การสร้างพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานโรคโดยการถ่ายยีน
Production of Disease Resistant Tomato by Gene Transfer Technique

สุพัฒน์ อรรถธรรม[1] พิสสวรรณ เจียมสมบัติ[2] ทิพย์วดี อรรถธรรม[3]
วิชัย โฆสิตรัตน[2] ธีระ สูตะบุตร[2] เพชรรัตน์ ศิริวงศ์[1] และ นุชนาถ แซ่อึ้ง[1]
Supat Attathom, Pissawan Chiemsombat, Wichai Kositratana, Tipvadee Attathom, Thira Sutabutra, Petcharat Siriwong, and Nuchanad Sae-Ing

ABSTRACT

Research was conducted to produce tomato plant resistant to tomato yellow leaf curl disease caused by tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) by gene transfer technique. Gene conferring disease resistance was obtained from TYLCV coat protein gene with the size of 780 bases. Transformation of tomato cotyledon was done by Agrobacterium mediated gene transfer of constructed plasmid with TYLCV coat protein gene ligated at Bam HI and StuI cloning sites. Transgenic tamato plants derived from Agrobacterium mediated gene transformation expressed the marker gene activity resulting the mormal growth on culture medium with high concentration of antibiotics. DNA sequence of TYLCV coat protein gene was also detected in transgenic plants by using DNA probe. This is the first report in Thailand that gene conferring disease resistance can be successfully transferred into tomato plants.

บทคัดย่อ

งานวิจัยได้กำหนดขึ้นเพื่อสร้างพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) โดยวิธีการถ่ายยีน ยีนที่ใช้ในการสร้างความต้านทานให้กับมะเขือเทศเป็นยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ซึ่งมีขนาด 780 เบส การถ่ายยีนกระทำโดยใช้ระบบอโกรแบคทีเรียในการชักนำยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสตัดต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะที่ตำแหน่ง BamHI และ StuI เข้าสู่ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ มะเขือเทศจำลองพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีนตรวจสอบ ทำให้เจริญได้บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะความเข้มข้นสูง และตรวจพบชิ้นส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสโดยใช้ ดี เอ็น เอ ตัวตรวจแสดงให้เห็นว่าสามารถถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคให้กับมะเขือเทศได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

[1] หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมด้านพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
Plant Genetic Engineering Unit, Kasetsart Univ. Kamphaengsaen

[2] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Plant Pathology, Kasetsart Univ.

[3] ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Entomology, Kasetsart Univ.

คำนำ

โรคไวรัสใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) นับว่าเป็นโรคที่สำคัญและเป็นปัญหาต่อการปลูกมะเขือเทศในประเทศ นับตั้งแต่การรายงานการระบาดของโรคเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2516 (Chandrasrikul, 1973) ได้มีความพยายามโดยนักวิชาการหลายฝ่าย ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อโรคนี้ แต่ไม่ประสพผลสำเร็จ เนื่องจากพันธุ์มะเขือเทศส่วนใหญ่ที่ปลูกในประเทศอ่อนแอต่อโรค จึงไม่สามารถจัดหาต้นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ สาเหตุอีกประการหนึ่งคือ เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุจัดเป็นไวรัสในกรุ๊ป geminivirus ถ่ายทอดได้ด้วยแมลงหวี่ขาว (*Bemisis tabaci* Genn.) ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล (Thongit et al., 1986) ทำให้การทดลองเกี่ยวกับการทดสอบไวรัสเพื่อหาพันธุ์ต้านทานเป็นไปได้ยาก ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาการค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อไวรัสนี้ในระดับโมเลกุล จนสามารถโคลนชิ้นส่วนของยีนไวรัสนี้ได้สำเร็จ (Attathom et al., 1990 และ Chiemsombat et al., 1990) จึงเกิดลู่ทางในการสร้างพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อโรคโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

วิธีการสร้างพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคไวรัสโดยอาศัยขบวนการพันธุวิศวกรรมมีความเป็นไปได้สูงในปัจจุบันเพราะความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีเป็นไปอย่างรวดเร็ว ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการต้านทานโรค เช่น pathogenesis-related proteins หรือโปรตีนชนิดอื่น ๆ ได้ถูกนำมาใช้ (Antoniw et al., 1980) ในการสร้างพันธุ์พืชต้านทานไวรัส Abel และคณะ (1986) พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนของไวรัสสามารถนำมาถ่ายให้กับพืชเพื่อสร้างพืชจำลองพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นับว่าเป็นมิติใหม่ของการพัฒนาพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคไวรัสชนิดต่าง ๆ (Harrison et al., 1987 และ Turner et al., 1987) ผลงานวิจัยที่เสนอนี้ จึงเป็นการนำเอาแนวความคิดดังกล่าวมาพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการสร้างพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง : เพาะเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ VF134-1-2 บนอาหารสูตร DKMS ซึ่งเป็นอาหาร MS ที่มีวิตามินบี 5 0.01 มก/ล kinetin และ 0.2 มก/ล 2, 4-D หลังจากเมล็ดงอก 2 วัน เก็บใบเลี้ยงโดยตัดส่วนโคนและปลายใบออกเล็กน้อยสำหรับการถ่ายยีน

การเตรียมยีน : ยีนที่ใช้เพื่อการทดลองได้มาจากยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค TYLCV โดยการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์จากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคตามวิธีของ Attathom และคณะ (1990) ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก ssDNA แล้วโคลน DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยการตัดใส่ Bluescript พลาสมิด ที่ตำแหน่ง EcoRI (Chiemsombat et al., 1990) นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxy chain termination (Sanger et al., 1977) ตัดเฉพาะยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสขนาด 780 คู่เบส จาก component A ของ cDNA เพื่อถ่ายให้กับพืช

การถ่ายยีน : ทำการเชื่อมต่อยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเข้ากับ expression vector ที่มี NPT-II gene บริเวณ BamHI และ NcoI cloning sites พลาสมิด pIM6 (ภาพที่ 1) นำมาใช้ในการ transform *Agrobacterium tumefaciens* แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มี 100 มก/ล steptomy-

cin, 50 มก/ล kanamycin และ 25 มก/ล chloramphenical อุณหภูมิ 28°ซ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มี 50 มก/ล kanamycin เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แยกเก็บตะกอนแบคทีเรียมาละลายด้วยอาหารเหลว MS ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1-5 × 10^8 โคโลนี/มล นำชิ้นส่วนพืชที่ต้องการถ่ายยีนมาจุ่มในสารละลายแบคทีเรียนาน 5-15 นาที ซับด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ย้ายเนื้อเยื่อไปวางบนแผ่นกระดาษกรองที่วางทับเซลล์แขวนลอยมะเขือเทศที่กระจายไว้บนผิวหน้าอาหารแข็ง DKMS เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน จึงย้ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ZCK ซึ่งเป็นอาหารที่มีวิตามิน B5, 1 มก/ล zeatin, 500 มก/ล carbenicillin และ 50-100 มก/ล kanamycin ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน ที่อุณหภูมิ 25°ซ เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนที่เจริญบนอาหารคัดเลือกจัดเป็นพืชจำลองพันธุ์ ย้ายลงบนอาหารชักนำรากที่มี 50 มก/ล kanamycin ผสมอยู่ เมื่อรากเจริญดีจึงย้ายลงดินปลูกในสภาพเรือนทดลอง

การตรวจสอบพืชจำลองพันธุ์ : ทำได้โดย 2 วิธี คือ kanamycin resistant assay : ตัดเนื้อเยื่อส่วนใบและก้านใบจากมะเขือเทศจำลองพันธุ์ที่ผ่านการชักนำให้ออกรากบนอาหารที่มี 100 มก/ล kanamycin เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อจากต้นปกติที่ไม่ใช่พืชจำลองพันธุ์ บันทึกผลการทดลองภายใน 2-4 สัปดาห์

DNA Probe : นำส่วนยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค TYLCV มาติดฉลากด้วย Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim) ด้วยวิธี oligolabelling เพิ่มปริมาณ DNA probe ที่ติดฉลากนี้ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction-PCR) บดใบมะเขือเทศที่ต้องการตรวจสอบตัวอย่างละ 50 มิลลิกรัม ใน 50 ไมโครลิต บัฟเฟอร์ที่มี 0.125 × SSC และ 0.125 NaOH หยดน้ำคั้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่อิ่มตัวด้วย 20 × SSC เป็นจุด ๆ ละ 1 ไมโครลิตร อบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ 80°ซ ในสภาพสูญญากาศนาน 2 ชั่วโมง นำมาทำไฮบริดไดเซชั่นกับ DNA probe ตามวิธีของ Perbal (1988) ตรวจดูการเกิดสีม่วงสำหรับตัวอย่างที่มียีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

