วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฝรั่งโดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์สำหรับการประยุกต์ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์

Assessment of genetic diversity of guava (*Psidium guajava* L.) using SSR marker for application in guava breeding program

จันทร์เพ็ญ สะระ[1], กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ[1], จินตนา สามารถ[2], ธีรนุช เจริญกิจ[3], สุภารัตน์ ลีธนัชอุดม[1], กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง[4] และ แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1]*

Junpen Sara[1], Kanokwan Janphen[1], Jintana Samat[2], Theeranuch Jaroenkit[3], Suparat Lithanatudom[1], Krisana Lanumteang[4] and Saengtong Pongjaroenkit [1]*

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[1] Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, 50290
[2]โครงการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลเพื่อศูนย์พัฒนาพันธุ์พืชจักรพันธ์เพ็ญศิริ สระบุรี 18000
[2]Pomology Breeding Project, f Prince Chakrabandhu Pensiri Center for Plant Development, Saraburi, 18000
[3]สาขาวิชาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[3] Division of Pomology Technology, Faculty of Agriculture Production, Maejo University, Chiang Mai, 50290
[4]สาขาวิชาสถิติและการจัดการสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290
[4]Program in Statistics and Information Management, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, 50290

บทคัดย่อ: แหล่งรวบรวมพันธุ์พืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เป็นปัจจัยที่สำคัญซึ่งจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชมีโอกาสประสบความสำเร็จมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายเอสเอสอาร์ สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่ง กลุ่ม *Psidium guajava* (*P. guajava*) ในแปลงรวบรวมพันธุ์จำนวน 68 พันธุ์ และศึกษาความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะสีใบ สีผล และสีเนื้อของฝรั่ง อีกทั้งใช้ตรวจสอบฝรั่งลูกผสม ผลการคัดเลือกได้เครื่องหมาย SSR จำนวน 50 เครื่องหมาย สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และมีค่า Polymorphic Information Content (PIC) เฉลี่ย 0.31 โดยมี 6 เครื่องหมายที่มีค่า PIC มากกว่า 0.5 แสดงถึงความสามารถจำแนกพันธุ์สูง ได้แก่ เครื่องหมาย mPgCIR32, mPgCIR132, mPgCIR139, mPgCIR150, mPgCIR383 และ mPgCIR446 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งที่รวมรวมสามารถแยกกลุ่มฝรั่ง *P. guajava* ออกจาก *Psidium. cattleianum* โดยในกลุ่ม *P. guajava* มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.30-0.99 สามารถจัดกลุ่มใหญ่ได้จำนวน 2 กลุ่ม และกลุ่มย่อยที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน 6 เคลด งานวิจัยนี้ยังพบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับสีเนื้อกลุ่มสีชมพู แดง และม่วง คือ เครื่องหมาย mPgCIR153 สัมพันธ์กับเนื้อสีชมพู และเครื่องหมาย mPgCIR446 สัมพันธ์กับเนื้อสีแดงและม่วง อีกทั้งยังสามารถนำเครื่องหมาย SSR ไปตรวจสอบฝรั่งลูกผสม 5 คู่ผสม พบว่าเป็นลูกที่ได้จากการผสมข้ามทั้งหมด ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฝรั่งเหล่านี้จะสามารถนำไปใช้การปรับปรุงพันธุ์ฝรั่งให้เนื้อมีสีที่ต้องการต่อไป

คำสำคัญ: ฝรั่ง; เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; ลักษณะสีเนื้อ; การผสมข้ามพันธุ์

ABSTRACT: The genetic variation of germplasm and accurate selection are important factors in the success of a breeding program. The objectives of this study were to identify Simple Sequence Repeat (SSR) markers for studying

