การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเชอรี่เพื่อเพิ่มความหวานด้วยวิธีผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ดีแคปส์ และ สนิปส์ในการคัดเลือก

Cherry Tomato Backcross Breeding to Increase Sweetness by dCAPS and SNPs Markers in Assisted Selection

ต้นสัก โรจน์คำลือ

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

อรอุบล ชมเดช* และ ภูมิพัฒน์ ทองอยู่

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

จุลภาค คุ้นวงศ์

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

Tonsak Rojkhamlue

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture Kamphaeng Sean,

Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

Ornubol Chomdej* and Pumipat Thongyoo

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

Julapark Chunwongse

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI)

Received: June 1, 2023 ; Revisions: October 31, 2023 ; Accepted: January 4, 2024

บทคัดย่อ

มะเขือเทศเชอรี่เป็นมะเขือเทศที่รับประทานผลสด รสชาติจึงมีความสำคัญต่อการบริโภค จึงทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชอรี่154 ที่มีค่าความหวานอยู่ที่ 6-8 องศาบริกซ์ (°Brix)ให้มีความหวานขึ้นจากการผสมกลับกับสายพันธุ์ Wva700 ที่มีค่าความหวานอยู่ที่ 9-11°Brix โดยปกติการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับเพื่อการถ่ายทอดลักษณะที่สนใจ 1-2 ลักษณะจากพันธุ์ให้เข้าสู่พันธุ์รับที่เป็นพืชพันธุ์ดีจะใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ 5-6 ชั่วรุ่น งานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค Kompetitive Allele Specific PCR โดยอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ 200 ตำแหน่ง ที่กระจายในทุกๆ 5 cM ของจีโนมมะเขือเทศและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Flapjack เพื่อช่วยคัดเลือกพื้นฐานพันธุกรรม

*Corresponding author: ornubol@gmail.com
DOI:10.14456/tjst.2023.8

(genetic background) ในทุกรุ่นของการผสมกลับ พร้อมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ดีแคปส์ เพื่อช่วยคัดเลือกยีนความหวาน (*LIN5*) จากการผสมกลับระหว่างมะเขือเทศเชอรี่154 กับมะเขือเทศสายพันธุ์ Wva700 ผลการศึกษาพบว่า รุ่น BC_1F_1 มีสัดส่วนการกระจายตัวของพันธุ์รับหรือเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่อยู่ที่ 64-91% รุ่น BC_2F_1 ที่ 81-91% และรุ่น BC_3F_1 ที่ 91-99.6% โดยคัดเลือกต้นที่ต้องการจากค่าความหวานและเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ รุ่น BC_1F_1 ได้เลือกต้นที่มีความหวาน 8.3°Brix และมีสัดส่วนของพันธุ์รับที่ 88.1% รุ่น BC_2F_1 ได้เลือกต้นที่มีความหวาน 9.6°Brix และมีสัดส่วนของพันธุ์รับที่ 89.8% และรุ่น BC_3F_1 ได้เลือกต้นที่มีความหวาน 7.6°Brix และมีสัดส่วนของพันธุ์รับที่ 95.6% ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการคัดเลือกต้นที่มีสัดส่วนของพันธุ์รับที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยได้ในรุ่นแรกๆ ทำให้มีความแม่นยำในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการสูง และลดระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับได้

คำสำคัญ: มะเขือเทศ; การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก; เครื่องหมายสนิปส์; ความหวาน

Abstract

Cherry154 is typically consumed fresh, so the taste is essentially required. To enhance their sweetness, the Cherry154 contained a sweetness value at 6-8°Brix was subjected to backcrossing with Wva700 which contained 9-11°Brix. Normally, Backcross breeding is used to transfer 1-2 traits of interest from a donor parent to a recurrent parent. This process takes 5-6 generations to fix genetic background from one to another variety. This research used the Kompetitive Allele Specific PCR technique by 200 SNPs marker-assisted backcrossing in each generation to aid in genetic background selection, covering every 5 cM on the tomato genome and analyzing data with the Flapjack program. It also used a dCAPs marker to select the *LIN5* gene in order to increase sweetness from backcrossing between Cherry154 and Wva700. The results showed plants in BC_1F_1 had various recurrent parent percentage (RPP) values from 64-91%, BC_2F_1 had RPP values varied from 91-81% and BC_3F_1 were 91-99.6%. Plant in each generation were selected based on their sweetness and high value on RPP percentage. Therefore, the plant contained 8.3 °Brix with 88.1% at BC_1F_1, 9.6°Brix with 89.8% at BC_2F_1, and 7.6 °Brix with 95.6% RPP at BC_3F_1 were chosen. It is indicated that a background selection using marker-assisted backcrossing allows plant breeding programs to be potentially precise for trait selection, time-saving, and meeting consumer needs.

Keywords: Tomato; Backcross breeding with marker-assisted selection; SNP markers; Sweetness