ผลการทดลอง

การถ่ายยีนให้กับมะเขือเทศ : มะเขือเทศพันธุ์ VF134-1-2 สามารถรับการถ่ายยีนโดยอาศัยระบบ Agrobacterium mediated gene transfer ได้ดี เนื้อเยื่อที่จุ่มสารละลายของเชื้อจะเกิดจุดแผลสีน้ำตาลขึ้นประปราย เนื้อเยื่อที่คงสีเขียวจะพัฒนาเป็นยอดและต้นอ่อน ในขณะที่เนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะเกิดแผลสีน้ำตาลจนถึงสีดำและตายไปในที่สุด (ภาพที่ 2a) เนื้อเยื่อจากใบเลี้ยงเมื่อได้รับการถ่ายยีนแล้ว สามารถพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ได้ภายใน 2-3 สัปดาห์ โดยจะให้ปริมาณต้นอ่อน 1-10 ต้น/เนื้อเยื่อ ต้นอ่อนที่พัฒนาแล้วจากการชักนำให้เกิดรากในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 50 มก/ล kanamycin สามารถย้ายลงต้นปลูกได้ภายใน 2-3 สัปดาห์ (ภาพที่ 2b)

การตรวจสอบพืชจำลองพันธุ์ :

Kanamycin resistant assay; การตรวจสอบการถ่ายยีนโดยอาศัยยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อ kanamycin กระทำอย่างต่อเนื่องในทุกขั้นตอนของการถ่ายยีน ในระยะแรกของการถ่ายยีนนั้น

หากเนื้อเยื่อไม่มีความต้านทานต่อ kanamycin จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย เมื่อคัดเลือกบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 100 มก/ล kanamycin หลังจากชักนำให้มีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้ว หากเป็นต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนอย่างแท้จริง ส่วนของรากจะไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 50 มก/ล kanamycin ซึ่งนับว่าเป็นการคัดเลือกความต้านทานต่อ kanamycin ครั้งสุดท้ายก่อนนำพืชจำลองพันธุ์ไปปลูก พืชที่ผ่านการคัดเลือก แสดงว่าได้รับการถ่ายยีนตรวจสอบทำให้มีลักษณะต้านทานต่อ kanamycin เป็นการถาวร

DNA probe; ความสำเร็จที่มีความสำคัญมากในการวิจัยเรื่องนี้ คือความสามารถในการสร้างและเพิ่มปริมาณยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค TYLCV (ภาพที่ 3a, Lane 2) และการสร้าง DNA probe ต่อยีนชนิด non-radioisotope probe โดยใช้ Digoxigenin 11-dUTP และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (ภาพที่ 3a, Lane 3) DNA probe ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮบริดไดเซชั่น (Hybridization) จะมองเห็นจุดสีม่วง มีแนวขอบเห็นได้ชัดเจน แสดงว่าในตัวอย่างนั้นมียีนที่ต้องการตรวจสอบ (ภาพที่ 3b, แถว 5 ตำแหน่งที่ 6 จากซ้าย) ผลจากการใช้วิธีนี้ตรวจสอบตัวอย่างที่ได้จากต้นพืชจำลองพันธุ์ พบว่าเกิดไฮบริดไดเซชั่นกับ DNA probe (ภาพที่ 3b) แสดงว่าต้นพืชจำลองพันธุ์ที่ผลิตได้ มียีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส TYLCV ในขณะที่พืชปกติจะไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าว

สรุปและวิจารณ์

การทดลองนี้ชี้ให้เห็นแน่ชัดว่า ประเทศไทยมีความสามารถในการพัฒนาเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรมที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนที่ต้องการให้กับพืชที่เป็นเป้าหมายได้เป็นผลสำเร็จ คือ การถ่ายยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ให้กับมะเขือเทศพันธุ์ VF-134-1-2 ทำให้ได้ต้นมะเขือเทศจำลองพันธุ์ที่คาดหมายว่า จะมีความต้านทานต่อโรคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ข้อควรแก่การพิจารณาเพื่อให้การวิจัยบรรลุสู่เป้าหมายสูงสุด คือ ประการแรกความยากง่ายในการถ่ายยีนให้กับมะเขือเทศพันธุ์ต่าง ๆ แม้จะไม่มีตัวเลขยืนยันอย่างแน่ชัด แต่คณะผู้วิจัยเชื่อว่าการถ่ายยีนจะมีความยากง่ายแตกต่างกันในพันธุ์ของมะเขือเทศ ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาเทคโนโลยีต่อไปอย่างต่อเนื่อง ประการที่สองคือยีนที่ใช้ในการสร้างความต้านทานให้กับมะเขือเทศ การวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นเฉพาะยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส แต่อาจมียีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างภูมิต้านทานให้กับพืชต่อโรคไวรัสชนิดนี้ ควรต้องมีการศึกษาวิจัยให้มากยิ่งขึ้น ประการที่สามคือการทดสอบพืชจำลองพันธุ์ที่ผลิตได้ แม้ว่าขณะนี้ประเทศไทยไม่ได้มีข้อกำหนดของการทดสอบภาคสนามของพืชจำลองพันธุ์ แต่การทำวิจัยควรจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยและผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมเป็นหลัก

เอกสารอ้างอิง

Abel, P. P., R.S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley and R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plant that express the tabacco mosaic virus coat protein gene. Science 232 : 738-734.

