บทที่ 1

บทนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชเศรษฐกิจหลักอย่างหนึ่งของโลก ที่นิยมปลูกเพื่อบริโภคผลสด นำไปประกอบอาหารและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ มะเขือเทศที่ปลูกเป็นการค้าโดยทั่วไป มักจะเป็นพืชที่ค่อนข้างอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งโรคและแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคใบหงิกและโรคใบเหี่ยว ส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิต จำเป็นต้องให้ความเอาใจใส่ดูแลรักษาเป็นอย่างดี และสม่ำเสมอ ทำให้ต้นทุนการผลิตอยู่ในระดับสูง การควบคุมโดยสารเคมีได้ใช้มานานและใช้กันทั่วไป ต่อมาพบว่า ผลของสารเคมีที่ใช้ได้ผลน้อยลง เนื่องจากมีพัฒนาการของศัตรูพืชให้มีความต้านทาน ต่อสารเคมีที่ใช้จึงต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่สูงขึ้นส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีเพิ่มขึ้น และเป็นผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศ เกษตรกรจึงต้องการพันธุ์พืชที่ให้ผลผลิตดี มีความต้านทานโรคและแมลงชนิดต่างๆมาใช้เพาะปลูก เพื่อลดต้นทุนการผลิตและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (สุรชัย มัจฉาชีพ 2535; พรทิพย์ ธนูทอง 2529)

ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างพืชพันธุ์ใหม่โดยวิธี Conventional breeding โดยทั่วไปมักต้องใช้เวลาในการผสมพันธุ์และปลูกทดสอบคัดเลือก ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วอายุ (Generation) จึงจะได้พันธุ์พืชที่มีลักษณะตามที่ต้องการและมีความคงตัวทางพันธุกรรม (Homozygosity) ซึ่งต้องใช้พื้นที่มากในการปลูกพืชทดลอง นอกจากนั้นบางครั้งพืชที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์อาจไม่ได้ลักษณะที่ดีตามที่ต้องการ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมพันธุ์แบบดั้งเดิมแต่อย่างเดียวอาจมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงได้เริ่มมีการนำเอาเทคโนโลยีทางชีวภาพเข้ามาช่วยแก้ปัญหา โดยเพิ่มโอกาสของการเกิดลักษณะที่ต้องการ และร่นระยะเวลาการคัดเลือกพันธุ์พืช ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น การชักนำให้เกิดมิวเตชันในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในหลอดทดลอง แล้วคัดเลือกต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การหลอมรวมเซลล์ ที่มีลักษณะที่ต้องการเข้าด้วยกัน โดยวิธี protoplast fusion รวมถึงเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ได้แก่ การตัดต่อยีนและสอดใส่เข้าไปในเซลล์ที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ เป็นต้น (พรทิพย์ ธนูทอง 2529)

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีข้อได้เปรียบกว่า Conventional breeding ในการปรับปรุงพันธุ์ที่ต้องการเพิ่มลักษณะ 1-2 ลักษณะเข้าไปในพืช โดยที่ปัจจุบันมีความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมอย่างรวดเร็วมาก มีการสร้าง

พืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) กันอย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆเพื่อการศึกษาทางด้าน Molecular Genetics และนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อให้ได้พืชที่มีลักษณะตามที่ต้องการ เช่น สามารถสร้างพืชที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ให้ผลผลิตสูง มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เชื้อโรค แมลง และศัตรูพืช ประเทศไทยเราควรเตรียมพร้อมรับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยการศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคนิควิธีการในการสร้างพืชแปลงพันธุ์ในพืชผลทางการเกษตรที่เพาะปลูกในประเทศไทย เมื่อมีการพัฒนาเทคนิควิธีการจนเป็นที่ยอมรับทั่วไปแล้ว และมีความจำเป็นที่เราจะต้องนำมาใช้ จะทำให้เราสามารถพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชที่ปลูกได้ทันตามความต้องการ

ในการถ่ายยีนเข้าไปยังพืช มักต้องอาศัยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นพื้นฐาน ดังนั้นก่อนที่จะนำเทคนิคการถ่ายยีนไปใช้ จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นๆ เพื่อนำมาใช้ในการทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชได้ การเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศบางพันธุ์มีข้อจำกัดในการชักนำให้แคลลัสให้เจริญพัฒนาเป็นยอด (regeneration) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบหาชนิดและวิธีการเตรียม feeder cells ที่เหมาะสมเพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อของใบเลี้ยงของ มะเขือเทศเกิด regeneration ได้ดีขึ้นในการทำ transformation พร้อมทั้งศึกษาสูตรอาหาร และ ขั้นตอนที่เหมาะสมที่จะทำให้เนื้อเยื่อใบเลี้ยงที่ทำ transformation สามารถที่จะ regenerate ได้ดี มะเขือเทศ 2 พันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง คือ พันธุ์สีดาทิพย์และพันธุ์สวีทเซอรี ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมบริโภค และได้รับการปรับปรุงให้เป็นพันธุ์ที่ทนร้อนเหมาะสมที่จะเพาะปลูกในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ดีมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์นี้ค่อนข้างอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งโรค และแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคใบหงิก และโรคใบเหี่ยว ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิต

ในอนาคตหากจะมีการพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของมะเขือเทศสองพันธุ์นี้ การทราบถึงเทคนิควิธีการและสภาวะที่เหมาะสม จึงเป็นข้อมูลหนึ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาพันธุ์ด้วยเทคนิคดังกล่าว การศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์ที่มีการนิยมปลูกในประเทศในครั้งนี้ เป็นการพัฒนาการถ่ายยีนโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 ซึ่งมียีน neomycin phosphotransferase // (npt //) ซึ่งเป็นยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin resistant gene) และ *gus* gene ที่มีการควบคุมการแสดงออกด้วย 35S CaMV promoter ดังนั้น ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของการ transformation จึงทำการตรวจสอบ โดยการนับจำนวนยอดที่เกิดใหม่บนอาหารที่มีกานามัยซิน ภายหลังการทำ transformation จากนั้นตรวจสอบต้นพืชที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GUS โดยวิธี

Histochemical assay (ภาคผนวก) และตรวจสอบยีน *npt* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) (ภาคผนวก) เพื่อยืนยันการคงอยู่ของยีนที่ถ่ายทอดสู่พืชในจีโนมของพืชแปลงพันธุ์

วัตถุประสงค์ของการศึกษาทดลอง

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ และพันธุ์สวีทเชอรี่ โดยการใช้ feeder cells จากยาสูบ (*Nicotiana tabacum*. L.) และ จากพิทูเนีย (*Petunia hybrida*. L.)
2. ศึกษาสูตรอาหารและขั้นตอนที่เหมาะสมในการทำ transformation และ regeneration ของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ และพันธุ์สวีทเชอรี่

แผนการดำเนินการวิจัยประกอบด้วย

1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเตรียม feeder cells จากใบยาสูบ และพิทูเนีย เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ
2. การศึกษาสูตรอาหารและขั้นตอนที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ และพันธุ์สวีทเชอรี่
3. การศึกษาตรวจสอบต้นมะเขือเทศที่ได้จากการ transformation ซึ่งคาดว่าจะเป็น transgenic plant โดยวิธี GUS assay และด้วยวิธี PCR

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย