

การประเมินพันธุ์มะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กต้านทานโรคไวรัส ใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV) และตรวจสอบยีนต้านทาน Ty-2 และ Ty-3 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

Evaluation of cherry tomato resistant to *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) and validated markers associated with Ty-2 and Ty-3 resistant genes

พัชรารณ สุวอ^{1*}, มณฑินี ธีธารักษ์¹, ธวัชชัย มยศิริยานันท์¹, นครินทร์ จีอาทิตย²
และ สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร²

Pacharaporn Suwor^{1*}, Monthinee Tetharak¹, Thawatchai Mayasiriyannun¹,
Nakarin Jeeartid² and Suchila Techawongstien²

บทคัดย่อ: โรคไวรัสใบหงิกเหลืองมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Begomovirus เป็นโรคไวรัสที่ระบาดรุนแรงในการผลิตมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) โดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนและร้อนชื้นรวมทั้งประเทศไทย การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการควบคุมโรคได้แบบยั่งยืน ดังนั้นงานทดลองนี้จึงมุ่งคัดเลือกพันธุ์มะเขือเทศที่ต้านทานต่อไวรัสใบหงิกเหลืองรวมทั้งประเมินผลผลิตและคุณภาพผลผลิต (brix และวิตามินซี) ทำการประเมินในมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็ก จำนวน 9 พันธุ์ร่วมกับพันธุ์ต้านทาน 2 พันธุ์ และอ่อนแอเปรียบเทียบกับ 1 พันธุ์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น ประเมินการแสดงออกลักษณะความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย และประเมินการแสดงออกของยีน Ty-2 และ Ty-3 โดยใช้ SCAR marker จำนวน 2 markers จากการศึกษาสามารถคัดเลือกมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กที่ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทยได้จำนวน 1 พันธุ์ คือ GT-1-2-7 ซึ่งมียีน Ty-3/ty-3 เหมือนกับพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบกับที่ยีน Ty-2/Ty-2 และ Ty-3/Ty-3 อีกทั้งยังพบว่า มะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กมีผลผลิตสูงจำนวน 3 พันธุ์คือ CHRY, Cindy sweet และ Maneetabtim มีผลผลิตเท่ากับ 839.10, 742.00 และ 563.30 กรัม/ต้น ตามลำดับ สำหรับพันธุ์ที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูง คือพันธุ์ Maneetabtim, Red lady และ Yellow sweet มีค่า 11, 10 และ 9.74 brix ตามลำดับ และพันธุ์มีปริมาณวิตามินซีสูงคือพันธุ์ GT-1-2-7 และพันธุ์ VF-134 มีค่า 3.10 และ 2.46 มก./100 ก. น้ำหนักสดตามลำดับ ดังนั้นพันธุ์ที่มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณภาพที่ดี ผลผลิตสูงและต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองได้มี 6 พันธุ์คือ GT-1-2-7, CHRY, Red lady, Yellow sweet, Cindy sweet และ Maneetabtim

คำสำคัญ: โรคไวรัส, การคัดเลือก, ปริมาณของแข็งที่ละลายได้, DNA marker, SCAR marker

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

² สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: patcharapornkku@gmail.com, patcharaporn.su@kmitl.ac.th

ABSTRACT: Tomato yellow leaf curl disease caused by Begomovirus of the family *Geminiviridae* is serious disease of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) production particularly in sub-tropic and tropic regions like Thailand. Host resistance is sustainable disease control. The aims of this study were selected cherry tomato varieties gene resistance to Tomato yellow leaf curl virus (Thai isolate), high fruit yield and high quality (brix and vitamin C). Nine cherry tomatoes, 1 susceptible check and 2 resistant checks were used for this study. The Randomized completed block design (RCBD) with three replications and 10 plants of each were designed. The plants were inoculated with TYLCV isolate by grafting method for phenotyping and Two SCAR markers were used for genotyping. The cherry tomato variety, GT-1-2-7, was resistant to the disease and it contained *Ty-3/ty-3* gene. Additionally, the resistant check varieties also showed *Ty-2/Ty-2* and *Ty-3/Ty-3* genes. The highest yield was found in CHRY, Cindy sweet and Maneetabtim (839.10, 742.00 and 563.30 g/plant, respectively). Maneetabtim, Red lady and Yellow Sweet gave the highest total soluble solids (11, 10 and 9.74, respectively). The highest vitamin C concentrated was found highest in GT-1-2-7 and VF-134 varieties with value (3.10 and 2.46 mg/100 g fresh weight, respectively). Therefore, six tomato varieties including GT-1-2-7, CHRY, Red lady, Yellow sweet, Cindy sweet and Maneetabtim variety should be used as high potential varieties for improving new variety with high yield, good quality and resistant to TYLCV disease.

