสนั้นจำกัดอยู่ที่ใบที่ สองและบริเวณปลายยอดในพันธุ์ต้านทาน ซึ่งการยับยั้งอาการของโรคพบได้ 2 กลไก คือ ลดการสะสมดีเอ็นเอไวรัสในเนื้อเยื่อเมื่อได้รับ เชื้อที่มีปริมาณไวรัสต่ำ และเมื่อได้รับปริมาณเชื้อไวรัสที่สูงขึ้นพืชจะจำกัดการเคลื่อนย้ายเชื้อไวรัสในพืชไปยังส่วนต่าง ๆ ของลำต้น (long-distance movement) (Michelson et al. 1994; Lapidot and Polston, 2006) ดังนั้นการใช้เทคนิคการเสียบยอดเพื่อ

คัดเลือกพันธุ์ที่ต้านทาน TYLCV จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ดีและประเมินความต้านทานไวรัสได้โดยตรง และพันธุ์ที่ผ่านการประเมินโดยวิธีการเสียบยอดน่าจะเป็นพันธุ์ที่มีกลไกต้านทานต่อไวรัสอย่างแท้จริง

Table 4 Disease severity of 32 tomato germplasms to *Tomato yellow leaf curl Thailand virus-Nakhon Pathom* (TYLCTHV-NP) inoculation by grafting method and molecular marker identification

