การทดสอบความต้านทานของยีนหลัก Ty-2 บนโครโมโซม 11 ในมะเขือเทศผสมกลับรุ่น BC6F2 ระหว่างสายพันธุ์ป่า Solanum habrochaites accession 'L06112' clone No.1 กับสีดาทิพย์3 ต่อเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศใน 3 สถานที่

The Evaluation of Resistant Level of Ty-2 gene on Chromosome 11 to Tomato Yellow Leaf Curl Virus at BC6F2 Generation between a Cross of Wild Species Tomato, Solanum habrochaites Accession 'L06112' Clone No.1 and Commercial Cultivar, Seedathip3 in 3 Locations

อรอุบล ชมเดช*, อิสระยศ สินบุญยะมะ, อุไรวรรณ พงษ์พยัคเลิศ และ นริศา เจือจุน
ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
จุลภาค คุ้นวงศ์
ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

Received: July 22, 2021 ; Accepted: December 2, 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการทดสอบความต้านทานโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในรุ่น BC_6F_2 จากการปรับปรุงพันธุ์ระหว่างพันธุ์ป่า *Solanum habrochaites* accession 'L06112' กับพันธุ์การค้าสีดาทิพย์3 ร่วมกับการคัดยีน *Ty-2* บนโครโมโซม 11 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล โดยปลูกทดสอบใน 3 พื้นที่ที่มีเชื้อไวรัสต่างไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลทนครปฐม ในแปลงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม, ไอโซเลทเชียงใหม่ ในโรงเรือนบริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด จังหวัดสุพรรณบุรี และไอโซเลทหนองคายในแปลงบริษัทซินเจนทา จังหวัดขอนแก่น ให้คะแนนการเกิดโรคทุกสัปดาห์รวม 7 สัปดาห์ และวัดปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ในสัปดาห์ที่ 7 พบว่าสายพันธุ์ป่าแสดงความต้านทานโรคทั้ง 3 สถานที่ทดสอบ มีค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคไม่เกิน 0.3 และค่า ELISA ที่แสดงว่าไม่เป็นโรค สีดาทิพย์3 อ่อนแอต่อโรคทั้งใน 3 สถานที่ทดสอบ โดยค่าเฉลี่ยการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 2.48-3.06 ส่วนมะเขือเทศลูกผสมรุ่น F_1 แสดงความต้านทานในระดับดี คะแนนการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 0.73-1.5 และมะเขือเทศในรุ่น BC_6F_2 แสดงความต้านทานในระดับปานกลางถึงอ่อนแอ ซึ่งเป็นผลมาจากการคัดเลือกตำแหน่งยีนต้านทานหลักบนโครโมโซม 11 เพียงตำแหน่งเดียว และ

**Corresponding author: ornubol@gmail.com*
DOI:10.14456/tjst.2021.34

อาจยังมีการกระจายตัวของยีนบางตำแหน่งอยู่ ดังนั้นจึงควรรวมยีนต้านทานอื่น เพื่อให้สามารถต้านทานต่อเชื้อได้ในหลายพื้นที่ปลูก

คำสำคัญ : ไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ; ยีน Ty-2; การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรค

Abstract

Tomato yellow leaf curl disease is one of the diseases that cause damage to commercial tomato cultivars in every region of Thailand. The Seedathip3 tomato cultivar was used for introgression of TYLCV (tomato yellow leaf curl Thailand virus) resistance genes from a wild species, *Solanum habrochaites* L06112 accession. Tomato seedlings from the BC_6F_2 generation were verified by 3 positions of DNA markers for containing a major resistance gene on chromosome 11. The BC_6F_2 generations were tested for TVLCV resistance at 3 locations with different viral isolations. The locations included; TYLCTHV-[NP] at TVRC Kasetsart University, Nakhon Pathom province, TYLCTHV-[CM] at East-West Seed Company Suphanburi province, and TYLCTHV-[NK] at Syngenta Company Khon Kaen province. Different inoculation methods were used at each of the three locations. Symptom observations were recorded every week for 7 weeks. The viral concentrations were checked at 7 weeks post-inoculation. The resistance line, *S. habrochaites* showed complete resistance at 3 locations with the highest disease score at 0.3 and ELISA readings with presence lower than the cut-off value, while Seedathip3 showed susceptibility at all 3 locations with disease scoring of 2.48-3.06. The F_1 generation of Seedathip3 and *S. habrochaites* showed disease scores in the range of 0.73-1.5. The BC_6F_2 results showed susceptibility with disease scores higher than F_1 generation at all locations. This is the result of only the *Ty-2* selection on chromosome 11. *S. habrochaites* has another gene that affects the mechanism of TYLCV resistance. The commercial tomato cultivars require resistant gene combinations to improve the level of TYLCTHV resistance.