Keywords: DNA marker, total soluble solid, selection, SCAR marker, virus disease

บทนำ

มะเขือเทศรับประทานสดผลเล็ก (Cherry tomato) เป็นมะเขือเทศที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่สำคัญหลายชนิด เช่น วิตามินซี ไลโคปีน เบตา-แคโรทีน รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ (Rein and Herbers, 2006) ปริมาณสารสำคัญในมะเขือเทศขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ ระยะเวลาสุกแก่การจัดการทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว และรูปแบบการบริโภค (Rickmand et al., 2007) ปัจจุบันการผลิตมะเขือเทศรับประทานสดมีปัญหาเรื่องสารเคมีตกค้างเนื่องจากการผลิตมะเขือเทศยังประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคและแมลง โรคที่สำคัญอันดับต้น ๆ ของการผลิตมะเขือเทศคือ โรคไวรัสใบหงิกเหลืองที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิด Begomovirus ที่ถ่ายทอดโรคโดยแมลงหมีขาว (Kenyon et al., 2014a) โรคดังกล่าวสามารถทำความเสียหายให้แก่พืชปลูกได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ในระยะต้นกล้าจนกระทั่งเก็บเกี่ยว เมื่อพืชได้รับเชื้อ Begomovirus จะแสดงลักษณะอาการใบเหลือง หรือใบเหลืองร่วมกับ

ใบด่าง ใบม้วนหยัก และลำต้นแคระแกร็น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การติดดอกลดลง และเมื่อเกิดในระยะติดผลผลจะแสดงอาการต่างทั้งผล ขนาดผลเล็กลง จึงส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตและคุณภาพผลผลิตถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Kenyon et al., 2014b) และยังสามารถถ่ายทอดไปกับเมล็ดได้ด้วย (Kil et al., 2015) การแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดและสายพันธุ์ของพืชอาศัย ชนิดของแมลงหมีขาวที่เป็นแมลงพาหะ ความแตกต่างของเชื้อไวรัสในแต่ละพื้นที่ ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่าง ชนิดของแมลงหมีขาวและชนิดของเชื้อ Begomovirus (Kenyon et al., 2014b) ปัจจุบันพบการแพร่ระบาดของแมลงหมีขาวค่อนข้างมากเนื่องจากสภาพอากาศเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจึงส่งผลให้เชื้อไวรัสดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว เกษตรกรส่วนใหญ่จะฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงหมีขาวจึงส่งผลให้แมลงอาจเกิดการดื้อยา เกิดสารพิษตกค้างในพืชโดยเฉพาะพืชบริโภคผลสดอย่างมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็ก (Wilson and Tisdell, 2001) นอกจากนี้การใช้