* Corresponding author: saengton@mju.ac.th

Received: date; March 27, 2023 Revised date; October 19, 2023

Accepted: date; November 15, 2023 Published: date;

the genetic diversity of 68 *Psidium guajava* (*P. guajava*) varieties in germplasm and to study association of SSR marker with the leaf, peel, and pulp color of guava including used to verify hybrid guava varieties. The results indicated that fifty SSR markers showed DNA amplification. The Polymorphic Information Content (PIC) was found to have an average value of 0.31. Notably, six SSR markers exhibited a high level of PIC (>0.5), namely mPgCIR32, mPgCIR132, mPgCIR139, mPgCIR150, mPgCIR383, and mPgCIR446. These markers proved effective in distinguishing different guava varieties. The result revealed genetic divergence between *P. guajava* and *Psidium cattleianum*. Within the 68 varieties of *P. guajava*, a similarity index ranging from 0.30 to 0.99 was observed, leading to the identification of two clusters and six clades within a subgroup. Moreover, this work demonstrated the association of SSR markers with pulp colors such as pink, red, and purple. The marker mPgCIR153 was linked to pink pulp, while the marker mPgCIR446 was associated with both red and purple pulp. Additionally, the study confirmed the detection of five guava hybrids using these SSR markers. Therefore, utilization of SSR markers and understanding of the genetic diversity in guava will prove to be essential tools. This knowledge can be harnessed to improve the breeding and cultivation of guava varieties with specific pulp colors.
Keywords: guava; microsatellite markers; genetic diversity; pulp color; cross breeding

บทนำ

ฝรั่ง (*Psidium guajava* L.; *P. guajava*) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อน เป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยเส้นใย วิตามินเอ วิตามินซี และกรดโฟลิค (Ahmed et al., 2011) มีแหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ในประเทศเม็กซิโก บราซิล อินเดีย และประเทศไทย (Kherwar et al., 2018) ซึ่งในประเทศไทยมีฝรั่งหลากหลายสายพันธุ์ เช่น แป้นสีทอง สาลี่ทอง หวานพิรุณ กิมจู ไร้เมล็ด เป็นต้น (มนตรี, 2558) จากฐานข้อมูลพันธุกรรมพืช รายงานข้อมูลฝรั่งพันธุ์การค้า เช่น กิมจู แป้นสีทอง ขาวอัมพร เย็น 2 พุทรา แป้นไส้แดง ทับทิมสยาม สามสีกรอบ และยังมีฝรั่งจากไต้หวัน คือ หงเป่าสือ ซีกวา เฟิ่นหงมี่ เหวินหง เจินจู และสุ่ยมี่ (สัจจะ, 2564) จากการสำรวจข้อมูลในตลาดกลางพบว่าฝรั่งที่จำหน่ายอยู่เพียง 3 พันธุ์ คือ กิมจู แป้นสีทอง และไร้เมล็ด (ตลาดไท, 2566) ซึ่งมีผลสีเขียวและเนื้อสีขาว ซึ่งฝรั่งที่มีเนื้อสีม่วงแดงมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าเนื้อสีขาว (วรพล, 2562) พบกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟิโนลิกสูงในฝรั่งพันธุ์แดงสยาม แดงอ่างขาง ที่มีสีเนื้อม่วงแดง (สุพรรณิกา และคณะ, 2554) และพบสารไลโคปีนในฝรั่งเนื้อสีชมพู (จุฑามาศ และ ธีรนุช, 2566)

การปรับปรุงพันธุ์ฝรั่งในประเทศไทยสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีการ คือ การคัดเลือกจากต้นที่มาจากการเพาะเมล็ดและการผสมพันธุ์ เช่น พันธุ์หวานพิรุณเป็นการคัดเลือกต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดพันธุ์แป้นสีทองยักษ์ พันธุ์แม่โจ้ 343 คัดเลือกจากการเพาะเมล็ดพันธุ์วังชมภู ในขณะที่ พันธุ์แม่โจ้ 341 ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์รุจนาและแป้นสีทอง พันธุ์สามสีกรอบได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แป้นสีทองและแดงทับทิมสยาม เป็นต้น (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช, 2566) ซึ่งเห็นได้ว่าฝรั่งพันธุ์ใหม่ที่มีรายงานในประเทศไทยได้จากการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม

ปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การจำแนกพันธุ์และคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ในขณะเดียวกันสามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสม และการศึกษา quantitative trait loci (QTL) mapping เพื่อระบุตำแหน่งของยีนที่สนใจ โดยการศึกษา QTL mapping ของไม้ผลและไม้เนื้อแข็งจะแตกต่างจากพืชกลุ่มอื่น โดยนิยมใช้ประชากรชั่วที่ 1 (F_1) เนื่องจากพืชในกลุ่มนี้มีลักษณะเฮเทอโรไซกัสในรุ่นพ่อแม่สูง (Wu et al., 2010) อีกทั้งวิธีการนี้จะใช้เวลามากในการสร้างประชากร ทำให้มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะที่สนใจในประชากรที่ได้จากการรวมรวมพันธุ์ โดยไม่ต้องทำการผสมเพื่อสร้างประชากร ดังมีรายงานในไม้ผล เช่น การใช้เครื่องหมาย Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และ Simple Sequence Repeat (SSR) เพื่อศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะต้านทานไรในมะพร้าว พบ 5 เครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับลักษณะที่ศึกษา (Shalini et al., 2007) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการเชื่อมโยงของเครื่องหมาย Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) กับปริมาณโปรตีนและน้ำตาลในแหล่งรวบรวมพันธุกรรมหม่อน (*Morus* spp.) ในอินเดีย พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณโปรตีน (Kar et al., 2008) เรียกวิธีการนี้ว่า The germplasm-regression-combined (GRC) association (Ruan, 2010) ซึ่งมีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR กับลักษณะทางการค้าที่สำคัญจากฝรั่งที่เก็บรวมรวมพันธุ์ในประเทศเม็กซิโก ซึ่งพบเครื่องหมาย mPgCIR131 และ mPgCIR136 มีความสัมพันธ์กับความหนาเนื้อ และเครื่องหมาย mPgCIR161 มีความสัมพันธ์กับลักษณะเนื้อสีขาวและครีม (Campos et al., 2017)

เครื่องหมาย SSR หรือเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายที่มีความจำเพาะเจาะจง สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยเฉพาะพืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบ (สุรีพร, 2546) นอกจากนี้ยังมีแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างสภาพโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสออกจากกันได้ และมีความหลากหลาย (polymorphism) สูง อีกทั้งสามารถทำซ้ำได้ (สุรินทร์, 2552) โดยมีการประยุกต์ใช้เครื่องหมาย SSR ในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายด้าน เช่น การประเมินความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) การจำแนกพืชแฮพลอยด์ (haploid) และดิพลอย์ (diploid) การสร้างแผนที่พันธุกรรม การใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก และการจำแนกลูกผสม (Amiteye, 2021)

สำหรับฝรั่งมีการพัฒนาเครื่องหมาย SSR ครั้งแรก โดย Risterucci et al. (2005) จำนวน 23 เครื่องหมาย ต่อมาในปี 2010 Risterucci และคณะ พัฒนาโปรแกรม SAT (SSR Analysis Tool) เพื่อออกแบบเครื่องหมาย SSR ของฝรั่งเพิ่มเติมอีก 160 เครื่องหมาย (Risterucci et al., 2010) และในปี 2020 รายงานเครื่องหมาย g-SSR ที่พัฒนาจาก genomic library ของฝรั่งพันธุ์ Allahabad Safeda เพิ่มเติมอีกจำนวน 38 เครื่องหมาย (Kumar et al., 2020) ซึ่งเครื่องหมาย SSR จำนวนมากเหล่านี้ มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและความแตกต่างทางพันธุกรรมของฝรั่งในแหล่งรวมรวมต่างๆ เช่น ในประเทศอินเดีย เม็กซิโก (Kherwar et al., 2018; Mehmood et al., 2015; Sitther et al., 2014; Valdés-Infante Herrero et al., 2007) และใช้ในการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมของฝรั่ง ซึ่งพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงความแข็งของเมล็ดฝรั่ง (Padmakar et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR กับลักษณะความหนาเนื้อ ซึ่งพบอัลลีลขนาด 141 คู่เบส ของเครื่องหมาย mPgCIR131 และอัลลีลขนาด 110 คู่เบส ของเครื่องหมาย mPgCIR136 มีความสัมพันธ์กับความหนาเนื้อ โดยมีความแม่นยำของเครื่องหมายในการตรวจสอบอยู่ที่ 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และศึกษาลักษณะสีเนื้อ คือ สีขาว ครีม และชมพู พบอัลลีลขนาด 263 คู่เบสของเครื่องหมาย mPgCIR161 มีความสัมพันธ์กับลักษณะเนื้อสีขาว โดยมีความแม่นยำของเครื่องหมายในการตรวจสอบอยู่ที่ 75 เปอร์เซ็นต์ (Campos et al., 2017) ปัจจุบันมีการค้นหายีนในการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ที่น่าสัมพันธ์กับสีเนื้อสีชมพู พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ในยีน phytoene synthase (*PSY*1) (Thakre et al., 2023)