Keywords: tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV); *Ty-2* gene; breeding for disease resistance

1. บทนำ

มะเขือเทศเป็นพืชผักที่ใช้ในการบริโภคผลสดหรือนำไปทำการแปรรูป เช่น ซอสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศ มะเขือเทศอบแห้ง เป็นต้น มะเขือเทศจึงนับว่าเป็นพืชผักที่มีความสำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่ง แต่เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของศัตรูพืช อีกทั้งมะเขือเทศสายพันธุ์การค้าส่วนใหญ่ยังอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลง จึงส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณลดลงและคุณภาพที่ต่ำกว่ามาตรฐาน

โรคใบหงิกเหลืองเป็นสาเหตุหนึ่งที่สร้างความเสียหายอย่างมากให้กับพื้นที่ที่มีการปลูกมะเขือเทศในประเทศไทย โรคนี้เกิดจากเชื้อไวรัสใบหงิก

เหลืองมะเขือเทศ (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*; TYLCV) TYLCV เป็นไวรัสในกลุ่ม Geminivirus อยู่ในวงศ์ *Geminiviridae* สกุล Begomovirus ถ่ายทอดโรคโดยมีแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะ อาการที่เด่นชัดของโรค คือ ใบหงิกเหลือง ขอบใบม้วนงอขึ้นหรือลง และอาการสามารถแพร่กระจายไปตามส่วนอื่นๆ ของพืช (Systemic infection) ถ้าอาการรุนแรงพืชจะแคระแกร็น ใบที่แตกใหม่จะมีขนาดเล็กและหงิก ดอกฝ่อและหลุดร่วงไป อาจทำให้ผลผลิตลดลงถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ (Green and Kalloo, 1994)

ประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV) อยู่ 4 ไอโซเลท ได้แก่ TYLCTHV-[2] หรือเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย ไอโซเลทนครปฐม (TYLCTHV-[NP]), ไอโซเลทเชียงใหม่ (TYLCTHV-[CM]), ไอโซเลทสกลนคร (TYLCTHV-[SK]), และไอโซเลทหนองคาย (TYLCTHV-[NK]) (Sawagjit *et al*., 2005) และมีการศึกษาลำดับเบสของ TYLCTHV-[2] ครบสมบูรณ์ (whole genome sequence) ตั้งแต่ปี 1994 (Attathom *et al*., 1994; Rochester *et al*., 1994)

การนำยีนต้านทานโรคจากมะเขือเทศสายพันธุ์ป่า เช่น *S. pimpinellifolium*, *S. peruvainnum*, *S. harbrochaites*, *S. cheesmanii* มาปรับปรุงให้สายพันธุ์การค้าต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลือง มักพบว่ามียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานมากกว่า 1 ยีน ปัจจุบันมีรายงานตำแหน่งของยีนต้านทานโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศแล้วดังนี้ *Ty-1* (Zamir *et al*., 1994), *Ty-2* (Hanson *et al*., 2000), *Ty-3* (Ji *et al*., 2007), *Ty-4* (Ji *et al*., 2009) และ *Ty-5* (Anbinder *et al*., 2009)

มะเขือเทศสายพันธุ์ป่า *Solanum habrochaites* accession L06112 clone No.1 ที่ได้ทดสอบแล้วว่ามีความต้านทานในระดับสูงต่อเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทยทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ นครปฐม เชียงใหม่ สกลนคร และหนองคาย ถูกใช้เป็นสายพันธุ์พ่อในการถ่ายทอดยีนต้านทานให้กับสายพันธุ์การค้า สีดาทิพย์3 (Chomdej and Chunwongse, 2006; Chomdej *et al*., 2008; Chomdej *et al*., 2016) และได้ทำการศึกษาตำแหน่งยีนต้านทานในประชากรรุ่น BC_2F_1 พบตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศไอโซเลทนครปฐม บนโครโมโซมที่ 11 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ TG400, T0302 และ TG105A และมีค่า LOD สูงถึง 10.77 (Pongpayaklers, 2011)

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบลูกผสมกลับรุ่น BC_6F_2 ที่ได้จากการคัดเลือกยีนโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวไปทดสอบในระดับแปลงปลูกใน 3 สถานที่ ได้แก่ แปลงทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม, โรงเรือนแมลง บริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด จังหวัดสุพรรณบุรี และแปลงทดลอง บริษัทซินเจนทา จังหวัดขอนแก่น เพื่อศึกษาระดับความต้านทานของยีนหลักบนโครโมโซมที่ 11