Code	Name/Pedigree	Severity index						Phenotype	SCAR- P1-16		SCAR-P6-25		
		7DAI	14DAI	21DAI	28DAI	35DAI	42DAI		Disease ^{1/} response	Genotype	Validation	Genotype	Validation
										Ty-2 ^{2/}	Ty-2 ^{2/}	Ty-3 ^{2/}	Ty-3 ^{2/}
KKU-T14009	CLN3022F2-154-44-14-3-15	0.00 ^c	0.00 ^k	0.00 ⁿ	0.25 ^m	0.85 ^s	1.00 ^k	R	+	+	+/-	+	
AVTO1314	CLN3212C	0.00 ^c	0.08 ^k	0.33 ^{ln}	0.45 ^{km}	1.13 ^{e-s}	1.25 ^{ik}	R	-	-	-	-	
AVTO1422	CLN3670F	0.00 ^c	0.00 ^k	0.13 ^{mn}	0.25 ^m	0.78 ^s	1.33 ^{hk}	R	+	+	+/-	+	
TP003	-	0.05 ^c	0.33 ^{fk}	0.70 ^{ln}	0.75 ^{lm}	1.10 ^s	1.48 ^{sk}	MR	-	-	+/-	+	
TP004	-	0.00 ^c	0.00 ^k	0.00 ⁿ	0.53 ^{km}	1.13 ^{e-s}	1.58 ^{fk}	MR	+	+	-	-	
KM-T10018-3-6	PETTCURE	0.00 ^c	0.68 ^{ck}	0.80 ^{hn}	1.10 sm	1.48 ^{e-s}	1.73 ^{ek}	MR	+	+	+/-	+	
AVTO1424	CLN3682C	0.00 ^c	0.00 ^k	0.10 ^{mn}	0.70 ^{lm}	1.33 ^{qs}	1.75 ^{ek}	MR	+	+	+/-	+	
KM-T10018-3-2	PETTCURE	0.00 ^c	0.43 ^{ek}	0.88 sm	1.23 ^{fm}	1.65 ^{bs}	1.90 ^{pk}	MR	+	+	+/-	+	
KM-T10018-3-5	PETTCURE	0.00 ^c	0.83 ^{bj}	1.10 ^{el}	1.38 ^{ek}	1.53 ^{cs}	1.95 ^{pk}	MR	+/-	+	+/-	+	
AVTO1003	CLN3125L	0.05 ^c	0.18 ^{hk}	0.33 ^{ln}	0.93 ^{hm}	1.50 ^{cs}	2.20 ^{ck}	MR	-	-	+/-	+	
TP007	-	0.10 ^{bc}	0.20 ^{hk}	0.33 ^{ln}	0.73 ^{lm}	1.38 ^{qs}	2.28 ^{bj}	MR	-	-	-	-	
AVTO1420	CLN3670B	0.05 ^c	0.15 ^k	0.38 ^{ln}	0.68 ^{lm}	1.75 ^{bs}	2.38 ^{ai}	MR	+	+	+/-	+	
KKU-T24060	L01251	0.00 ^c	0.35 ^{fk}	0.90 sm	1.45 ^{dk}	2.00 ^{as}	2.45 ^{ai}	S	-	+	-	+	
AVTO1219	CLN3241H-27	0.10 ^{bc}	0.40 ^{ek}	0.68 ^{ln}	1.35 ^{el}	1.80 ^{bs}	2.50 ^{ah}	S	-	+	+/-	-	
AVTO1418	CLN3669A	0.00 ^c	0.33 ^{fk}	1.00 ^{fl}	1.58 ^{ej}	1.88 ^{as}	2.50 ^{ah}	S	+	-	+/-	-	
KKU-T24063	L01321-A	0.00 ^c	0.85 ^{bj}	1.60 ^{ah}	1.75 ^{bi}	2.20 ^{af}	2.65 ^{qs}	S	-	+	-	+	
T1	-	0.00 ^c	0.50 ^{dk}	1.25 ^{dk}	1.85 ^{bh}	2.35 ^{ae}	2.70 ^{qs}	S	-	+	-	+	
AVTO0102	CLN2366B	0.00 ^c	0.08 ^k	0.53 ^{kn}	1.03 sm	1.95 ^{as}	2.78 ^{af}	S	-	+	-	+	
T2	-	0.05 ^c	0.70 ^{ck}	1.35 ^{ej}	1.60 ^{ej}	2.00 ^{as}	2.95 ^{ae}	S	-	+	-	+	
AVTO9801	CLN1621L	0.00 ^c	0.25 ^{sk}	0.48 ^{kn}	1.03 sm	2.43 ^{ad}	2.95 ^{ae}	S	-	+	-	+	
TP008	-	0.10 ^{bc}	1.10 ^{ae}	1.95 ^{ad}	2.20 ^{af}	2.70 ^{ac}	3.00 ^{ad}	S	+	-	-	+	
TP001	-	0.05 ^c	0.90 ^{ah}	1.50 ^{bi}	2.03 ^{as}	2.53 ^{ad}	3.10 ^{ad}	S	-	+	-	+	
KKU-T24064	L01321-B	0.00 ^c	0.95 ^{as}	1.60 ^{ah}	2.05 ^{as}	2.25 ^{af}	3.10 ^{ad}	S	-	+	-	+	
KKU-T24065	L01346	0.05 ^c	1.23 ^{ac}	1.75 ^{af}	2.35 ^{ae}	2.65 ^{ac}	3.13 ^{ad}	S	-	+	-	+	
KKU-T44064	-	0.30 ^{ab}	1.15 ^{ad}	1.60 ^{ah}	1.80 ^{bh}	2.50 ^{ad}	3.25 ^{ac}	S	-	+	-	+	
TP005	-	0.00 ^c	1.20 ^{ad}	2.30 ^{ab}	2.60 ^{ac}	2.70 ^{ac}	3.35 ^{ac}	S	-	+	-	+	
KKU-T24127	Non TZU	0.00 ^c	0.88 ^{bi}	1.65 ^{as}	2.25 ^{af}	2.83 ^{ab}	3.40 ^{ac}	S	-	+	-	+	
KKU-T24141	PI269140	0.20 ^{ac}	1.60 ^a	2.15 ^{ac}	2.90 ^a	3.05 ^a	3.40 ^{ac}	S	-	+	-	+	
T3	-	0.40 ^a	1.00 ^{af}	1.88 ^{ae}	2.43 ^{ad}	2.85 ^{ab}	3.45 ^{ab}	HS	-	+	-	+	
KKU-T34145	PI370072-73AISD	0.00 ^c	1.5 ^{ab}	2.38 ^a	2.68 ^{ab}	2.83 ^{ab}	3.48 ^{ab}	HS	-	+	-	+	
Seedathip3 ^{3/}	-	0.10 ^{bc}	1.10 ^{ae}	1.95 ^{ad}	2.25 ^{af}	2.70 ^{ac}	3.60 ^a	HS	-	+	-	+	
AVTO1008 ^{4/}	CLN3078C	0.00 ^c	0.05 ^k	0.15 ^{mn}	0.33 ^{lm}	1.03 ^{qs}	1.13 ^k	R	+	+	+	+	
Mean		0.05	0.59	1.05	1.45	1.96	2.49						
F-test ^{5/}		**	**	**	**	**	**			81.25%		84.38%	
C.V.%		256.59	65.4	41.28	38.7	34.16	26.97						

^{1/}Disease response 0 = highly resistant (HR), 0.1-1.4 = resistant (R), 1.5-2.4 = moderate resistant (MR), 2.5-3.4 = susceptible (S), 3.5-4.0 = highly susceptible (HS), ^{2/}Ty-2 and Ty-3 genes condition TYLCD resistance and presence (+) or absence (-) was determined by molecular markers P1-16 (Ty-2) and P6-25 (Ty-3), ^{3/}susceptible check, ^{4/}resistant check, ^{5/}mean with different letters indicate statistically significant different at P-value <0.01 (**) by Least Significant Difference (LSD)

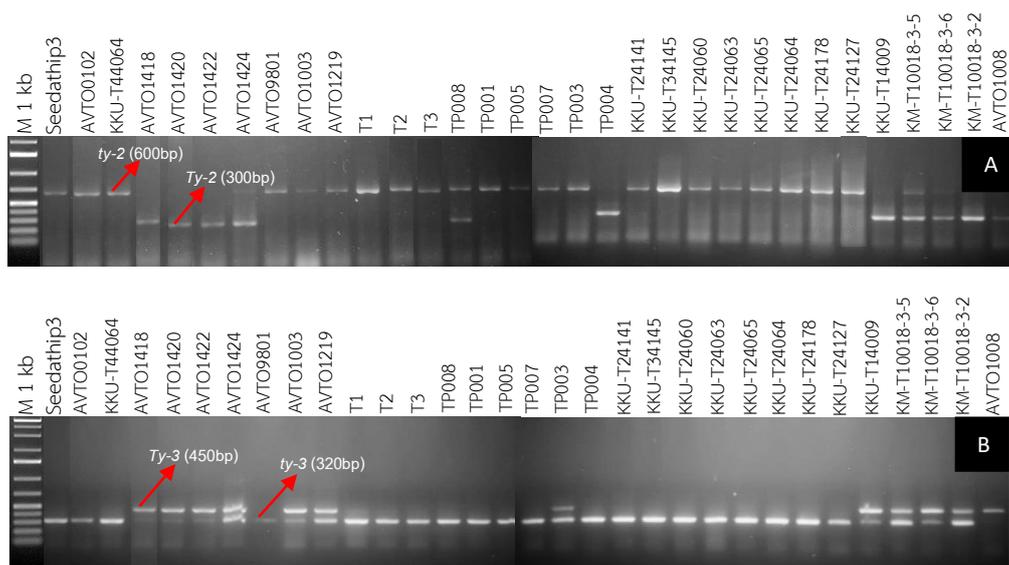


Figure 2 DNA fragments amplified by SCAR-P1-16 (A) and SCAR-P6-25 (B); lane 1: 1 kb marker; lane 2: Seedathip 3 (susceptible check); lane 3-32: other genotypes for detection of an assistant gene; last Lane: AVTO1008 (resistant check)

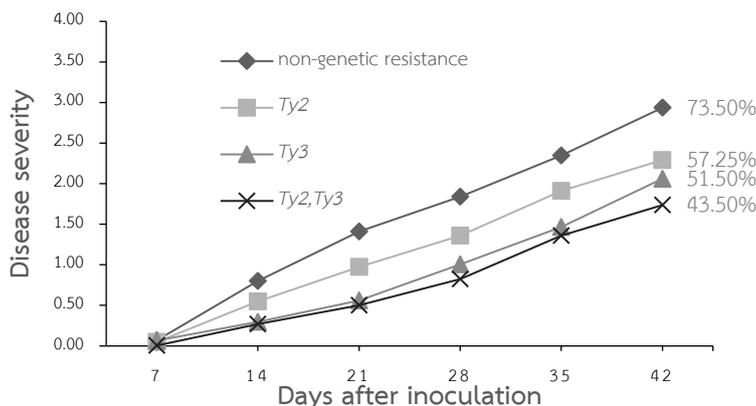


Figure 3 The relationship between disease severity and days after inoculation in four tomato groups responses to TYLCTHV-NP