สารเคมียังไม่สามารถควบคุมแมลงหีวขาวได้ 100% จึงส่งผลให้โรคไวรัสใบหงิกเหลืองยังพบการแพร่ระบาดในแปลงปลูกเกือบทุกฤดูกาลโดยเฉพาะในฤดูแล้ง ดังนั้นแนวทางในการจัดการโรคอย่างยั่งยืน ลดต้นทุนการผลิตและปลอดภัยมากที่สุดคือการใช้พันธุ์มะเขือเทศต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองได้มีการนำโมเลกุลเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือกเพื่อย่นระยะเวลา และเพิ่มประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลนี้ได้มีการพัฒนาให้มีความจำเพาะต่อเชื้อ และยืนต้านทานโดยแหล่งความต้านทานส่วนใหญ่อยู่ในมะเขือเทศพันธุ์ปา และ ได้ถูกจำแนกยืนต้านทานต่อ Begomovirus จำนวน 6 ยีน คือ Ty-1, Ty-2, Ty-3, Ty-4, Ty-5 และ Ty-6 (Ji et al., 2007a,b,c; Verlaan et al., 2013; Hutton and Scott, 2015) ขึ้นอยู่กับเชื้อพันธุกรรมมะเขือเทศที่ต้านทาน โดยในมะเขือเทศพันธุ์ LA1969 (*Solanum chilense*) และ LA2779 (*S. chilense*) พบยีน Ty-1 ที่ควบคุมโดยยีนแบบ partially dominant gene อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 (Zamir et al., 1994) ซึ่งยีนดังกล่าวอยู่ระหว่างตำแหน่งของ marker TG297 (4 cM) และ TG97 (8.6 cM) (Zamir et al., 1994) อย่างไรก็ตามยีน Ty-1 รายงานว่าอยู่ตำแหน่งใกล้กับยีน Ty-3 (Verlaan et al., 2013) สำหรับยีน Ty-2 มีรายงานว่ายีนบนโครโมโซมแท่งที่ 11 (Hanson et al., 2006) และพบว่ามี SCAR-Marker P1-16 วางอยู่ใกล้ตำแหน่งยีนดังกล่าว (Yang et al., 2014) และ มีรายงานว่ายีน Ty-2 และ Ty-3 สัมพันธ์กับการเกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลืองที่ระบาดในประเทศไทยได้ (บุญส่ง และกรุง, 2557) สำหรับยีน Ty-4 ได้ถูกค้นพบบนตำแหน่งโครโมโซมที่ 3 ในมะเขือเทศพันธุ์ LA1932 (Ji et al., 2007b) และยีน ty-5 ถูกค้นพบในมะเขือเทศพันธุ์ TY 172 ที่ควบคุมด้วยยีนแบบยีนด้อยบนโครโมโซมแท่งที่ 4 (Anbinder et al., 2009) อย่างไรก็ตามยังพบว่าในมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กยังส่วนใหญ่ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง ดังนั้นก่อนที่จะเริ่มงานปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ

รับประทานสดผลเล็กให้ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง จึงมุ่งคัดเลือกมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กที่มี ผลผลิต และคุณภาพผลผลิต และกลุ่มพันธุ์พืชมที่ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองที่ระบาดในประเทศไทย โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน Ty-2 และ Ty-3 ต่อความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย

วิธีการศึกษา

มะเขือเทศ

ประเมินเชื้อพันธุกรรมมะเขือเทศจำนวน 12 พันธุ์ (Table 1) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น บริษัท ที เค อาร์ แอนด์ ดี จำกัด และศูนย์วิจัยผักของโลก (The World Vegetable Center, Taiwan) และกำหนดให้มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบกับ และพันธุ์ CLN3447A และ CLN3241H-27 เป็นพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบ ปลูกทดสอบในฤดูแล้งระหว่างเดือน ตุลาคม 2559 ถึงเดือน มีนาคม 2560 ณ แปลงทดลองคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วางแผนการทดลองในแปลงแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น และประเมินผลผลิตรวมจากการเก็บเกี่ยว 3 ครั้ง และวัดคุณภาพผลจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตครั้งที่ 2 คือน้ำหนักต่อผล จำนวนผลต่อช่อ ความกว้างผล ความยาวผล ความหนาเนื้อ ตามวิธีการของ International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ด้วยเครื่อง Digital refractometer และปริมาณวิตามินซี (Burge et al., 1975) นำข้อมูลที่ได้มาการวิเคราะห์ความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะของมะเขือเทศแต่ละพันธุ์ด้วยวิธี least significant difference (LSD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป statistix version 10

การปลูกเชื้อสาเหตุโรคไวรัสใบหงิกเหลือง

การปลูกเชื้อและการประเมินความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองในโรงเรือน ประเมินในระยะต้นกล้าอายุ 25 วันหลังจากบ่มเมล็ด ปลูกเชื้อสาเหตุโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย TYLCTHV (จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น) ด้วยเทคนิคการเสียบยอด โดยนำยอดมะเขือเทศ (scion) เป็น inoculum เสียบยอดลงในต้นมะเขือเทศพันธุ์ทดสอบ (stock) วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น ในโรงเรือนที่มุงด้วยมุ้งตาข่ายขนาด 50 mesh ทำการประเมินโรคทุก ๆ สัปดาห์หลังจากเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (7, 14, 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อ) ตามระดับการตอบสนองต่อการเกิดโรค 5 ระดับ คือ 0 = ไม่ปรากฏอาการใบหงิกหรือต่าง (Highly resistant) 0 เปอร์เซ็นต์, 1 = ปรากฏอาการใบต่างเล็กน้อย (Resistant) 1-15 เปอร์เซ็นต์, 2 = เริ่มปรากฏอาการใบต่างร่วมกับหงิกชัดเจน (Moderately resistant) 15-25 เปอร์เซ็นต์, 3 = เริ่มปรากฏอาการใบต่างร่วมกับหงิก 25-50 เปอร์เซ็นต์ของต้น (Moderately susceptible) และ 4 = เริ่มปรากฏอาการใบต่างร่วมกับหงิก 50-100 เปอร์เซ็นต์ของต้น (Susceptible) ตัดแปลงตามวิธีการของ (Rai et al., 2014) และนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยระดับคะแนนการเกิดโรค

การสกัดดีเอ็นเอและการแยกขนาดดีเอ็นเอ

นำ DNA marker ชนิด SCAR markers ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง จำนวน 2 Marker คือ P1-6 และ P6-25 ใช้การตรวจสอบยีน *Ty-2* และ *Ty-3* (Yang et al., 2014) ตามลำดับ นำใบยอดอ่อนของมะเขือเทศอายุ 20 วัน จำนวน 2-3 ใบต่อสายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค CTAB method (Doyle and Doyle, 1987) นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ปริมาตร 25 µl โดยแต่ละ

ปฏิกิริยาประกอบด้วย genomic DNA 1 µl primer ความเข้มข้น 10 µl dNTP ความเข้มข้น 50 µM Mg^{2+} เข้มข้น 2.5 µM และ Taq DNA polymerase 1 unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย dH₂O ให้ครบ 25 µl นำ PCR products จำนวน 5 µl มาแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยเทคนิค electrophoresis ด้วย 5 % agarose gel ใน 0.5X 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 นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพด้วยกล้อง รุ่น Alpha Imager 3300 system และให้บันทึกผลตามขนาดของดีเอ็นเอที่ปรากฏ

ผลการศึกษา

ผลผลิต องค์ประกอบผลผลิต และปริมาณสารสำคัญ

ผลการประเมินมะเขือเทศจำนวน 12 พันธุ์ แบ่งมะเขือเทศตามลักษณะผลได้ 3 กลุ่มคือมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กจำนวน 8 พันธุ์และมะเขือเทศผลใหญ่จำนวน 2 พันธุ์ คือพันธุ์ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองเปรียบเทียบ และมะเขือเทศสีดาจำนวน 1 สายพันธุ์ คือพันธุ์สีดาทิพย์4 ในกลุ่มมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กพบว่าทุกสายพันธุ์ให้ทุกลักษณะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ลักษณะผลผลิตพบว่าพันธุ์ CHRY, Cindy sweet และ Maneetubtim ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 839.10, 742.00 และ 563.30 กรัม/ต้น ตามลำดับ และมีน้ำหนักต่อผล 8.7 21.80 และ 3.5 กรัม/ผล ตามลำดับ ลักษณะจำนวนผลต่อช่อพบว่าพันธุ์ Yellow sweet จำนวนผลต่อช่อสูงสุดคือ 21.75 ผล และรองลงมาคือ CHRY Red lady และ Black cherry มีจำนวนผล/ช่อคือ 16.59 12.96 และ 12.25 ผล ตามลำดับ ขนาดผล

มะเขือเทศแบ่งตามความกว้างและความยาวของผล พบว่า แบ่งมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มผลกลมจำนวน 4 พันธุ์ คือ Cindy sweet, Black cherry, Red lady และ Lyco red และกลุ่มผลรีมีจำนวนทั้งหมด 4 สายพันธุ์คือ GT1-2-7 CHRY Yellow sweet และ Maneetubtim สำหรับลักษณะคุณภาพความหนาเนื้อพบว่า พันธุ์ VF134, CHRY,

T1-2-7 และ Cindy sweet มีความหนาเนื้อสูงที่สุดคือ 0.61, 0.37, 0.33 และ 0.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ และนอกจากนั้นพบว่าพันธุ์ที่มีความหวานสูงที่สุดคือ Maneetubtim, Yellow sweet และ Red lady มีเปอร์เซ็นต์ความหวาน 11.00, 10.00 และ 9.74 องศาบริกซ์ (Table 1) ตามลำดับ

Table 1 Evaluation of yield, fruit traits of 12 tomato varieties in dry season trials at King Mongkut Institute of Technology, Thailand