2. วิธีการ

2.1 สายพันธุ์มะเขือเทศและจำนวนต้น/สถานที่ทดสอบ

2.1.1 มะเขือเทศสายพันธุ์ป่า *Solanum habrochaites* accession 'L06112' clone No. 1 (สายพันธุ์พ่อ) เพิ่มจำนวนซ้ำด้วยการปักชำ จำนวน 20 ต้น

2.1.2 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์3 (สายพันธุ์แม่) จำนวน 20 ต้น

2.1.3 มะเขือเทศลูกผสมรุ่น F_1 (B) เพิ่มจำนวนซ้ำด้วยการปักชำ จำนวน 20 ต้น

2.1.4 มะเขือเทศลูกผสมรุ่น BC_1F_2 (B10) เพิ่มจำนวนซ้ำด้วยการปักชำ จำนวน 20 ต้น

2.1.5 มะเขือเทศรุ่น BC_6F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ TG400, T0302 และ TG105A จำนวน 8 สายต้น ได้แก่ B10-2-2-38-11-20, B10-2-2-38-29-4, B10-2-2-38-29-9, B10-2-2-38-11-2, B10-2-2-38-11-40, B10-2-2-13-8-9, B10-2-2-13-8-23 และ B10-2-2-13-8-1 ผสมตัวเองเป็นรุ่น BC_6F_2 แล้วปลูกออกสายต้นละ 20 เมล็ด

2.2 การคัดเลือกยีนต้านทานโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศบนโครโมโซมที่ 11

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบเลี้ยงมะเขือเทศด้วยวิธีของ Fulton *et al.* (1995)

2.2.2 ตรวจสอบตำแหน่งยีนต้านทานโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ TG400, T0302 และ TG105A โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

Primer TG400

TG400F: 5'- TCC AAA TCC ACC ACC TAT CC -3'

TG400R: 5'- AGC ATT GCT CCC TGC TAA AG -3'

Primer T0302

TG0302F: 5'- TGG CTC ATC CTG AAG CTG ATA GCG C -3'

TG0302R: 5'- AGT GTA CAT CCT TGC CAT TGA CT -3'

Primer TG105A

TG105AF: 5'- CTT CAG AAT TCC TGT TTT AGT CAG TTG AAC C -3'

TG105AR: 5'- ATG TCA CAT TTG TTG CTT GGA CCA TCC -3'

2.2.3 แยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วย 2% Agarose gel Electrophoresis ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 50 นาที

2.3 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ

2.3.1 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย ไอโซเลทนครปฐม ทดสอบในแปลงทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม: ถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยใช้ภาชนะครอบต้นทดสอบแต่ละต้นร่วมกับแมลงหวี่ที่เป็นโรคประมาณ 15-20 ตัว (cages) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงย้ายลงแปลงปลูก

2.3.2 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย ไอโซเลทเชียงใหม่ ทดสอบในโรงเรือนแมลง บริษัทอีสท์เวสท์ ซีด จำกัด จังหวัดสุพรรณบุรี: ถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยปล่อยให้แมลงหวี่ขาวถ่ายทอดเชื้ออย่างอิสระภายในโรงเรือนตลอดการทดสอบ

2.3.3 เชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทย ไอโซเลทหนองคาย ทดสอบในแปลงทดลอง บริษัทซินเจนทา จังหวัดขอนแก่น: ถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยปล่อยให้แมลงหวี่ขาวถ่ายทอดเชื้ออย่างอิสระในแปลงปลูก

2.4 การให้คะแนนการเกิดโรค ตามวิธีของ Friedmann *et al.* (1998)

0 = ไม่แสดงลักษณะอาการของโรค

1 = แสดงอาการเส้นใบเหลืองเล็กน้อยที่ใบอ่อน

2 = แสดงอาการใบเหลืองและเริ่มหงิกงอ

3 = แสดงอาการใบเหลืองมากขึ้น ใบหงิกงอ ขอบใบม้วน ลดรูป

4 = แสดงอาการใบเหลืองมากขึ้น ใบหงิกงอ ขอบใบม้วน ลดรูป ต้นแคระแกร็น และหยุดการเจริญเติบโต