ปัจจุบันมีความต้องการบริโภคฝรั่งที่อุดมไปด้วยสารสำคัญ เช่นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารที่ให้สรรพคุณทางยาซึ่งมักพบได้ในฝรั่งที่มีเนื้อสีชมพูม่วงแดง แนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ฝรั่งจึงมุ่งเน้นไปที่การปรับปรุงพันธุ์พันธุ์การค้าหรือพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรเพื่อให้มีสารสำคัญหรือลักษณะเนื้อมีสีเพิ่มมากขึ้น โดยปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชประสบความสำเร็จ คือ แหล่งรวบรวมพันธุ์พืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิธีการคัดเลือกที่แม่นยำ รวดเร็ว ในการศึกษาครั้งจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่มีรายงานในฝรั่งมาก่อน แล้วนำศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งในแปลงรวบรวมพันธุ์ของประเทศไทย และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมาย SSR ที่คัดเลือกกับลักษณะสีของใบ ผล และเนื้อของฝรั่ง รวมถึงการตรวจสอบฝรั่งลูกผสม เพื่อนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหล่งรวมรวบพันธุ์ เครื่องหมาย SSR ที่สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ เครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะสีเหล่านี้ ไปใช้การปรับปรุงพันธุ์ฝรั่งไทยให้มีสารสำคัญต่อไป

วิธีการศึกษา

1. พันธุ์ฝรั่ง

พันธุ์ฝรั่งที่ใช้ในการศึกษามาจากแปลงรวบรวมพันธุ์ฝรั่งของโครงการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผล ศูนย์พัฒนาพันธุ์พืชจักรพันธ์เพ็ญศิริ ซึ่งเป็นฝรั่งในกลุ่ม *P. guajava* จำนวน 68 พันธุ์ ฝรั่งกลุ่ม *Psidium cattleianum* (*P. cattleianum*) จำนวน 2 พันธุ์ **(Table 1)** และชมพู่จำนวน 2 พันธุ์ คือ พลาสติกแดง (*Syzygium jambos* (L.) Alston) และทับทิมจันทร์ (*Eugenia javanica lamk*) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม *Psidium* ssp.

Table 1 The list of guava cultivars and the color of leaf, peel, and pulp in this study