1. บทนำ

มะเขือเทศเชอรี่154 เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ตั้งแต่ปี 2540 เป็นสายพันธุ์ผสมเปิด ผลขนาดเล็ก ทรงรี เมื่อสุกจะมีสีแดงและมีความกรอบ มีลักษณะเด่นคือ ทนร้อน สามารถปลูกได้ดีในประเทศไทย เนื่องจากมะเขือเทศเชอรี่154 เป็นมะเขือเทศที่รับประทานผลสด รสชาติจึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อความต้องการของผู้บริโภค มะเขือเทศเชอรี่154 มีค่าความหวานที่ประมาณ 6-8 °Brix โดยประเมินจากการวัดของแข็งที่ละลายน้ำได้ (soluble solid content, SSC) Fridman *et al.*, 2004 ได้รายงานว่ายีน *LIN5* เป็นยีนหลัก (major gene) ที่ควบคุมลักษณะ SSC ที่ตำแหน่ง °Brix 9-2-5 บนโครโมโซม 9 ทำหน้าที่ผลิต enzyme hydrolase สำหรับย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส Noisang (2018) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS) เพื่อใช้คัดแยกอัลลีลของยีน *LIN5* ที่เกี่ยวข้องกับ Sucrose invertase จากการศึกษาความแตกต่างของอัลลีลมะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อนและห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel3477913 สามารถใช้แยกอัลลีลของยีน *LIN5* ในมะเขือเทศออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีอัลลีลที่มาจาก *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme (LIN5-cera*) และกลุ่มที่มีอัลลีลที่มาจาก *S. pimpinellifolium* (*LIN5-pimp*) โดยมะเขือเทศสายพันธุ์ Wva700 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีอัลลีล *LIN5-cera* และมะเขือเทศเชอรี่154 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีอัลลีล *LIN5-pimp* จากนั้นจึงนำมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์มาผสมกลับเพื่อให้มะเขือเทศเชอรี่154 มีความหวานเพิ่มขึ้นจากการเพิ่มอัลลีล *LIN5-cera*

การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (backcross breeding) เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่ให้ผลลัพธ์ที่คาดการณ์และทำซ้ำได้ โดยเป็นการถ่ายทอดลักษณะที่สนใจจากพันธุ์หนึ่งไปสู่อีกพันธุ์หนึ่ง จากการผสมระหว่างพันธุ์ให้ (donor parent) กับพันธุ์รับ (recurrent parent) หลายชั่วอายุ ซึ่งการผสมกลับในแต่ละครั้ง พันธุกรรมของพันธุ์ให้จะลดลงครึ่งหนึ่ง จึงนิยมผสมกลับอย่างน้อย 5-6 ครั้ง เพื่อให้มีสัดส่วนของสายพันธุ์ปรับปรุงเข้าใกล้พันธุ์รับมากที่สุด ในทางทฤษฎีประชากรลูกผสมกลับในรุ่น BC_1F_1 จะมีเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยความเหมือนแม่ที่ 75% แต่การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับ (marker-assisted backcrossing) ในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับนั้น สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการและมีความเหมือนแม่ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยได้ (Frisch *et al.*,1999; Hasan *et al.*, 2015) และสอดคล้องกับรายงานของ Lasuk (2011) ที่ศึกษาการคัดเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Simple Sequence Repeat (SSR) 80 ตำแหน่ง ในการคัดเลือกลูกผสมกลับระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์สีดาทิพย์3 และมะเขือเทศสายพันธุ์ Wva700 พบว่า รุ่น BC_1F_1 มีสัดส่วนของพันธุ์รับตั้งแต่ 30-80% รุ่น BC_2F_1 มีสัดส่วนของพันธุ์รับอยู่ระหว่าง 65-80% และในรุ่น BC_3F_1 สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนของพันธุ์รับได้ตั้งแต่ 95-100%

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) ในการคัดเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับ โดยเป็นเทคโนโลยีที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) ที่มีความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่ง หรือความแตกต่างกันของชิ้นส่วนที่มีการแทรกหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้นๆ เรียกว่า insertion /deletion หรือ indel โดยใช้หลักการ

fluorescence based genotyping assay ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ ถูกต้อง รวดเร็ว และมีระบบรองรับการตรวจตัวอย่างที่มีจำนวนมากพร้อมๆ กัน (Lifomics, 2020) การคัดเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับสามารถลดระยะเวลาของการผสมกลับลงได้ อีกทั้งยังส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานลดลง (Barone, 2004) งานวิจัยนี้จึงทำการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศด้วยการผสมกลับระหว่างเชอรี่154 และ Wva700 เพื่อเพิ่มความหวานจากการเพิ่มอัลลีลของยีน *LIN5*-cera ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด dCAP และคัดเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับด้วยเทคนิค KASP จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs เพื่อให้สามารถเลือกต้นพันธุ์รับที่มีความหวานและมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ได้อย่างรวดเร็ว

2. วิธีการ

2.1 สายพันธุ์มะเขือเทศและแผนการปรับปรุงพันธุ์: ผสมมะเขือเทศสายพันธุ์เชอรี่154 (*Solanum lycopersicum* L.) ที่เป็นพันธุ์รับที่มีค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ที่ 6-8 องศาบริกซ์ กับมะเขือเทศสายพันธุ์ Wva700 (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) ที่เป็นพันธุ์ให้ที่มีค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ที่ 9-11 องศาบริกซ์ เมื่อได้ลูกผสมรุ่นที่ 1 (F_1) นำมาผสมกลับเข้าหาพันธุ์รับเพื่อให้ได้ลูกผสมกลับตั้งแต่รุ่นที่ 1 (BC_1F_1) จนถึงลูกผสมรุ่นที่ 3 (BC_3F_1) ตามแผนผังการปรับปรุงพันธุ์ (Figure 1)