2.5 ตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ในสัปดาห์ที่ 7 หลังการถ่ายทอดเชื้อ โดยจะใช้ค่า ELISA ของ Positive control คูณด้วยสอง เพื่อใช้เป็นเกฏบอกว่าพืชมีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่ถือว่าเป็นโรค (Sutula *et al*., 1986)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการทดสอบความต้านทานของมะเขือเทศสายพันธุ์ป่า *S. habrochaites* 'L06112' clone no. 1 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ พบว่าแสดงความต้านทานในระดับสูงทั้ง 3 สถานที่ทดสอบ โดยมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 0 ในแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และในแปลงทดลองบริษัทซินเจนทา จังหวัดขอนแก่น ส่วนในโรงเรือนแมลงบริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด จังหวัดสุพรรณบุรี และมีคะแนนการเกิดโรคเฉลี่ยเท่ากับ 0.33 ในขณะที่มะเขือเทศสีดาทิพย์3 ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์แม่แสดงความอ่อนแอต่อโรคในทั้ง 3 สถานที่ทดสอบ

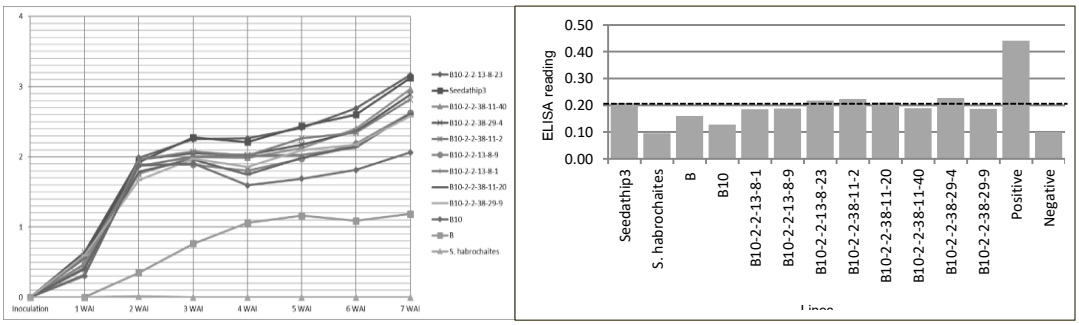

Figure 1 The symptom observations responded to TYLCTHV-[NP] isolate at TVRC research field, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom were rated every week for 7 weeks. Symptoms were scored using a rating scale from 0-4 according to their severity (a). The viral concentrations were measured at 7th week post inoculation viral concentration above a threshold (Dot line) were considering infected with TYLCV (b).

โดยมีคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรคที่ 2.48 ที่โรงเรือนแมลงบริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด คะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 3.06 ที่แปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน และเท่ากับ 2.73 ที่แปลงทดลองบริษัทซินเจนทา จำกัด เมื่อวัดปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่ามีปริมาณเชื้อสูงในระดับที่เป็นโรค ยกเว้นมะเขือเทศในโรงเรือนแมลงบริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ตรวจพบว่ามีปริมาณเชื้อค่อนข้างต่ำในทุกสายพันธุ์ทดสอบ อย่างไรก็ตาม พบว่าสายพันธุ์สีดาทิพย์3 มีปริมาณเชื้อไวรัสสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ทดสอบอื่นๆ (Figure 1, 2 และ 3) ลูกผสมในรุ่น F_1 ระหว่าง 'L06112' และ สีดาทิพย์3 ยังคงลักษณะความต้านทานอยู่ในระดับดีในทั้งสามสถานที่ทดสอบ โดยมีค่าเฉลี่ยอาการของโรคอยู่ระหว่าง 0.8 - 1.47 และมีปริมาณเชื้อไวรัสในระดับต่ำที่จัดว่าไม่เป็นโรค ส่วนลูกผสมกลับรุ่น BC_6F_2 แสดงระดับอาการของโรคที่แตกต่างกันไปในแต่ละสถานที่ทดสอบ (Figure 1, 2 และ 3)

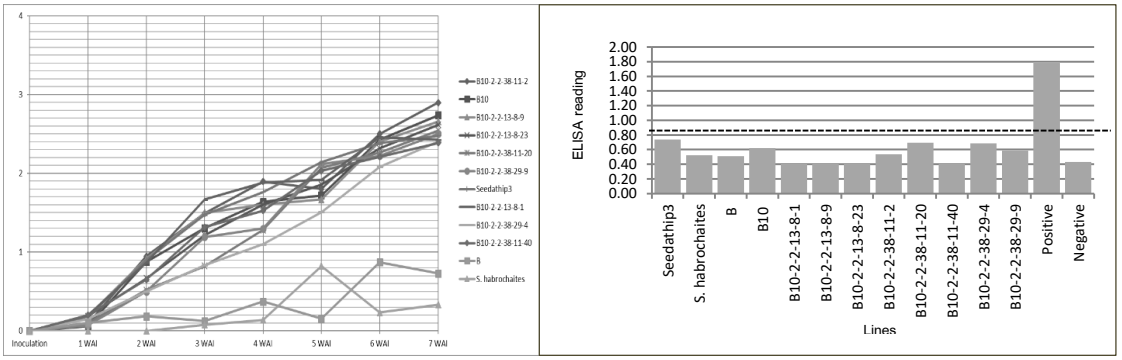

Figure 2 The symptom observations responded to TYLCTHV-[CM] isolate at the East-West Seed Company's greenhouse, Suphanburi were rated every week for 7 weeks. Symptoms were scored using a rating scale from 0-4 according to their severity (a). The viral concentrations were measured at 7th week post inoculation viral concentration above a threshold (Dot line) were considering infected with TYLCV (b).