Pedigree name	Yield (g/plant)	Fruit weight (g)	Fruit number/ cluster	Fruit width (cm)	Fruit length (cm)	Fruit thickness (cm)	Brix (°C)	Vitamin C (mg/100g fresh weight)
GT1-2-7 ^{1/}	396.8 ^{c-e}	12.4 ^d	8.04 ^{de}	2.50 ^{de}	4.26 ^b	0.33 ^{de}	5.99 ^{cd}	3.10 ^a
Cindy sweet ^{1/}	742.0 ^b	21.8 ^c	7.00 ^e	3.28 ^c	3.21 ^c	0.33 ^{de}	5.87 ^{cd}	1.66 ^c
Black cherry ^{1/}	342.1 ^{d-f}	12.7 ^d	12.25 ^c	2.84 ^d	2.77 ^d	0.22 ^{ef}	7.22 ^b	1.13 ^{c-f}
Red lady ^{1/}	336.1 ^{d-f}	2.5 ^e	12.96 ^{bc}	1.80 ^f	1.79 ^f	0.18 ^f	9.74 ^a	0.91 ^{d-f}
Lyco red ^{1/}	495.1 ^{cd}	6.5 ^{de}	11.42 ^{cd}	2.45 ^e	2.28 ^e	0.19 ^f	7.44 ^b	0.54 ^f
CHRY ^{1/}	839.1 ^b	8.7 ^{de}	16.59 ^b	2.46 ^e	3.56 ^c	0.37 ^{cd}	6.70 ^{bc}	0.75 ^{ef}
CLN3447A ^{2/}	1,025.2 ^a	42.9 ^b	7.17 ^e	4.69 ^a	4.64 ^b	0.49 ^b	5.10 ^d	1.54 ^c
CLN3241H-27 ^{2/}	1,164.7 ^a	53.2 ^a	5.44 ^e	4.84 ^a	4.35 ^b	0.47 ^{bc}	4.05 ^e	1.36 ^{cd}
Yellow sweet ^{1/}	173.1 ^f	7.3 ^{de}	21.75 ^a	1.72 ^f	3.26 ^c	0.24 ^{ef}	10.00 ^a	1.55 ^c
Maneetabtim ^{1/}	563.3 ^c	3.5 ^e	11.67 ^{cd}	1.64 ^f	2.47 ^{de}	0.13 ^f	11.00 ^a	1.26 ^{c-e}
VF-134 ^{1/}	288.9 ^{ef}	51.2 ^a	6.02 ^e	4.21 ^b	5.43 ^a	0.61 ^a	5.55 ^d	2.45 ^b
Seedatip4 ^{3/}	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Mean	578.75	20.25	10.94	2.94	3.45	0.32	7.05	1.47
F-test	**	*	**	**	**	**	**	**
(CV) %	17.52	23.07	19.81	7.22	7.37	9.54	8.20	23.02

Mean in each column followed by different letter indicate significant difference using least significant difference (LSD) at 1% probability level (**) and 5 % probability level (*)

^{1/} Cherry type, ^{2/} Table type (Resistant check) and ^{3/} Seeda type (Susceptible check)

ความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV)

ผลการตอบสนองต่อการเกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทยในมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กจำนวน 9 สายพันธุ์ ร่วมกับพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบ 1 พันธุ์ และพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบ 2 พันธุ์ ด้วยเทคนิคการเสียบยอดสามารถจัดกลุ่มตามระดับคะแนนการเกิดโรคได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ต้านทานมาก (HR) คือพันธุ์ CLN3241H-27 เป็นพันธุ์

ต้านทานเปรียบเทียบกับจาก The World Vegetable center (AVRDC) แสดงคะแนนการเกิดโรคในสัปดาห์ที่ 1 ถึง 4 คือ 0.10-0.65 กลุ่มที่ 2 คือต้านทาน (R) พบในมะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กพันธุ์ใหม่ คือพันธุ์ GT1-2-7 แสดงคะแนนการเกิดโรคในสัปดาห์ที่ 1-4 คือ 0.36-1.23 เนื่องจากมะเขือเทศดังกล่าวผ่านการรวมยีนจากมะเขือเทศหลายสายพันธุ์และถูกคัดเลือกตามระดับความต้านทานในแปลงปลูก และกลุ่มที่ 3 คืออ่อนแอมาก (HS) จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ

Cindy sweet, Red lady, Lycored, CHRY, Black cherry, Yellow sweet, Maneetabtim และ VF-134 พบว่าตอบสนองต่อการเกิดโรคในระดับที่รุนแรงตั้งแต่

สัปดาห์ที่ 1 โดยมีคะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 2.50 ถึง 4.00 เช่นเดียวกันกับพันธุ์อ่อนแอเปรียบเทียบกับ (สีดาทิพย์) (Table 2) (บุญส่ง และกรุง, 2557)

Table 2 Disease responses of 12 tomato varieties by using artificial screening method with 4 weeks after inoculation

Pedigree name	Source ^{a/}	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	Disease response
GT1-2-7 ^{1/}	KKU	0.36 ^e	1.03 ^f	1.21 ^e	1.23 ^c	R
Cindy sweet ^{1/}	KKU	2.76 ^{bc}	2.86 ^d	3.23 ^{cd}	3.36 ^b	HS
Red lady ^{1/}	KKU	2.50 ^b	3.03 ^{cd}	3.30 ^{b-d}	4.0 ^a	HS
Lycored ^{1/}	KKU	3.00 ^{ab}	3.40 ^b	3.80 ^a	3.96 ^a	HS
CHRY ^{1/}	KKU	2.76 ^{bc}	4.00 ^a	4.00 ^a	4.00 ^a	HS
Black cherry ^{1/}	KKU	1.11 ^d	2.47 ^e	3.41 ^{bc}	3.83 ^a	HS
Yellow sweet ^{1/}	KKU	nt	nt	nt	nt	nt
Maneetabtim ^{1/}	KKU	3.01 ^{ab}	3.25 ^{bc}	3.52 ^b	3.83 ^a	HS
VF-134 ^{1/}	KKU	3.18 ^a	3.28 ^{bc}	3.52 ^b	3.76 ^a	HS
CLN3447A ^{2/}	KKU	nt	nt	nt	nt	nt
CLN3241H-27 ^{2/}	AVRDC	0.10 ^e	0.16 ^g	0.62 ^f	0.65 ^d	HR
Seedatip 4 ^{3/}	KU	3.30 ^a	3.30 ^{bc}	3.40 ^d	3.83 ^a	HS
Mean		2.21	2.68	2.97	3.24	
F-test		**	**	**	**	
C.V.%		6.62	6.27	5.00	4.49	

Mean in each column followed by different letter indicate significant difference using least significant difference (LSD) at 1% probability level (**)

^{a/} KKU = Khon Kaen University, KU = Kasetsart University, AVRDC = The World Vegetable Center

nt; not detect

^{1/} Cherry type, ^{2/} Table type (Resistant check) and ^{3/} Seeda type (Susceptible check)

การแสดงผลของยีนต้านทานและความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (TYLCTHV)

จากการประเมินยีนต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองจำนวน 4 ยีนคือ *Ty2*, *Ty3*, *Ty3a* และ *Ty3b* โดยใช้ Marker จำเพาะต่อตำแหน่งยีน 2 Markers คือ SCAR-P1-16 และ SCAR-P6-25 Marker ตามลำดับพบว่า SCAR-P1-16 สามารถแยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอได้ 2 ขนาดคือ 300 bp (*Ty-2*) และ 600 bp (*ty-2*) (Table 2) มะเขือเทศพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบกับ CLN3447A และ CLN3241H-27 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งเป็นตำแหน่งสัมพันธ์กับความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย

(Table 3) และเป็นตำแหน่งที่อ้างอิงว่าต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลือง (Yang et al., 2014) และยีนที่ต้านทานต่อโรคดังกล่าวนี้แสดงออกแบบข่ม (Dominant gene) ส่วนในมะเขือเทศสายพันธุ์อื่น ๆ ที่เหลือ พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขนาด 600 bp แต่อย่างไรก็ตามในมะเขือเทศพันธุ์ GT-1-2-7 นั้นไม่พบยีนต้านทานยังสามารถต้านทานโรคไวรัสดังกล่าวได้ สำหรับ SCAR-P6-25 Marker สามารถแยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอได้ 4 ขนาด คือ 320 bp (ยีน *ty-3*), 450 bp (ยีน *Ty-3*), 630 bp (ยีน *Ty-3a*) และ 660 bp (ยีน *Ty-3b*) ผลจากการจำแนกพบว่ามะเขือเทศจากขนาดอ้างอิงคือขนาดดีเอ็นเอ 450 bp (ยีน *Ty-3*), 630 bp (ยีน *Ty-3a*) และ 660 bp