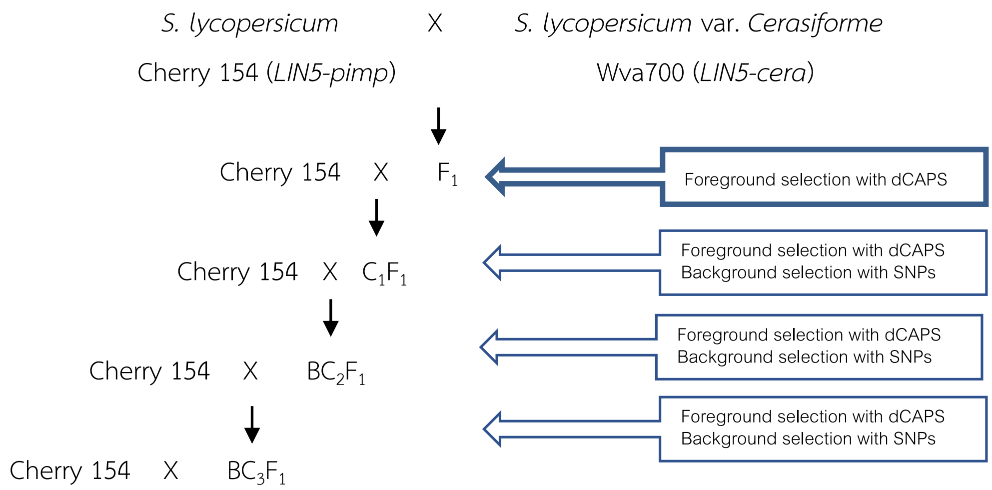

Figure1 Breeding program for cherry tomato backcrossing to increase sweetness by dCAPS and SNPs markers in assisted selection

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ: เพาะเมล็ดลูกผสมกลับในวัสดุปลูก เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 2 สัปดาห์ สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีของ Fulton *et al.* (1995) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NANODROP 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

2.3 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกยีนเป้าหมาย (Foreground selection with dCAPS): คัดเลือก

ลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS) dSNP3477433 ที่จำเพาะต่อยีน *LIN5* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำตาลภายในผลของมะเขือเทศ Noisang *et al.* (2019) คัดเลือกเฉพาะต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัส อัลลีลของยีน *LIN5* ระหว่าง *S. pimpinellifolium* ที่ได้มาจากสายพันธุ์เชอรี่154 (*LIN5-pimp*) และ *S. lycopersicum var. cerasiforme* (*LIN5-cera*) โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้

Forward primer: 5'-ACAACCCGTTGATCGTCCCTGATAT-3'

Reverse primer: 5' GTCGATTCTCAATCCCTTCC-3'

2.4 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับ (Background selection with SNPs): สกัดดีเอ็นเอปริมาณ 3.75 นาโนกรัม จากต้นที่ถูกคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย (*LIN5*) เพื่อตรวจสอบ genome background ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ จำนวน 200 ตำแหน่ง ที่กระจายในทุกๆ 5 cM ของจีโนมมะเขือเทศด้วยเทคนิค KASP (Smith and Maughan, 2015) โดยการหาลำดับเบสดีเอ็นเอจากบริษัท Straits Biotech ประเทศสิงค์โปร์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม Flapjack version 1.19.09.04; 4th September 2019 (Milne *et al.*, 2010) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ (Recurrent Parent Percentage, RPP)

2.4 การวัดค่าความหวานผล: เลือกผลที่เกิดจากกิ่งที่ 2-5 ที่เจริญมาจากกิ่งหลัก (main stem) และเป็นผลที่ 3 จากโคนช่อ โดยแบ่งการเก็บเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะ immature (IM) อายุผล 14 วันหลังการผสม ระยะ mature green (MG) อายุผล 27 วันหลังการผสม ระยะ breaker (BK) อายุผล 42 วันหลังการผสม และระยะ ripening (RP) อายุผล 57 วันหลังการผสม

2.5 หลักการคัดเลือกต้นที่ต้องการ: คัดเลือกต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัสอัลลีลของยีน *LIN5* และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่สูง ร่วมกับการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ดีทางการเกษตร ได้แก่ ขนาดผล รูปร่างผล สีผล ลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเลื้อย (semi-determinate type) และค่าปริมาณความหวานจากการวัด SSC โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่ในแปลงปลูก

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

งานวิจัยได้ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล dSNP3477433 ที่จำเพาะต่อยีน *LIN5* (Foreground selection with dCAPS) เพื่อเพิ่มลักษณะความหวาน จากการผสมกลับของสายพันธุ์ Wva700 (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) กับสายพันธุ์เชอรี่154 (*Solanum lycopersicum* L.) ที่เป็นพันธุ์รับ โดยในการคัดเลือกได้เลือกเฉพาะต้นที่ให้ผลเป็นเฮเทอโรไซโกตของอัลลีล *LIN5-pimp* (419 bp.) จากมะเขือเทศสายพันธุ์เชอรี่ 154 และ *LIN5-cera* (394 bp.) จากมะเขือเทศสายพันธุ์ Wva700 ดังช่องที่ 2, 7, 8, 10, 12 และ 13 (Figure 2) เพื่อย้ายปลูกสำหรับคัดเลือกฟีโนไทป์อื่นๆ ต่อในแปลงปลูก ได้แก่ ขนาดผล รูปร่างผล สีผล ลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเลื้อย (semi-determinate type) และค่าปริมาณความหวานจากการวัด SSC โดยในรุ่น BC_1F_1 คัดเลือกมา 70 ต้นจาก 189 ต้น BC_2F_1 คัดเลือกมา 92 ต้น จาก 200 ต้น และ BC_3F_1 คัดเลือกมา 92 ต้น

จาก 200 ต้น เพื่อส่งวิเคราะห์ genome background ของพันธุ์รับด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ (Background selection with SNPs)

ผลการวิเคราะห์ genome background ด้วยเทคนิค KASP ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ 200 ตำแหน่งที่ครอบคลุมทุก 5cM ทั่วทั้งจีโนม ในรุ่น BC_1F_1 จำนวน 70 ต้น มีเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สนิปส์ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphic) ระหว่างสายพันธุ์ Wva700 กับ สายพันธุ์เชอรี่154 จำนวน 20 เครื่องหมาย จากทั้งหมด 200 เครื่องหมาย และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Flapjack พบว่ามีการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ (Recurrent Parent Percentage, RPP) ที่ 64-91% โดยพบต้นที่มี RPP ในช่วง 60-65% จำนวน 4 ต้น, RPP 66-70% จำนวน 8 ต้น, RPP 71-75% จำนวน 9 ต้น, RPP 76-80% จำนวน 31 ต้น, RPP 81-85% จำนวน 6 ต้น, RPP 86-90% จำนวน 10 ต้น และ RPP 90-95% จำนวน 2 ต้น (Figure 3) ซึ่งเมื่อคัดเลือกร่วมกับปริมาณความหวานและลักษณะที่ดีทางการเกษตร เช่น ขนาดผล รูปร่างผล สีผล และลักษณะการเจริญเติบโตแบบกึ่งเลื้อย (semi-determinate type) แล้ว ได้คัดเลือกได้ต้นที่ดีที่สุดไว้ปรับปรุงพันธุ์ต่อ โดยเป็นต้นที่มีความหวานอยู่ที่ 8.3 °Brix และมี RPP เท่ากับ 88.1% (Table 1, Figure 3 และ Figure 5c)

ผลการวิเคราะห์ของประชากรรุ่น BC_2F_1จำนวน 92 ต้นพบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ 88 เครื่องหมาย จากทั้งหมด 200 เครื่องหมาย (20 เครื่องหมายเดิมจากเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างได้ในรุ่น BC_1F_1 รวมกับ 180 เครื่องหมายที่ตำแหน่งของสนิปส์ใหม่) และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Flapjack พบว่ามีการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ที่ 81-91% โดยพบต้นที่มี RPP ในช่วง 81-85% จำนวน 37 ต้น และต้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ในช่วง 86-91% จำนวน 55 ต้น (Figure 4) ซึ่งเมื่อคัดเลือกร่วมกับปริมาณความหวานและลักษณะที่ดีทางการเกษตร ได้เลือกได้ต้นที่มีความหวาน 9.6°Brix และมี RPP เท่ากับ 89.8% ไว้ปรับปรุงพันธุ์ต่อ (Table 1, Figure 4 และ Figure 5d)

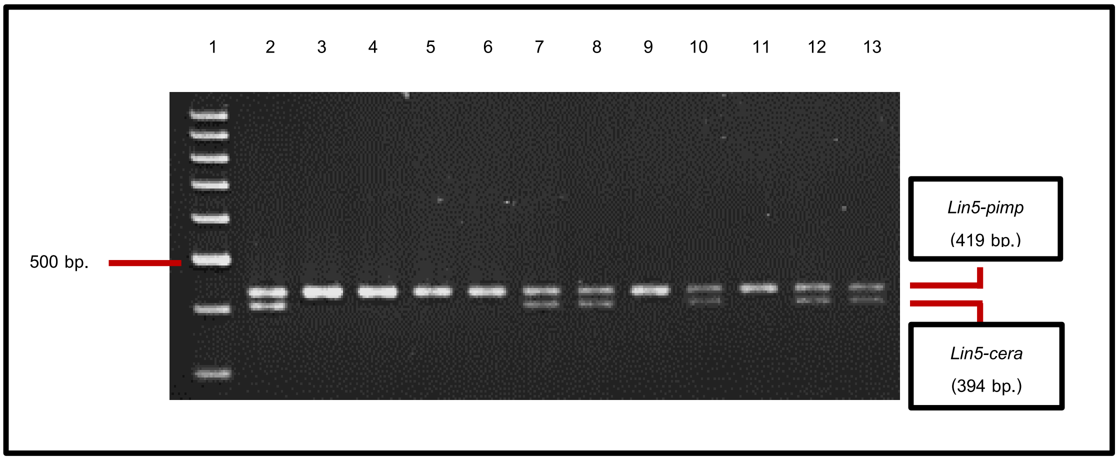

Figure 2 Detection of LIN5 gene using marker dSNP3477433 on a 3% agarose gel electrophoresis (Lane 1: DNA Ladders 1 Kb, Lane 2-13: Progenies from a cross between Cherry154 (LIN5-pimp ;419 bp.) and Wva700 (LIN5-cera; 394 bp.)

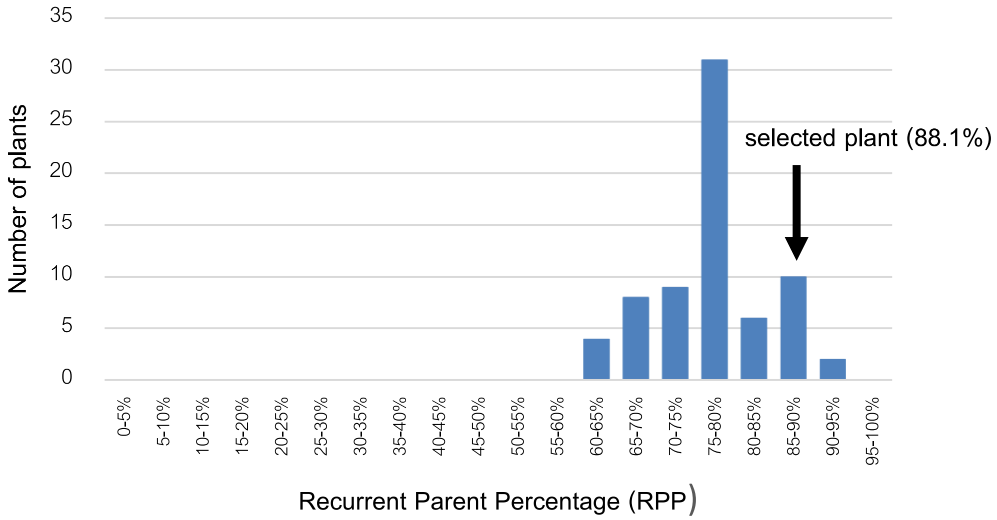

Figure 3 Distribution of 70 tomato lines at BC_1F_1 generation varies from 64-91% Recurrent Parent Percentage (RPP). Arrow indicated selected line contained 88.1% RPP.