Antoniw, J. E., C. E. Ritter, W. S. Pierpoint, and L. C. van Loon 1980. Comparison of three pathogenesis related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol. 47 : 79-87.

Attathom S., P. Chiemsombat, T. Sutabutra and R. Pongpanitanond. 1990. Characterization of nucleic acid of tomator yellow leaf curl virus. Kasetsart J. 24 (5) : 1-5.

Chandrasrikul, A. 1973. How Farmers can Improve Tomato Production. Kasikorn 46 (3) : 279-286. (In Thai)

Chiemsombat, P., W. Kositratana, S. Attathom, T. Sutabutra and N. Sae-aung. 1990. DNA probe and nucleic acid hybridization for plant virus detection. Kasetsart J. 24 (5) : 12-16.

Harrison, B. D., M. A. Mayo and D. C. Baulcombe. 1987. Virus resistant in transgenic plants that express cucumber masaic virus sattellite RNA. Nature 328 : 799-802.

Perbal, B. 1988. A practical guide to molecular cloning 2nd ed. A Wiley-interscience Publication, John Wiley & Sons. New York. pp. 436-542.

Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulsen. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 : 5463-7.

Thongrit, D., S. Attathom and T. Sutabutra. 1986. Tomato yellow leaf curl disease in Thailand. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Regions. Bulletion No. 33 : 61-63.

Turner, N. E., K. M. O' Connell, R. S Nelson, P. R. Sanders, R. N. Beachy, R. T. Fraley and D. M. Shah. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. EMBO J. 6 : 1181-1188.

Fig. 1 pIM6, the 8.7 Kb expression vector containing tomato yellow leaf curl virus protein (TYLCV-CP) gene

Fig. 2 transformation of VF134-1-2 tomato plant with TYLCV-CP gene

a) cotyledon transformation showing putative transformants and non-transformed tissues
b) transgenic tomato plant with TYLCV-CP gene in potting medium

Fig. 3 DNA probe for the dectection of TYLCV-CP gene

a) TYLCV-CP probe (lane-1 Lambda DNA digested with Hind III, lane2-TYLCV-CP 780 bp and Lane3-Digoxigenin labelled TYLCV-CP probe amplified by PCR)
b) Dot-blot Hybridization of saps from transgenic plants with Digoxigenin labelled TYLCV-CP probe. Dark purple spot (Ros5, position 6 from left) is the positive control.

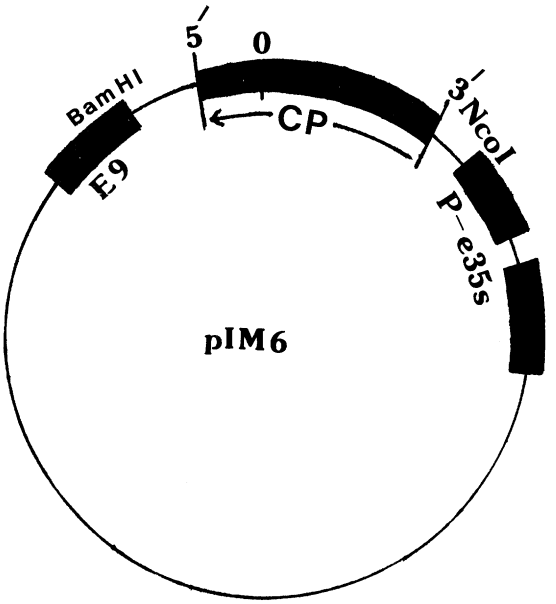

Fig. 1. pIM6, the 8.7 Kb expression vector containing tomato yellow leaf curl virus coat protein (TYLCV-CP) gene