No.	Cultivars	Leaf color	Peel color	Pulp color	Origin/Pedigree
1	Baidang	Variegated	Variegated	Pink	-
2	Bangkok Apple	Green	Green	White	India x Vietnam
3	Beaumont (Daeng Hawaii)	Green	Green	Pink	Hawaii
4	Chanjin	Variegated	Variegated	White	-
5	Chompoopuntip	Green	Green	Pink	Taiwan
6	Daeng	Red	Red	Purple	-
7	Daeng Pijit 2	Red	Red	Red	Daengbangkok seedling selection
8	Daeng Tubtim Siam	Red	Red	Red	Vietnam x Philippine
9	Denkhunwang	Green	Green	White	-
10	Farunghom	Green	Green	Pink	-
11	Fongmeehong	Green	Green	Pink	Taiwan
12	Hongjuanshue	Green	Green	Pink	Taiwan
13	Hongphaoshue	Green	Green	Pink	Taiwan
14	Hongpheehong	Red	Red	Purple	Taiwan
15	Hongta	Green	Green	White	Taiwan
16	Hongxin	Green	Green	Pink	Taiwan
17	Jeeb	Green	Yellow green	White	-
18	Jeensaidang	Green	Green	Pink	-
19	Jernju	Green	Green	White	Taiwan
20	Kaimook	Green	Green	White	Taiwan
21	Kaimook Daeng	Green	Green	Pink	Taiwan
22	Kaimook Taiwan	Green	Green	Pink	Taiwan
23	Kaochowwang	Green	Green	White	-
24	Kaomuangchon	Green	Green	White	-
25	Kaodanchang	Green	Green	White	-
26	Kheenok Srichomphoo	Green	Yellow green	Pink	-
27	Kheenok Bailex	Green	Yellow green	Pink	-
28	Kheenok Indonesia	Green	Yellow green	Pink	-
29	Kheenok Saidaeng#1	Green	Yellow green	Pink	-
30	Kheenok Saidaeng#2	Green	Yellow green	Pink	-
31	Kheenok Saikao	Green	Yellow green	White	-
32	Kimju	Green	Green	White	-
33	Kimju Daeng	Green	Green	Pink	-
34	Luengjordan	Green	Green	White	-
35	Maejo 341	Green	Green	Pink	Rotjana x Paenseethong
36	Maejo 342	Red	Red	Red	Paenseethong x Daengbangkok
37	Maejo 343	Green	Green	White	Wangchomphoo seedling selection
38	Mung	Red	Red	Purple	-
39	Namdokmai	Green	Green	White	-
40	Namnueng	Green	Green	Pink	-
41	Nampet	Green	Green	Pink	-
42	Nigro	Red	Red	Red	-

Table 1 The list of guava cultivars and the color of leaf, peel, and pulp in this study (continue)

No.	Cultivars	Leaf color	Peel color	Pulp color	Origin/Pedigree
43	Paensaidang	Green	Green	Pink	-
44	Paenseethong	Green	Green	White	-
45	Petangthong	Green	Green	Pink	-
46	Petchomphoo	Green	Green	Pink	Taiwan
47	Petlangsuan	Green	Green	White	-
48	Petnamphueng	Green	Green	Pink	-
49	Pijit 1	Green	Green	White	Klomsalee x Porjor 13-10
50	Porjor 13-10	Green	Yellow green	Pink	11-56 lines (Austraria) seedling selection
51	Puenmuang	Green	Green	White	-
52	Putsa	Green	Yellow green	White	-
53	Puyfai	Green	Green	White	-
54	Raimaled	Green	Green	White	Taiwan
55	Rotjana	Green	Green	Pink	Porjor 13-10 x Paenseethong
56	Saleethong	Green	Green	White	-
57	Samkasut	Red	Red	Red	Tubtim Siam mutation
58	Samsikrob	Green	Green	Pink	Paenseethong x Dang Tubtim Siam
59	Searngsuisaikhaw	Green	Green	White	Taiwan
60	Suimee	Green	Green	White	Taiwan
61	Taiwansaidaeng	Green	Green	Pink	Taiwan
62	Tangmo	Green	Green	Pink	Taiwan
63	Thaiboransaidaeng	Green	Green	Pink	-
64	Thainueakao	Green	Green	White	-
65	Wanpirun	Green	Green	White	Paenseethongyak seedling selection
66	Wangchomphoo	Green	Green	White	Paenseethong x Bangkok Apple
67	Wernhong	Green	Green	Pink	Taiwan
68	Yensong	Green	Green	White	Klomsalee x Klomtoonklaow
69	Chilee Daeng	Green	Red	White	-
70	Chilee Lueng	Green	Yellow	Yellow	-