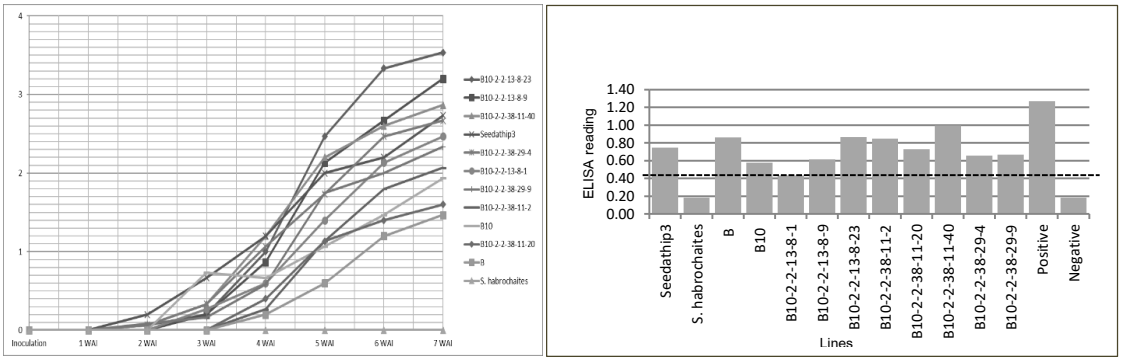

Figure 3 The symptom observations responded to TYLCTHV-[NK] isolate at research field, Syngenta Company Co.Ltd., Khon Kaen were rated every week for 7 weeks. Symptoms were scored using a rating scale from 0-4 according to their severity (a). The viral concentrations were measured at 7th week post inoculation viral concentration above a threshold (Dot line) were considering infected with TYLCV (b)

ผลการให้คะแนนการเกิดโรคต่อเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ไอโซเลทนครปฐม (TYLCTHV-[NP]) ในแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มะเขือเทศรุ่น BC_6F_2 แสดงอาการเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.70-3.30 โดยสายต้น B10-2-2-38-29-9 แสดงอาการน้อยที่สุด และสายต้น B10-2-2-13-8-23 แสดงอาการรุนแรงที่สุด และเมื่อวัดปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ในสัปดาห์ที่ 7 พบว่า สายต้น B10-2-2-38-29-4, B10-2-2-38-11-2, B10-2-2-13-8-23, B10-2-2-38-11-20 จัดอยู่ในกลุ่มที่เป็นโรค ส่วนสายต้น B10-2-2-38-11-40, B10-2-2-13-8-9, B10-2-2-38-29-9, B10-2-2-13-8-1 จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่เป็นโรค (Figure 1)

ผลการทดสอบความต้านทานเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ไอโซเลทเชียงใหม่ (TYLCTHV-[CM]) ในโรงเรือนแมลงบริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่ามะเขือเทศทดสอบสายต้นที่แสดงอาการน้อยที่สุดในรุ่น BC_6F_2 คือ B10-2-2-13-8-1 และสายต้นที่แสดงอาการรุนแรงที่สุดคือ B10-2-2-38-11-2 โดยมีค่าเฉลี่ยอาการของโรคอยู่ระหว่าง 2.30-2.80 แต่เมื่อตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA ในสัปดาห์ที่ 7 ไม่พบว่ามีสายต้นไหนที่มีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่เป็นโรค (Figure 2)

ผลการให้คะแนนการเกิดโรคต่อเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ไอโซเลทหนองคาย (TYLCTHV-[NK]) ที่แปลงทดลอง บริษัทซินเจนทา จังหวัดขอนแก่น ในสัปดาห์ที่ 7 ในมะเขือเทศรุ่น BC_6F_2 พบว่ามีคะแนนอยู่ในช่วง 1.60-3.53 โดยสายต้นที่แสดงอาการน้อยที่สุดคือ B10-2-2-38-11-20 และสายต้นที่แสดงอาการรุนแรงที่สุดคือ B10-2-2-13-8-23 และเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ในสัปดาห์ที่ 6 พบว่าทุกสายต้นมีปริมาณเชื้อในระดับที่ถือว่าเป็นโรค โดยสายต้นที่มีปริมาณเชื้อน้อยที่สุดคือ B10-2-2-13-8-1 และต้นที่มีปริมาณเชื้อมากที่สุดคือ B10-2-2-38-11-40 (Figure 3)