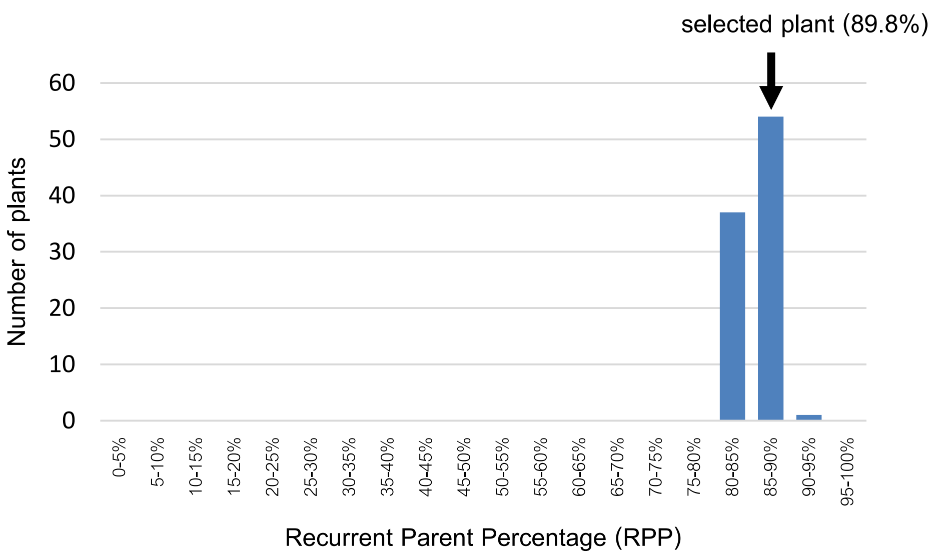

Figure 4 Distribution of 92 tomato lines at BC_2F_1 generation varies from 81-91% Recurrent Parent Percentage (RPP). Arrow indicated selected line contained 89.8% RPP.

ผลการวิเคราะห์ของประชากรรุ่น BC_3F_1 พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ 123 เครื่องหมาย จากทั้งหมด 200 เครื่องหมาย (88 เครื่องหมายเดิม จากเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างได้ในรุ่น BC_2F_1 รวมกับ 112 เครื่องหมายที่ตำแหน่งของสนิปส์ใหม่) และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Flapjack พบว่า มีการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ที่ 91-99.6% โดยพบต้นที่มีเปอร์เซ็นต์

ความเหมือนแม่ในช่วง 91-95% จำนวน 47 ต้น และต้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ในช่วง 96-99.6% จำนวน 45 ต้น (Figure 5) ซึ่งเมื่อคัดเลือกร่วมกับปริมาณความหวานและลักษณะที่ดีทางการเกษตร ได้คัดเลือกได้ต้นที่มีความหวาน 7.6°Brix และมี RPP เท่ากับ 95.6% (Table 1, Figure 5 และ Figure 5e)

ค่าเฉลี่ยความแข็งที่ละลายน้ำได้ (SSC) ที่ใช้เป็นตัวแทนของการวัดความหวานของผลมะเขือเทศ พบว่าในสายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่ ได้แก่ เชอรี่154 และ Wva700 มีค่านี้ลดลงค่อนข้างมากในการปลูกเพื่อคัดเลือกในรุ่น BC_3 โดยสายพันธุ์เชอรี่154 ลดลงจาก 9.3°Brix ในรุ่น BC_1F_1 และ 9.4°Brix ในรุ่น BC_2F_1 เป็น 6.4°Brix ในรุ่น BC_3F_1 และสายพันธุ์ Wva700 มีค่าเฉลี่ย SSC ลดลงจาก 9.9°Brix ในรุ่น BC_1F_1 และ BC_2F_1 เป็น 6.5°Brix ในรุ่น BC_3F_1 ส่วน ส่วนต้นลูกผสมกลับที่คัดเลือกในรุ่น BC_3F_1 มีค่า Brix ที่แตกต่างกันในแต่รุ่น และต่ำที่สุดในรุ่น BC_3 โดยเท่ากับ 7.6°Brix (Table 1)

Table 1 Tomato selected line in each generation from backcrossing between Cherry154 and Wva700. Ten Fruits were selected from each line for SSC testing at the ripening stage.

Gen.	Lines	Type	RPP (%)	SSC (°Brix) ± S.D.	Weight (g) ± S.D.	W: L ratio (cm.)
BC_1	1	Semi-determinate	88.1	8.3 ± 1.1	7.9 ± 0.8	0.8
	CH154	Semi-determinate	100	9.3 ± 0.7	13.4 ± 1.7	0.7
	Wva700	Indeterminate	0	9.9 ± 1.1	3.3 ± 0.3	1.0
BC_2	1-10-72	Semi-determinate	89.8	9.6 ± 0.4	7.7 ± 1.0	0.73
	CH154	Semi-determinate	100	9.4 ± 0.5	12.0 ± 0.8	0.73
	Wva700	Indeterminate	0	9.9 ± 1.1	2.6 ± 0.3	0.98
BC_3	1-10-72-41	Semi-determinate	95.6	7.6 ± 1.3	10.4 ± 1.3	0.71
	CH154	Semi-determinate	100	6.4 ± 0.7	11.6 ± 1.5	0.65
	Wva700	Indeterminate	0	6.5 ± 0.8	2.5 ± 0.3	1.03