Remark: 1-68 = *P. guajava*, 69-70 = *P. cattleianum*

เก็บข้อมูลลักษณะสีใบ สีผล และสีเนื้อของฝรั่งที่ปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ อายุประมาณ 3 ปี ในปี พ.ศ. 2563-2565 บันทึกลักษณะสีที่ปรากฏ จากนั้นให้คะแนน ลักษณะสีใบ โดยใบสีเขียวให้คะแนนเท่ากับ 1 ใบสีแดงให้คะแนนเท่ากับ 2 ใบด่างให้คะแนนเท่ากับ 3 ลักษณะสีผล โดยผลสีเขียวและเขียวแกมเหลืองให้คะแนนเท่ากับ 1 ผลสีแดงให้คะแนนเท่ากับ 2 ผลด่างให้คะแนนเท่ากับ 3 ลักษณะสีเนื้อ โดยเนื้อสีขาวให้คะแนนเท่ากับ 1 เนื้อสีชมพูให้คะแนนเท่ากับ 2 เนื้อสีแดงให้คะแนนเท่ากับ 3 เนื้อสีม่วงให้คะแนนเท่ากับ 4 จากนั้นวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบไม่อิงพารามิเตอร์ระหว่างสีใบ สีผล และสีเนื้อของฝรั่งในกลุ่ม *P. guajava* โดยใช้สัมประสิทธิ์ครา เมอร์ (Cram'er coefficient, *V*) ด้วยโปรแกรม R version 4.3.1

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเริ่มจากนำใบอ่อนตัวอย่างละประมาณ 0.2 กรัม มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่อง MiniAmp Plus Thermal CyCler (Thermo

Fisher Scientific) โดยใช้เครื่องหมาย SSR ที่มีรายงานก่อนหน้า (Briceño et al., 2010; Kumar et al., 2020; Padmakar et al., 2015) ปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอประมาณ 20 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา บัฟเฟอร์สำเร็จรูป 1 เท่า MyTaq™ Red Mix (BIOLINE, USA) เครื่องหมายดีเอ็นเอความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์ สภาวะที่ใช้ดัดแปลงจาก Padmakar et al. (2015) คือ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จากนั้นทำ 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 3% agarose gel electrophoresis คัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งแสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์ฝรั่ง เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำแถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย SSR ที่ปรากฏในฝรั่ง *P. guajava* จำนวน 132 แถบ บันทึกขนาดของแถบที่ได้จากฝรั่งแต่ละพันธุ์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่า Polymorphic Information Content (PIC) และค่า expected heterozygosity (H_e) ด้วยโปรแกรม MolMarker version 1.0 โดยการวิเคราะห์แบบ Genetic marker สำหรับเครื่องหมาย SSR (Jahnke et al., 2022) ซึ่งค่า PIC แสดงถึงความสามารถในการตรวจพบความแตกต่างของเครื่องหมาย ค่า H_e เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ศึกษา จากนั้นนำแถบดีเอ็นที่ปรากฏทั้งหมดในฝรั่งและชมพู่ที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 173 แถบ มาบันทึกเป็นคะแนนด้วยให้คะแนนการปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1 ส่วนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 0 แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป FreeTree version 0.9.1.50 (Pavlíek, 1999) โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยวิธี Jaccard และสร้างแผนภาพ dendrogram ด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) และแสดงแผนภาพ dendrogram ด้วยโปรแกรม FigTree version 1.4.4 (Rambaut, 2018)

4. การวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะสี

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้เฉพาะแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์มาวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบไม่อิงพารามิเตอร์กับลักษณะสีใบ สีผล และสีเนื้อด้วยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์คราเมอร์ ด้วยโปรแกรม R version 4.3.1 ซึ่งการตั้งชื่อแถบดีเอ็นเอเริ่มต้นด้วยชื่อเครื่องหมายตามด้วยขนาดของแถบ เช่น แถบดีเอ็นเอ mPgCIR08-220 หมายถึงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่องหมาย mPgCIR08 ที่มีขนาด 220 คู่เบส โดยให้การไม่ปรากฏและการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในแต่ละพันธุ์เป็นคะแนน 0 และ 1 ตามลำดับ สีใบที่ประกอบไปด้วย สีเขียว แดง และด่าง ให้คะแนนเป็น 0, 1 และ 2 ตามลำดับ สีผลที่ประกอบด้วย สีเขียวและสีเขียวแกมเหลือง ให้คะแนนเป็น 0 สีแดงเป็น 1 และด่าง เป็น 2 ส่วนสีเนื้อนั้น ให้คะแนนสีขาวเป็น 0 สีชมพูเป็น 1 สีแดงเป็น 2 และสีม่วงเป็น 3