สรุป

ได้เชื้อพันธุกรรมมะเขือเทศที่แสดงระดับความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV-NP) จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ AVTO1008 AVTO1314 AVTO1422 และ KKU-T14009 และพันธุ์ดังกล่าวนี้พบขนาดแถบดีเอ็นเอที่ amplified ด้วย SCAR marker-P1-16 และ SCAR marker-P6-25 ที่ใกล้เคียงกับ Ty-2 และ Ty-3 ยกเว้นพันธุ์ AVTO1314 และเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวยังแสดงประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลได้ถึง 81.25% และ 84.38% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในมะเขือเทศที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลนี้แสดงความสามารถในการเกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลืองน้อยที่สุด ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพช่วยในการคัดเลือกความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองในมะเขือเทศอุตสาหกรรมได้

คำขอบคุณ

โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) และ บริษัท ที. เค. อาร์แอนด์ ดี ที่สนับสนุนทุนวิจัย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น The World Vegetable center (Taiwan) ศูนย์วิจัยและพัฒนาผักเขตร้อน และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อพันธุกรรมเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและสถานที่ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ชัชวาล แสงฤทธิ์, ญาณิศา แสงสอดแก้ว Tsai, W. S. และ สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. 2559. การประเมินพันธุ์มะเขือเทศต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 3(ฉบับพิเศษ): M01/66-72.
- บุญส่ง เอกพงษ์ และกรุง สีตะชนี. 2557. การประเมินพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในสภาพแปลงปลูกในจังหวัดอุบลราชธานี. แก่นเกษตร. 42(ฉบับพิเศษ 3): 718-724.
- พัชรภรณ์ สุวอ. 2560. โรคไวรัสใบหงิกเหลืองในพริกและแนวทางในการจัดการโรค. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 35(2): 147-152.
- พัชรภรณ์ สุวอ, มณฑินี อีธาร์กซ์, ธวัชชัย มยศิริยานันท์, นครินทร์ จีอาทิตย และสุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. 2561. การประเมินพันธุ์มะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กต้านทานโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV) และตรวจสอบยีนต้านทาน *Ty-2* และ *Ty-3* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. แก่นเกษตร. 46(5): 965-974.
- Abou Jawdah, Y., W. A. Shebaro, and K. H. Soubra. 1995. Detection of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) by a digoxigenin-labelled DNA probe. *Phytopathologia Mediterranea*. 34: 52–57.
- Akhtar, K. P., A. Akram, N. Ullah, M. Y. Saleem, and M. Saeed. 2019. Evaluation of *Solanum* species for resistance to *Tomato leaf curl New Delhi virus* using chip grafting assay. *Scientia Horticulturae*. 256: 108646.
- Akhtar, K. P., M. Y. Saleem, M. Asghar, M. Ahmad, and N. Sarwar. 2010. Resistance of *Solanum* species to Cucumber mosaic virus subgroup IA and its vector *Myzus persicae*. *European Journal of Plant Pathology*. 128: 435–450.
- Bellotti, A. C., and B. Arias. 2001. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. *Crop Protection*. 20: 813–824.
- Chomdej, O., U. Pongpayaklers, and J. Chunwongse. 2012. Resistance to *tomato yellow leaf curl virus*-Thailand isolate (TYLCTHV- [2]) and markers loci association in BC₂F₁ population from a cross between Seedathip 3 and a wild tomato, *Solanum habrochaites* ‘L06122’ clone no.1. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 34: 31-36.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical. Bulletin*. 19: 11–15.
- Fargette, D., M. Leslie, and B. D. Harrison. 1996. Serological studies on the accumulation and localization of three tomato leaf curl geminiviruses in resistant and susceptible *Lycopersicon* species and tomato cultivars. *Annals of Applied Biology*. 128: 317–328.
- Friedmann, M., M. Lapidot, S. Cohen, and M. Pilowsky. 1998. A novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 123: 1004–1007.
- Hanley, B. L., E. R. Bejarano, D. Robertson, and S. Mansoor. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*. 11(11): 777-788.
- Hanson, P., S. K. Green, and G. Kuo. 2006. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus in a cultivated tomato line. *Tomato Genetic Cooperative report*. 56: 17-18.