3.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับเป็นการถ่ายทอดลักษณะที่สนใจเข้าสู่พืชพันธุ์ดีให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้คือความหวานที่ควบคุมโดยยีนซูโครสอินเวอร์เทส (*LIN5*) จากมะเขือเทศ *Solanum lycopersicum var. cerasiform* สายพันธุ์ Wva700 (*LIN5-cera*) มาผสมกลับกับมะเขือเทศสายพันธุ์เชอรี่154 (*LIN5-pimp*) เพื่อเพิ่มความหวาน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าความหวานทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการคัดเลือกรุ่น BC_1 และรุ่น BC_2 ทั้งในสายพันธุ์เชอรี่154 และ Wva700 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในรุ่น BC_3 ทั้งนี้เนื่องจากช่วงเวลาที่ย้ายปลูกเพื่อคัดเลือกในรุ่น BC_3 มีสภาพอากาศไม่เหมาะสม มีฝนตกสลับกับอากาศร้อนและหนาว ทำให้มะเขือเทศปรับตัวไม่ทันต่อการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ที่ได้ในรุ่น BC_3 มีค่าที่แตกต่างไปจากสภาวะปกติ

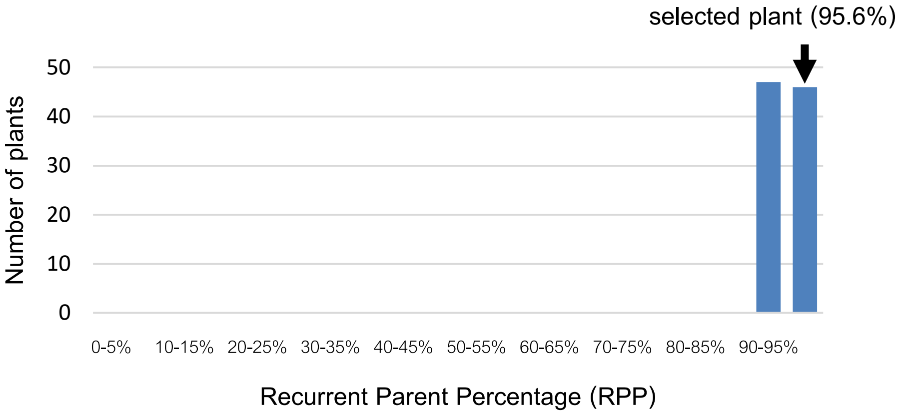

Figure 5 Distribution of 92 tomato lines at BC_3F_1 generation varies from 91-99.6% Recurrent Parent Percentage (RPP). Arrow indicated selected line contained 95.6% RPP.

Figure 6 Tomato fruit images of parents and selected lines in each generation from backcrossing between Cherry154 and Wva700. Cherry154 (5a); Wva700 (5b); BC_1F_1 (5c); BC_2F_1 (5d) and BC_3F_1 (5e)

ดังนั้นการปลูกทดสอบแต่ละครั้งจึงต้องมีการปลูกสายพันธุ์เปรียบเทียบไว้เพื่ออ้างอิงเสมอซึ่งการทดสอบครั้งนี้ได้ปลูกสายพันธุ์พ่อและแม่ที่เป็นสายพันธุ์แท้ไว้เพื่อเปรียบเทียบ ส่วนในสายพันธุ์ลูกผสมพบว่า รุ่น BC_3มีค่าความหวานต่ำที่สุดที่ 7.6˚Brix และความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับรุ่น BC_2 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับรุ่น BC_1 ทั้งนี้อาจเนื่องจากต้นที่คัดเลือกไว้ในแต่ละรุ่นไม่เหมือนกันในระดับดีเอ็นเอ และยังไม่มีความสม่ำเสมอ ความแตกต่างนั้นจึงไม่สามารถบอกได้ว่ามาจากสภาพแวดล้อมเพียงอย่างเดียว (Table 2)

Table 2 Mean comparison for soluble solid content in the same tomato variety/ line among each generation; (A) Cherry154 (B) Wva700 and (C) Backcross. Any two means having the same letter are not significantly different at the 5% level of significance.

(A) CH154		(B) Wva700		(C) Backcross	
Generation	˚Brix	Generation	˚Brix	Generation	˚Brix
BC_1	9.3^a	BC_1	9.9^a	BC_1	8.3^b
BC_2	9.4^a	BC_2	9.9^a	BC_2	9.5^a
BC_3	6.4^b	BC_3	6.5^b	BC_3	7.6^b

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ ด้วยเทคนิค KASP ในรุ่น BC_1F_1 พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้เพียง 20 เครื่องหมายจากจำนวนเครื่องหมายที่เลือกทั้งหมด 200 เครื่องหมาย ในขณะที่รุ่น BC_2F_1 พบว่ามีเพิ่มขึ้นอีก 68 เครื่องหมาย จาก 180 เครื่องหมายที่เลือกขึ้นใหม่ รวมเป็น 88 เครื่องหมาย และในรุ่น BC_3F_1 เพิ่มขึ้นอีก 35 เครื่องหมาย จาก 112 เครื่องหมายที่เลือกขึ้นใหม่ รวมเป็น123 เครื่องหมาย เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลที่เลือกใช้มาจากฐานข้อมูลของบริษัทผู้ให้บริการ จึงไม่จำเพาะกับประชากรที่ใช้ในงานวิจัย ทำให้ตรวจพบโพลีมอฟิซึมระหว่างสายพันธุ์พ่อและไม่สูงนัก และทำให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ไม่ได้มีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) ในประชากรทดสอบ (Figure 3) Whalen *et al.* (2019) ได้ทำการการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการไม่ทราบข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อแม่กับการทราบข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อหรือแม่เพียงข้างเดียว พบว่ากรณีหลังสามารถเพิ่มความแม่นยำในการกำหนดพ่อแม่ และลดการเกิดผลบวกลวง (false positives) ได้ดีกว่ากรณีแรก ดังนั้นการทราบข้อมูลจีโนไทป์ของสายพันธุ์พ่อและแม่ ทำให้กำหนดเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อประชากร และสามารถใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ศึกษาได้แม่นยำมากขึ้น ส่งผลให้ได้ลูกผสมที่ต้องการรวดเร็วยิ่งขึ้น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ และได้สายพันธุ์ใหม่ที่ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์

ประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ขนาดของประชากรในแต่ละรุ่น ระยะห่างของเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนเป้าหมาย และจำนวนของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการคัดเลือกชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับ (Hasan *et al.*, 2015) จากตัวอย่างประชากรของ Hospital (2003) พบว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือก foreground และ background นั้นทำให้ได้

ต้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ได้รวดเร็วกว่าการคัดเลือกจากการผสมกลับแบบดั้งเดิมเพียงอย่างเดียว โดยลูกผสมกลับในรุ่น BC_1-BC_4 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ที่ 79%, 92.2%, 98% และ 99% ตามลำดับ Frisch *et al.* (2014) ได้จำลองการทดลองเพื่อหากลยุทธ์ในการคัดเลือกข้าวโพดด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดแบบผสมกลับด้วยโปรแกรม PLABSIM พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ใน BC_1 เท่ากับ 74% BC_2 เท่ากับ 86.1% และ BC_1 เท่ากับ 92.4% งานวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hospital (2003) กับ Frisch *et al.* (2014) ที่คัดเลือกโดยอาศัยการคัดเลือกจีโนมสำหรับ foreground และ background เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะที่ต้องการและมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่สูง ด้วยเทคนิค KASP พบว่าในทุกรุ่นที่ทำการคัดเลือกจาก BC_1-BC_3 สามารถคัดเลือกต้นที่ตรงกับความต้องการ และมีค่า RPP ที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยทางทฤษฎีของต้นที่เกิดจากการผสมกลับ โดยเฉพาะถ้าสามารถคัดเลือกได้ต้นที่มี RPP ที่สูงได้ตั้งแต่ในรุ่นแรก ๆ ของการผสม จะสามารถลดจำนวนรุ่น (generation) ของการผสมกลับได้ (Barone, 2004; Lübberstedt *et. al.*, 2023) โดยลูกผสมกลับในรุ่น BC_1F_1 ที่คัดเลือกมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ที่ 88.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยทางทฤษฎีที่ 75 เปอร์เซ็นต์ ลูกผสมกลับในรุ่น BC_2F_1 ที่คัดเลือกมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ที่ 89.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยทางทฤษฎีที่ 87.5 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสมกลับในรุ่น BC_3F_1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ที่ 95.6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยทางทฤษฎีที่ 93.75 เปอร์เซ็นต์ (Figure 7)

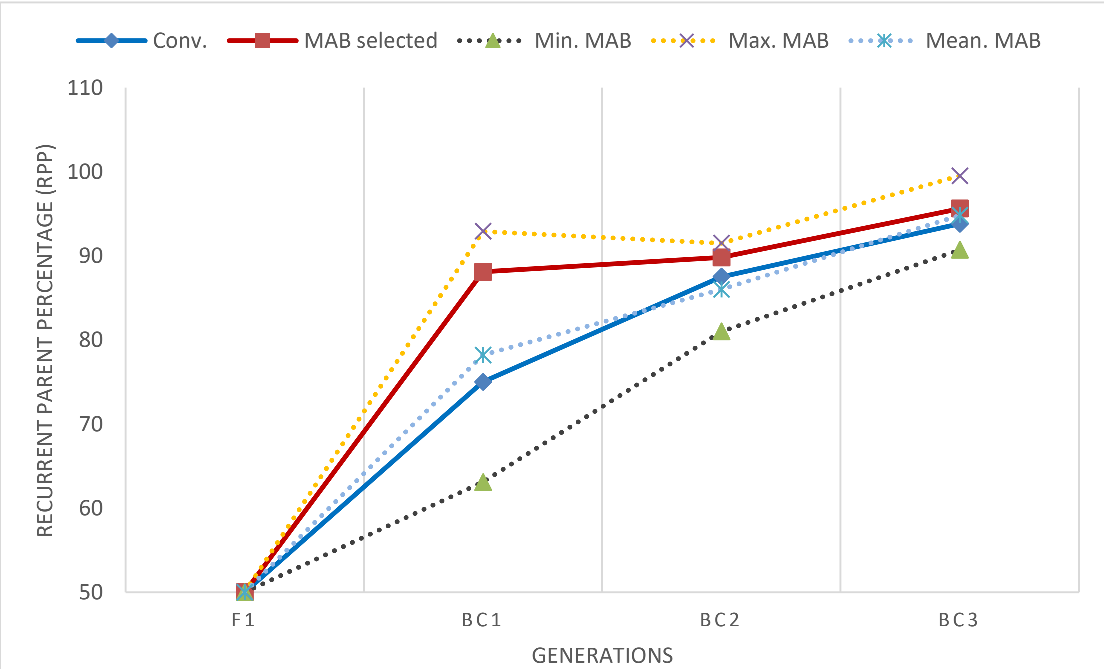

Figure 7 Recurrent Parent Percentage; RPPcomparison in each generation from tomato backcrossing between cherry154 and Wva700. (Conv.= theoretical proportion of the recurrent parent genome from backcrossing, Max. MAB= maximum value RPP from molecular-assisted backcrossing, Min. MAB= minimum value RPP from molecular-assisted backcrossing, Mean. MAB=mean value RPP from molecular-assisted backcrossing and MAB selected = RPP from selected plant)