4. สรุป

การทดสอบความต้านทานมะเขือเทศต่อเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศสายพันธุ์ไทย 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท นครปฐม TYLCTHV-[NP] ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ไอโซเลทเชียงใหม่ TYLCTHV-[CM] ทดสอบในโรงเรือนแมลง บริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด จังหวัดสุพรรณบุรี และไอโซเลท หนองคาย (TYLCTHV-[NK] ทดสอบในแปลงทดลอง บริษัทซินเจนทา จำกัด จังหวัดขอนแก่น ได้ผลการทดสอบความต้านทานไปในทิศทางเดียวกัน แตกต่างกันที่เวลาที่ใช้ในการแสดงอาการของโรค ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละสถานที่ใช้วิธีการถ่ายทอดเชื้อที่แตกต่างกันตามความพร้อมของสถานที่

TYLCTHV-[NP] ทดสอบความต้านทานในแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน โดยการครอบด้วยแก้วเป็นเวลา 3 วันร่วมกับแมลงที่เป็นโรคจำนวน 15-20 ตัว ขณะที่ต้นกล้ามีอายุ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำต้นกล้าลงปลูกในแปลง พบว่าต้นที่อ่อนแอแสดงอาการของโรคตั้งแต่สัปดาห์แรกและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่สอง เนื่องจากมีการบังคับให้แมลงถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นมะเขือเทศจากการจำกัดพื้นที่ แต่เมื่อย้ายปลูกลงในแปลงการแสดงอาการของโรคเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงแรกอาจเนื่องมาจากมีจำนวนแมลงหวี่ขาวในแปลงปลูกไม่เพียงพอที่จะถ่ายทอดเชื้อเพิ่ม แต่ยังมีพัฒนาการของอาการรุนแรงขึ้นจนสิ้นสุดการทดลอง

TYLCTHV-[NK] ทดสอบในแปลงทดลอง บริษัทซินเจนทา จำกัด จังหวัดขอนแก่น ได้นำต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ย้ายลงแปลงปลูก โดยให้เชื้อถ่ายทอดตามธรรมชาติในแปลงปลูก เนื่องจากมีปริมาณโรคและแมลงสะสมในพื้นที่มากพอ มะเขือเทศสายพันธุ์ที่อ่อนแอแสดงอาการของโรคเด่นชัดหลังสัปดาห์ที่ 4 หลังการย้ายปลูก เมื่อตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัสในสัปดาห์ที่ 7 พบว่ามีปริมาณค่อนข้างสูงที่จัดว่าเป็นโรคในทุกสายพันธุ์ ยกเว้นในสายพันธุ์ป่า ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ นอกจากนี้ยังพบโรคอื่นๆเข้าทำลาย มีผลส่งเสริมให้อาการของโรคใบหงิกเหลืองให้รุนแรงยิ่งขึ้น เช่น โรคใบจุดแบคทีเรีย ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* (Xcv) (Figure 4)

Figure 4 The mix symptoms of tomato yellow leaf curl disease caused by TYLCV and the bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* in field trial at of Syngenta Company.

TYLCTHV-[CM] เลี้ยงร่วมกับแมลงที่เป็นโรคตั้งแต่ต้นกล้าอายุได้ 3 สัปดาห์ ในโรงเรือนแมลง บริษัทอีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง จะแสดงอาการของโรคที่เพิ่มขึ้นค่อนข้างความสม่ำเสมอ เนื่องจากในโรงเรือนมีปริมาณแมลงหวี่ขาวที่เป็นโรคเพียงพอการถ่ายทอดโรคอย่างต่อเนื่อง โดยจะเห็นอาการของโรคตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังการถ่ายทอดเชื้อ และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปวัดปริมาณเชื้อ พบว่ามีปริมาณค่อนข้างต่ำในทุกสายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไอโซเลทเชียงใหม่ไม่รุนแรง โดยสายพันธุ์อ่อนแอ (สีดาทิพย์3) มีคะแนนการเกิดโรคสูงสุดเพียง 2.8 เมื่อเทียบกับไอโซเลทนครปฐมที่มีคะแนน 3.31 และไอโซเลทหนองคายที่คะแนน 3.53 อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้เปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อ เนื่องจากไม่ได้ทดสอบโรคในเวลาเดียวกันมีสถานที่และสภาพแวดล้อมในขณะทดสอบที่แตกต่างกัน และมีวิธีการก่อโรคที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งจากรายงานของ Pongpayaklers *et. al.* (2014) ที่เปรียบเทียบเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทโดยการก่อโรคด้วยการเลี้ยงร่วมกับแมลงเป็นเวลา 30 วัน พบว่าการอาการของสายพันธุ์สีดาทิพย์ที่ได้รับเชื้อไอโซเลทเชียงใหม่มีคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรคเท่ากับ 3.8 ในขณะที่เชื้อไอโซเลทนครปฐมที่มีคะแนน 4.0 และไอโซเลทหนองคายที่คะแนน 2.0