- Hutton, S. F., and J. W. Scott. 2014. *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. Report of the Tomato Genetics Cooperative. 64: 14–18.
- Ji, Y., D. J. Schuster, and J. W. Scott. 2007a. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*. 20: 271–284.
- Ji, Y., M. S. Salus, B. Van Betteray, J. Smeets, K. S. Jensen, C. T. Martin, L. Mejia, J. W. Scott, M. J. Havey, and D. P. Maxwell. 2007b. Co-dominant SCAR Markers for Detection of the *Ty-3* and *Ty-3a* Loci from *Solanum chilense* at 25 cM of Chromosome 6 of Tomato. *Tomato Genetics Cooperative*. 57: 25-29.
- Ji, Y., J. W. Scott, D. J. Schuster, and D. P. Maxwell. 2009. Molecular mapping of *Ty-4*, a new Tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 134: 281–288.
- Kadirvel, P., R. De la Peña, R. Schafleitner, S. Huang, S. Geethanjali, L. Kenyon, W. Tsai, and P. Hanson. 2012. Mapping of QTLs in tomato line FLA456 associated with resistance to a virus causing tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica*. 190: 297–308.
- Kasrawi, M. A., M. A. Suwwan, and A. Mansour. 1988. Sources of resistance to tomato yellow leaf curl virus TYLCV in *Lycopersicon* species. *Euphytica*. 37: 1–64.
- Kenyon, L., W. S. Tsai, S. L. Shih, and L. M. Lee. 2014. Emergence and diversity of begomoviruses infecting Solanaceous crops in East and Southeast Asia. *Virus Research*. 186: 104-113.
- Kil, E. J., S. Kim, Y. J. Lee, H. S. Byun, J. Park, H. Seo, C. S. Kim, J. K. Shim, J. H. Lee, J. H. L. Kim, K. Y. Lee, H. S. Choi, and S. Lee. 2015. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports*. 6: 19013.
- Lapidot, M. 2007. Screening for TYLCV-resistance plants using Whitefly-mediated Inoculation. P. 329–342. In: H. Czosnek (eds). *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*. Springer press, Dordrecht, The Netherlands.
- Lapidot, M., and J. E. Polston. 2006. Resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomato. P. 503-520. In: G. Loebenstein and J. P. Carr (eds). *Natural Resistance Mechanisms of Plant Viruses*. Printed in the Netherlands.
- Lapidot, M., U. Karniel, D. Gelbart, D. Fogel, D. Evenor, Y. Kutsher, Z. Makhbash, S. Nahon, H. Shlomo, L. Chen, M. Reuveni, and I. Levin. 2015. A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor pelota. *PLOS Genetics*. 11: e1005538.
- Michelson, I., D. Zamir, and H. Czosnek. 1994. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology*. 84: 928-933.
- Nevame, A.Y.M., L. Xia, Z. Wenting, C. G. Nchongboh, L. Wenhui, M. M. Hasan, Md. A. Alam, and S. Longting. 2020. Validation of some disease-resistance molecular markers associated with multiple diseases in tomato for marker-assisted selection program. *ScienceAsia*. 46: 19-29.
- Prasad, A., N. Sharma, G. G. Hari, M. Muthamilarasan, and M. Prasad. 2020. Tomato yellow leaf curl virus: impact, challenges, and management. *Trends in Plant Science*. 25(9): 897-911.
- Sahu, P. P., S. Singh, and M. Khan. 2012. Recent advances in molecular biotechnology to combat the tomato leaf curl virus infection in tomato. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*. 1(3): 294-298.

- Singh, K. 2014. Evaluation of tomato genotypes and its reaction against ToLCV causing leaf curl disease in tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2(1S): 120-125.
- Verlaan, M. G., S. F. Hutton, R. M. Ibrahim, R. Kormelink, R. G. F. Visser, J. W. Scott, J. Edwards, and Y. Bai. 2013. The Tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLOS Genetics*. 9(3): e1003399.
- Yang, X., M. Cara, S. F. Hutto, J. W. Scott, Y. Guo, X. Wan, M. H. Rashi, D. Szina, H. D. Jong, R. G. F. Visser, Y. Bai, and Y. Du. 2014. Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. *Molecular Breeding*. 34: 749-76.
- Zamir, D., I. Michelson, Y. Zakay, N. Navot, N. Zeidan, M. Sarfatti, Y. Eshed, E. Harel, T. Pleban, H. Van-Oss, N. Kedar, H. D. Rabinowitch, and H. Czosnek. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*. 88: 141-146.