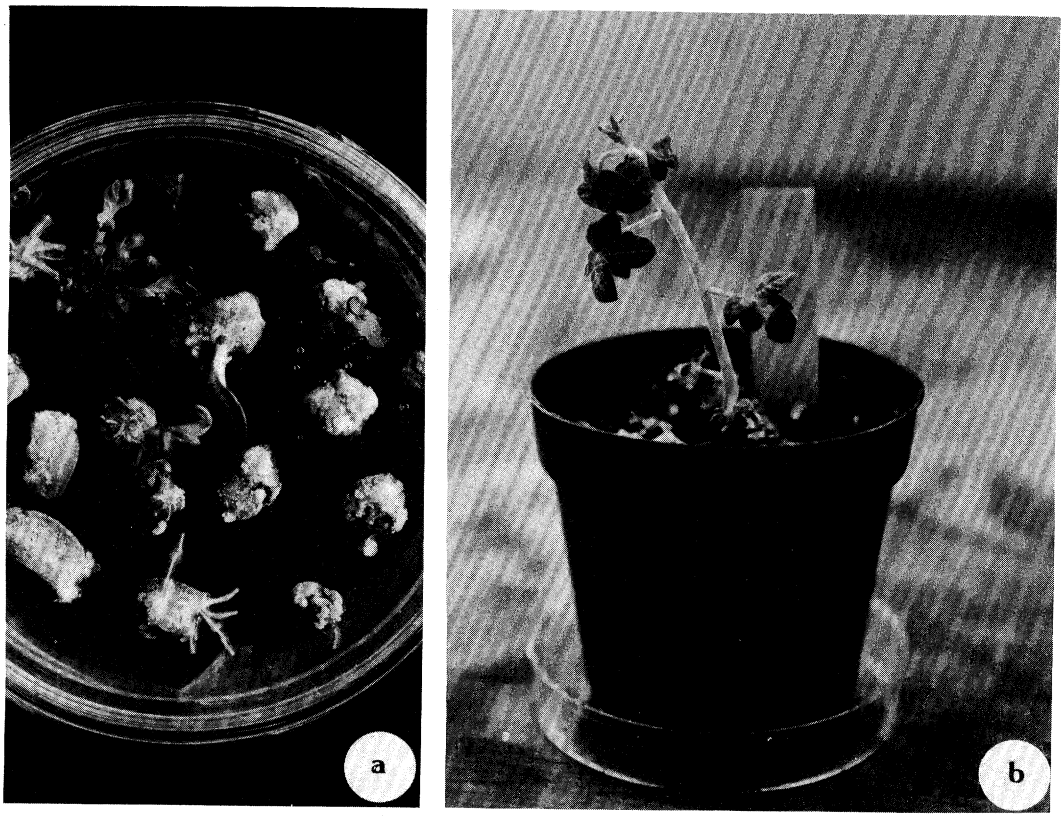

Fig. 2. transformation of VF134-1-2 tomato plant with TYLCV-CP gene

a) cotyledon transformation showing putative transformants and non-transformed tissues

b) transgenic tomato plant with TYLCV-CP gene in potting medium

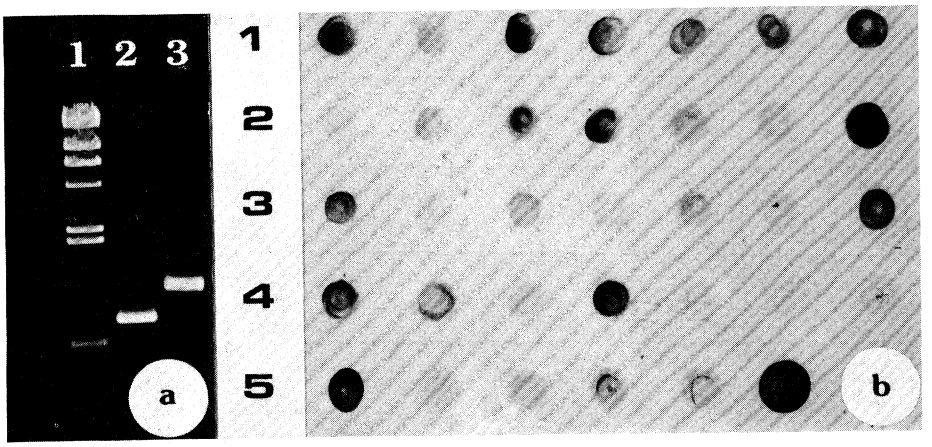

Fig. 3. DNA probe for the dectection of TYLCV-CP gene

a) TYLCV-CP probe (lane-1 Lambda DNA digested with Hind III, lane2-TYLCV-CP 780 bp and Lane3-Digoxigenin labelled TYLCV-CP probe amplified by PCR)

b) Dot-blot Hybridization of saps from transgenic plants with Digoxigenin labelled TYLCV-CP probe. Dark purple spot (Row5, position 6 from left) is the positive control.