เมื่อนำคะแนนการเกิดโรคมาจัดกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบในแต่ละสถานที่ด้วยวิธี Kruskal Wallis test and multiple comparison of treatments (Table 1) พบว่ามะเขือสายพันธุ์ป่า *S. habrochaites f. glabrarum* accession 'L06112' clone No.1 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อมีระดับความต้านทานสูง โดยจะแยกกลุ่มออกมาออกมาชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากพันธุ์ป่ามียีนต้านทานอยู่หลายตำแหน่งและมีทำงานร่วมกันของยีน ลูกผสมรุ่น F_1 แสดงระดับความต้านทานที่ลดลงเล็กน้อย แต่ยังจัดอยู่ในระดับค่อนข้างสูง ส่วนลูกผสมรุ่น BC_6F_2 ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์โดยคัดเลือกยีนเด่น (major gene) *Ty-2* บนโครโมโซม 11 เพียงยีนเดียว ยีนนี้ได้จากการทำแผนที่โครโมโซมในรุ่น BC_1F_2 มีค่า LOD เท่ากับ 10.77 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR 3 ตำแหน่ง ได้แก่ TG400, T0302 และ TG105A (Pongpayaklers, 2011) จากการศึกษาในครั้งนั้นยังพบตำแหน่งของยีนรอง (minor genes) บนโครโมโซม 2, 3 (2 ตำแหน่ง), 5 และ 10 มีค่า LOD อยู่ที่ 5.05, 4.66, 5.26, 3.69 และ 5.50 ตามลำดับ ดังนั้นถ้าทำการปรับปรุงพันธุ์โดยการรวมยีนเหล่านี้เข้าด้วยกัน น่าจะเพิ่มระดับความต้านทานของมะเขือเทศให้สูงขึ้นได้

Table 1 The symptom observations at 7 weeks post inoculation were grouped using Kruskal Wallis test and multiple comparison of treatments program for grouping the resistant levels (a) TYLCTHV-[NP] at the Tropical Vegetable Research Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom (b) TYLCTHV-[CM] at East West Seed Company, Suphanburi province (c) TYLCTHV-[NK] at Syngenta Company, Khon Kaen province.

TYLCTHV-[NP]			TYLCTHV-[CM]			TYLCTHV-[NK]		
Gen.	Lines	Score	Gen.	Lines	Score	Gen.	Lines	Score
BC_6F_2	B10-2-2-13-8-23	3.31[a]	BC_6F_2	B10-2-2-38-11-2	2.80[a]	BC_6F_2	B10-2-2-13-8-23	3.53[a]
P1	Seedathip3	3.11[ab]	BC_1F_2	B10	2.68[ab]	BC_1F_2	B10-2-2-13-8-9	3.20[ab]
BC_6F_2	B10-2-2-38-11-40	3.06[bc]	BC_6F_2	B10-2-2-13-8-23	2.66[ab]	BC_6F_2	B10-2-2-38-11-40	2.87[abc]
BC_6F_2	B10-2-2-38-29-4	3.01[bc]	BC_6F_2	B10-2-2-13-8-9	2.62[ab]	P1	Seedathip3	2.73[abc]
BC_6F_2	B10-2-2-38-11-2	2.95[bcd]	BC_6F_2	B10-2-2-38-11-20	2.54[ab]	BC_6F_2	B10-2-2-38-29-4	2.67[abc]
BC_6F_2	B10-2-2-13-8-1	2.85[cde]	BC_6F_2	B10-2-2-38-29-9	2.50[ab]	BC_6F_2	B10-2-2-13-8-1	2.47[bcd]
BC_6F_2	B10-2-2-38-11-20	2.75[de]	P1	Seedathip3	2.48[ab]	BC_6F_2	B10-2-2-38-29-9	2.33[bcd]
BC_6F_2	B10-2-2-38-29-9	2.74[de]	BC_6F_2	B10-2-2-13-8-1	2.40[ab]	BC_6F_2	B10-2-2-38-11-2	2.07[cd]
BC_6F_2	B10-2-2-13-8-9	2.70[e]	BC_6F_2	B10-2-2-38-11-40	2.39[ab]	BC_1F_2	B10	1.93[cd]
BC_1F_2	B10	2.13	BC_6F_2	B10-2-2-38-29-4	2.33[b]	BC_6F_2	B10-2-2-38-11-20	1.60d[e]
F_1	B	1.16	F_1	B	0.80[c]	F_1	B	1.47d[e]
P2	L06112 Significance	0.00 ***	P2	L06112 Significance	0.29[c] ***	P2	L06112 Significance	0.00[e] ***