(ยีน *Ty-3b*) (Ji et al., 2007b) ซึ่งในตำแหน่งของยีน *Ty-3* พบในมะเขือเทศ 2 สายพันธุ์ คือ CLN3241H-27 และ GT-1-2-7 แต่อย่างไรก็ตามในพันธุ์ GT-1-2-7 พบขนาด 320 bp/450 bp (ยีน *ty-3/Ty-3*) (Figure 1) แต่ยังสามารถแสดงระดับความต้านทานต่อโรคไวรัสได้เนื่องจากยีนต้านทาน *Ty-3* นั้นมีรายงานว่าถูกควบคุมด้วยยีนเด่นจำนวน 1 คู่ นอกจากนั้นยังพบว่าในมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานเปรียบเทียบกับ CLN3447A นั้น

พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 630 bp (ยีน *Ty-3a*) และ 660 bp (ยีน *Ty-3b*) ส่วนในมะเขือเทศพันธุ์ทดสอบอื่น ๆ นั้นพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 320 bp (ยีน *ty-3*) กล่าวคือไม่พบยีนต้านทานโรคไวรัสใบหงิกเหลือง ดังนั้นจะเห็นว่าในมะเขือเทศที่มียีน *Ty-3* นั้นสามารถต้านทานต่อการเกิดโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทย (Table 3)

Table 3 Reproducibility of markers and their validation with phenotypic data of TYLCV resistance of nine cultivars and one of susceptible and two resistant checks

Pedigree name	Genotype				Phenotype Disease response	Validation			
	SCAR_P6-25			SCAR_P1-16		SCAR_P6-25			SCAR_P1-16
	<i>Ty-3</i>	<i>Ty-3a</i>	<i>Ty-3b</i>	<i>Ty-2</i>		<i>Ty-3</i>	<i>Ty-3a</i>	<i>Ty-3b</i>	<i>Ty-2</i>
GT1-2-7	+	-	-	-	R	+	-	-	-
KM3-3	-	-	-	-	HS	+	+	+	+
Black cherry	-	-	-	-	HS	+	+	+	+
Red lady	-	-	-	-	HS	+	+	+	+
Lycor red	-	-	-	-	S	+	+	+	+
CHRY	-	-	-	-	HS	+	+	+	+
CLN3447A	-	+	+	+	nt	*	*	*	*
Maneetabtim	-	-	-	-	S	+	+	+	+
Yellow sweet	-	-	-	-	S	*	*	*	*
VF134	-	-	-	-	HS	+	+	+	+
CLN3241H-27	+	-	-	+	HR	+	-	-	+
SeedaThip 4	-	-	-	-	S	+	+	+	+

Abbreviation of marker (validated + and not validated -), and * no data)

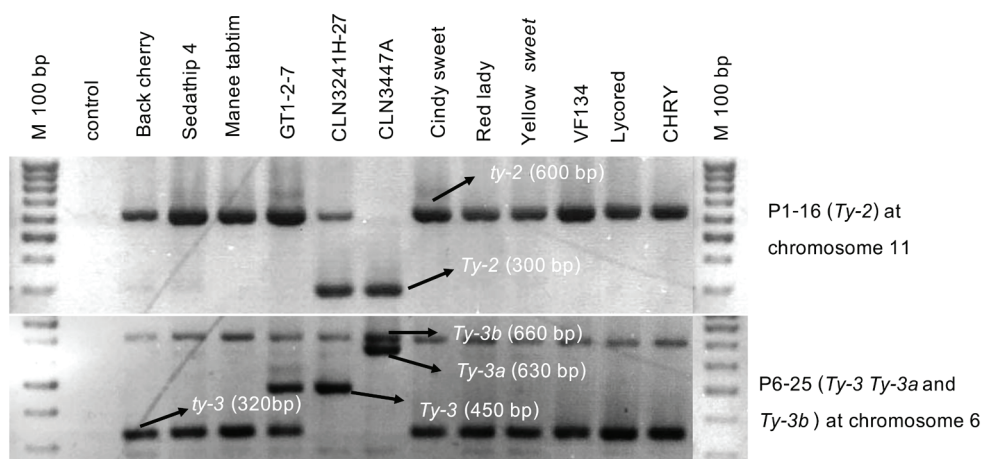


Figure 1 PCR fragments with primers P6-25-F2/P6-25-R5. Lane 1, 100-bp DNA ladder; Lane 2, control (Water); Lane 4, Susceptible check; Lane 7-8, Resistant checks; Other lands are new breeding lines