ปัจจุบันเทคโนโลยีในการศึกษาลำดับเบสจีโนมและทรานสคริปโตมของมะเขือเทศมีแนวโน้มที่ก้าวหน้ามากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ เช่น เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ และการใช้เทคโนโลยี genotyping by sequencing (GBS) อนาคตคาดหวังว่าจะมีเครื่องหมายโมเลกุลใหม่ๆ ที่จะเกิดขึ้นพร้อมใช้ และสามารถเข้าถึงได้ ให้กับนักวิจัยและนักปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศในอนาคต (Foolad and Panthee, 2012) ทั้งนี้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์มีแนวโน้มที่ลดลง แต่ยังคงมีต้นทุนที่สูงกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับด้วยวิธีมาตรฐาน จากรายงาน National Human Genome Research ในการวิเคราะห์ลำดับเบส 1 ล้านเบส มีต้นทุนประมาณ 3 แสนบาท ในปี ค.ศ. 2001 และลดลดลงเหลือไม่ถึง 3 บาท ในปี 2019 (National Human Genome Research Institute, 2019) ซึ่งคาดว่าในอนาคตอันใกล้ การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือกอาจมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีมาตรฐานจากค่าแรงงานที่สูงขึ้นเรื่อยๆ Rojkhamlue (2019) ได้วิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับแบบต่างๆ พบว่า การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับด้วยวิธี whole genome marker-assisted selection โดยการใช้ marker-assisted selected (MAS) ร่วมกับ marker-assisted backcrossing (MAB) พบว่ามีต้นทุนที่สูงกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับด้วยวิธีมาตรฐานที่ร้อยละ 26.82 แต่สามารถลดเวลาการปรับปรุงพันธุ์ลงได้ครึ่งหนึ่ง จากความแม่นยำที่เพิ่มขึ้น ประกอบกับการใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ที่ลดลง ส่งผลให้ต้นทุนที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลลดลง น่าจะเป็นโอกาสที่ดีในการนำเทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลสมัยใหม่เข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชของประเทศไทย

4. สรุป

การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับระหว่างสายพันธุ์เชอรี่154 (*Solanum lycopersicum* L.) กับสายพันธุ์ Wva700 (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดดีแคปส์ เพื่อช่วยคัดเลือกยีนความหวาน (*LIN5*) และชนิดสนิปส์ในการคัดเลือก genome background ของประชากรลูกผสมกลับทั้ง 3 รุ่น ทำให้คัดเลือกต้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแม่ได้สูงกว่าต้นที่เป็นค่าเฉลี่ยทางทฤษฎี และได้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการ ลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ลงได้

5. References

Barone, A. (2004). Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *Amer.J.of Potato Res.*, 81, 111-117.

Foolad, M.R., & Panthee, D.R. (2012). Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(2), 93-123.

Fridman, E., Carrari, F., Liu, Y.S., Fernie, A.R.,, & Zamir, D. (2004). Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*, 305 1786–1789.

Frisch, M., Bohn, M., & Melchinger, A.E. (1999). Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Sci.*, 39, 1295–1301.

Fulton, T., Chunwongse, J., Tanksley, S.D., Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., & Kelly, S.L.(1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 13(3), 207-209.

Hasan, M.M., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Mahmood, M., Rahim, H.A., Alam, M.A., Ashkani, S., Malek, M.A., & Latif, M.A. (2015). Marker-assisted backcrossing: A useful method for rice improvement. *Biotechnol. Biotechnol.*, Equip. 29, 237–254.

Hospital, F. (2003). *Marker-assisted breeding. In: H.J. Newbury, editor. Plant molecular breeding.* Location: Oxford and Boca Raton: Blackwell Publishing and CRC Press, p.30-59.

Lasuk, R. (2011). Use of molecular markers in tomato breeding to increase soluble solid content and multiple disease resistances. (Master Thesis). Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 87p. (in Thai).

Lifomics (2020). *KASP genotyping*. Retrieved from https://www.lifomics.com/kasp.html, May 10, 2020. (in Thai)

Lübberstedt, T., Beavis, W., & Suza, W. (2023). Marker Assisted Backcrossing. Retrieved from W. P. Suza, & K. R. Lamkey (Eds.), *Molecular Plant Breeding*. Location: Iowa State University Digital Press.

Milne, I., Shaw, P., Stephen, G., Bayer, M., Cardle, L., Thomas, W., Flavell, A.J., & Marshall, D. (2010). Flapjack-graphical genotype visualization. *Bioinformatics*, 26(24), 3133-3134.

National Human Genome Research Institute. (2019). *The Cost of Sequencing a Human Genome*. Retrieved from https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost, January 10, 2020.

Noisang J., Luengwilai K., & Chunwongse J. (2019). The development of InDel marker for selection of Lin5 gene associated with sucrose invertase in tomato. *King Mongkut's Agricultural Journal*, 37(2), 190-199.

Noisang, J. (2018). Study of allele variation in *Lin5* gene associated with soluble solid content and breeding for increasing sugar content in cherry tomato. (Master). Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 62p.

Rojkhamlue, T. (2019). Cherry tomato breeding to increase sweetness and cost comparison of backcross breeding methods. (Master). Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 71p. (in Thai)

Smith, S.M., & Maughan P. J. (2015). *SNP genotyping using KASPar assays*. Location: Humana Press, New York.

Whalen, A., Gorjanc, G., & Hickey J.M. (2019). Parentage assignment with genotyping–by–sequencing data. *J Anim Breed Genet*, 136(2), 102–112.