Significance levels: *< 0.05; **< 0.01; ***< 0.001

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัย ด้านบริหารจัดการการวิจัย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน (TVRC)

6. References

Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M. and Levin, I., 2009, Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*, Theor. Appl. Genet. 119: 519-530.

Attathom, S., Chiemsombat, P., Kositratana, W. and Sea-Ing, N, 1994, Complete nucleotide sequence and genome analysis of bipartite *tomato yellow leaf curl virus* in Thailand, Kasetsart J. (Nat. Sci.) 28: 632-639.

Chomdej, O. and Chunwongse, J. 2006, Resistance to *tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV- [2]) from *Lycopersicon hirsutum* accession No. L06112 and their progenies with Seedaythip3, Agricultural Sci. J. 37)6(: 951-954.

Chomdej, O., Pongpayaklers, U., Juejun, N., Sinbunyama I. and Chunwongse, J., 2016, *Ty-2* resistance to Tomato yellow leaf curl virus in F_1 and BC_1F_1 crosses between wild species tomato, *Solanum habrochaites* ‘ L06112’ and a commercial cultivar, Seedathip3, Agricultural Sci. J. 42(2): 189-200.

Chomdej, O. , Whankaew, S. , Chatchawankanpanich, O., Kositratana, W. and Chunwongse, J., 2008, Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Thailand Virus, (TYLCTHV-[2]) from *Solanum habrochaites* accession ‘ L06112’ in F_1 and BC_1F_1 generations, Songklanakarin J. Sci. Technol. 30: 441-446.

Friedmann, M., Lapidot, M., Cohen, S. and Pilowsky, M., 1998, A novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 1004–1007.

\Fulton, T.M., Chunwongse, J. and Tanksley, S. D. , 1995, Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants, Plant Mol. Biol. Rept. 13(3): 207-209.

Green, S.K. and Kalloo G., 1994, Leaf curl and yellowing virus of pepper and tomato: an overview, Asian Vegetable Research and Development Center, Technical Bullentin.

Hanson, P. M., Bernacchi, D., Green, S., Tanksley, S.D., Muniyappa, V., Padmaja, S., Chen, H.M., Kuo, G., Fang, D., Chen, J. T, 2000, Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125: 15-20.

Ji, Y., Schuster, D.J. and Scott, J.W., 2007, Ty-3, a begomovirus resistance locus near the *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato, Rept. Mol. Breeding 20: 271-284.

Ji, Y., Scott, J.W., Schuster, D.J. and Maxwell, D.P., 2009, Molecular mapping of Ty-4, a new *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 134: 281-288.

Pongpayaklers, U., 2011, Molecular mapping of *Tomato Yellow Leaf Curl Thailand Virus* (TYLCTHV-[2]) resistance gene in wild tomato, *Solanum habrochaites* accession 'L06112'. Master Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 90p. (inThai)

Pongpayaklers, U., Chunwongse, J. and Chomdej O., 2014, Evaluation of 4 isolates of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) resistant lines and markers related to Ty-2 gene derived from wild tomato. The 6th AG-BIO/PERDO graduate conference on agricultural biotechnology and KU-UT joint seminar III. Nakhon Pathom (Thailand) p.9 (75 p.)

Rochester, D.E., Depaulo, J.J., Fauquet, C.M. and Beachy, R.N., 1994, Complete nucleotide sequence of the geminivirus *tomato yellow leaf curl virus*, Thailand isolate, J. Gen. Virol. 75: 477-448.

Sawangjit, S., Chatchawankanpanich, O., Chiemsombat, P., Attathom, T., Dale, J. and Attathom, S. 2005, Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Thailand, Virus Research 109:1-8.

Sutula, L. C., Gillett, M. J., Morrissey, M. S and Ramsdell, C. D., 1986, Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold, Plant Disease Vol. 70 No.8: 722-726.

Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Pleban, T., Van-Oss, H., Kedar, N., Rabinowitch. H.D. and Czosnek, H., 1994, Mapping and introgression of tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1, Theor. Appl. Genet. 88: 141-146.