สรุป

จากการประเมินความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองสายพันธุ์ไทยสามารถแยกกลุ่มมะเขือเทศตามความต้านทานได้ 3 กลุ่มคือ ต้านทานมาก ต้านทาน และอ่อนแอ พบมะเขือเทศรับประทานสด ผลเล็กพันธุ์ GT1-2-7 ที่สามารถแสดงระดับความต้านทานและมีปริมาณวิตามินซีสูง และได้มะเขือเทศรับประทานสดผลเล็กให้ผลผลิตสูงและมีความหวานสูงคือ พันธุ์ Maneetabtim และ Red lady เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และนอกจากนี้ยังพบว่า SCAR marker_P6-25 และ SCAR marker_P1-16 สามารถใช้คัดเลือกยีน Ty-3 และ ยีน Ty-2 และสัมพันธ์กับการเกิดโรคไวรัสสายพันธุ์ไทยซึ่งจะช่วยให้ประหยัดระยะเวลา และเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อไวรัสสายพันธุ์ไทยได้อีกด้วย

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทที่เคอาร์แอนดีดี, ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศูนย์วิจัยและพัฒนาผักเขตร้อน และ The World Vegetable center (Taiwan) ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อพันธุกรรมเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในการศึกษานี้ และกองทุนสนับสนุนทุนวิจัยโครงการวิจัยพี่เลี้ยง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- บุญส่ง เอกพงษ์ และ กรุง สีตะธนี. 2557. การประเมินพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในสภาพแปลงปลูกในจังหวัดอุบลราชธานี. แก่นเกษตร. 42 (ฉบับพิเศษ 3): 718-724.
- Anbinder, I., M. Reuveni, R. Azari, I. Paran, S. Nahon, H. Shlomo, L. Chen, M. Lapidot, and I. Levin. 2009. Molecular dissection of tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. Theor. Appl. Genet. 119: 519-530.
- Burge, J., O. Mickelsen, C. Nicklow, and G. L. Marsh. 1975. Vitamin C in tomatoes: Comparison of tomatoes developed for mechanical or hand harvesting. Ecology of food and nutrition. 4: 27-31.
- 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.
- 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. 2015. Ty-6 a major begomovirus resistance gene located on chromosome 10. *Rep. Tomato Genetic Crop.* 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. *Mol. Breed.* 20: 271-284.
- Ji, Y., J.W. Scott, P. Hanson, E. Graham, and D. P. Maxwell. 2007c. Source of resistance inheritance and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato infecting begomoviruses. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease.* 343-362.
- Ji, Y., M. 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 Ty-3 and Ty-3a loci from *Solanum chilense* at 25 cM of chromosome 6 of tomato. *Rep. Tomato Genetic crop.* 57:25-28.
- Kenyon, F.L., S. Kumar, W. S. Tsia, and J. A. Hughes. 2014a. Virus Disease of peppers (*Capsicum* spp.) and Their Control. *Advances in virus research.* 90:297-354.
- Kenyon, L., W. S. Tsai, S. L. Shih, and L. M. Lee. 2014b. 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. DOI: 10.1038/srep19013.
- Rai, V. P., R. Kumar, S. Kumar, and M. Singh. 2014. Monogenic recessive resistance to Pepper leaf curl virus in an interspecific cross of *Capsicum*. *Sci Hort.* 172:34-38.
- Rein, D. and K. Herbers. 2006. Enhances nutritional value of food crops. In Halford, N. (Ed.). *Plant Biotech.* 91-117.
- Rickmand, J. C., D. M. Barrett, and C. M. Bruhn. 2007. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 87: 930-944.
- Verlaan, M. G., S. F. Hutton, R. M. Ibrahem, R. Kormelink, R. G. F. Visser, J. W. Scott, J. D. Edwards, and Y. Bai. 2013. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DEDGD-Class RNA-dependent RNA polymerases. *PloS. Genetic.* 241-253.
- Wilson, C. and C. Tisdell. 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics.* 39:449-462.

- 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. *Mol. Breed.* 34: 749-760
- 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. *Theor. Appl. Genet.* 88:141-146.