สืบเนื่องจากรายงานการสร้างสีเนื้อเกี่ยวข้องกับยีนจำนวนมาก (polygenes) (Thakre et al., 2023) จึงได้วิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบไม่อิงพารามิเตอร์ระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SSR กับสีเนื้อที่จัดกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไม่มีสี (สีขาว) กับกลุ่มมีสี คือ สีชมพู แดง และม่วง ด้วยการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ฟาย (Phi coefficient) ด้วยโปรแกรม R version 4.3.1 เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สีใบและสีผล คือ สีใบจัดเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สีเขียว (สีเขียวกับด่าง) กับสีแดง สีผลจัดเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สีเขียว (สีเขียว สีเขียวแกมเหลือง และด่าง) กับสีแดง

นำแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะสีใบ สีผล และสีเนื้อ ที่ได้จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละแถบดีเอ็นเอ โดยพิจารณาจากเมทริกซ์ความสับสน ดังที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคในปลา Tilapia (Chen et al., 2021) โดยมีผลลัพธ์จากการทำนาย คือ เนื้อสีขาวจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ส่วนเนื้อมีสีจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขั้นตอนดังแสดงใน **Table 2**

Table 2 Confusion matrix

	Prediction results	
Observed results	**Colorless (0)**	**Color (1)**
Absent (0)	Number of colorless cultivars show absent DNA band (**TN**)	Number of color cultivars show absent DNA band (**FP**)
Present (1)	Number of colorless cultivars show present DNA band (**FN**)	Number of color cultivars show present DNA band (**TP**)

ตารางเมทริกซ์ความสับสนจะใช้เพื่อคำนวณค่าต่าง ๆ ดังนี้

$$\text{ความแม่นยำ (accuracy)} = \frac{TP + TN}{TP+TN+FP+FN} \times 100$$

$$\text{การทำนายผลบวก (Positive Prediction Value ; PPV)} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

$$\text{การทำนายผลลบ (Negative Prediction Value ; NPV)} = \frac{TN}{TN+FN} \times 100$$

นำค่าต่าง ๆ มาประเมินศักยภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับสีใบ สีผล และสีเนื้อ ในการใช้ช่วยคัดเลือกต้นลูกในการปรับปรุงพันธุ์สีเนื้อของฝรั่งต่อไป

5. การตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมาย SSR

การผสมข้ามพันธุ์เพื่อสร้างประชากรสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ฝรั่ง โดยพิจารณาจากลักษณะฟีโนไทป์และลักษณะเด่นต่างๆ เช่น พันธุ์กิมจูและแป้นสีทองเป็นฝรั่งพันธุ์การค้าของประเทศไทย พันธุ์พุทราเป็นฝรั่งที่มีผลเล็กแต่มีผลดกมาก และใบด่างมีลักษณะผลด่าง เป็นต้น จากการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสีของฝรั่งที่จะพบการกระจายตัวของลักษณะสีในประชากร F_1 ที่ได้จากพันธุ์ Kamsari ซึ่งมีลักษณะผลสีเขียวและเนื้อสีชมพู กับพันธุ์ Purple Local ซึ่งมีลักษณะผลสีม่วงและเนื้อสีชมพู (Padmakar et al., 2015) จึงได้คัดเลือกพันธุ์แม่ คือ แตงโมและชมพูพันธุ์ทิพย์ ที่มีผลสีเขียวสีเนื้อเป็นสีชมพู ส่วนพันธุ์พ่อ คือ แดงทับทิมสยามและแดง มีผลสีแดง เนื้อเป็นสีแดงและม่วง มาทำการผสมข้าม เพื่อใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของสีผลและสีเนื้อในฝรั่งไทย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ผสมข้ามทั้งหมด จำนวน 5 คู่ผสม ได้แก่ แป้นสีทอง x พุทรา, ชมพูพันธุ์ทิพย์ x แดง, แตงโม x แดงทับทิมสยาม, แป้นสีทอง x ใบด่าง และแดง x กิมจู การผสมข้ามพันธุ์เริ่มด้วยการตอนดอก (emasculation) ที่ใช้เป็นดอกเพศเมีย ซึ่งจะทำในช่วงบ่ายก่อนผสมข้าม 1 วัน จากนั้นเลือกดอกเพศผู้ที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงที่จะบานในวันต่อมา ใช้ถุงกระดาษเคลือบไขครอบดอกไว้ทั้งเพศเมียและเพศผู้ ในวันรุ่งขึ้น เวลา 06.00-07.00 น. นำพู่กันไปป้ายละอองเกสรเพศผู้ที่แตกแล้วไปแตะบนยอดเกสรเพศเมีย เมื่อผสมเกสรเสร็จแล้ว ให้ใช้ถุงกระดาษเคลือบไขคลุมไว้เหมือนเดิม มัดปากถุงให้แน่น พร้อมกับเขียนป้าย โดยระบุชื่อพ่อและแม่พันธุ์ วันที่ผสม เนื่องจากฝรั่งเป็นพืชที่มีดอกมีทั้งเกสรตัผู้และตัวเมียในดอกเดียวกัน โดยเกสรตัวผู้จำนวนอยู่เหนือเกสรตัวเมีย จึงทำให้ฝรั่งมีอัตร าการผสมตัวเองสูง 95 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งในการตอนดอกเพศเมียอาจไม่สมบูรณ์หรืออุณหภูมิมีผลต่อการแตกของอับละอองเรณู จึงมีความเป็นไปได้ที่การผสมข้ามจะไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นการตรวจสอบยืนยันการผสมข้ามด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีความจำเป็น

เมื่อได้ผลแก่นำเมล็ดมาเพาะ ซึ่งมีเมล็ดโดยเฉลี่ยของ 5 คู่ผสม อยู่ที่ 154.8 เมล็ด จนได้ต้นกล้าอายุประมาณ 30 วัน สุ่มตัวอย่างต้นลูกมาคู่ผสมละ 10 ต้น นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ของฝรั่งในแต่ละคู่ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สภาวะเดียวกันกับข้อ 2

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์

จากการเก็บลักษณะฟีโนไทป์ของฝรั่ง *P. guajava* จำนวน 68 พันธุ์ พบลักษณะสีใบสามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม คือ สีเขียว จำนวน 58 พันธุ์ สีแดง จำนวน 8 พันธุ์ และด่าง จำนวน 2 พันธุ์ **(Figure 1a)** ลักษณะสีผลแบ่งออกได้ 4 กลุ่ม คือ สีเขียว จำนวน 49 พันธุ์ สีเขียวแกมเหลือง จำนวน 9 พันธุ์ สีแดง จำนวน 8 พันธุ์ และด่าง จำนวน 2 พันธุ์ **(Figure 1b)** และลักษณะสีเนื้อสามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม คือ สีขาว จำนวน 29 พันธุ์ สีชมพู จำนวน 31 พันธุ์ สีแดง จำนวน 5 พันธุ์ และสีม่วง จำนวน 3 พันธุ์ **(Figure 1c)** และฝรั่งในกลุ่ม *P. cattleianum* มีผลและเนื้อสีเหลือง จำนวน 1 พันธุ์ และผลสีแดงส่วนเนื้อสีขาว จำนวน 1 พันธุ์ **(Figure 1d)** รายละเอียดของฟีโนไทป์แต่ละพันธุ์แสดงใน **Table 1** เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์คราเมอร์ มีค่าเท่ากับ 1 เฉพาะในสีใบกับสีผลเท่านั้น แสดงว่าสีใบสัมพันธ์กับสีผล ในขณะที่สีใบและสีผลไม่สัมพันธ์กับสีเนื้อ โดยหากสีใบเป็นสีเขียว จะพบว่าสีผลเป็นสีเขียวหรือเขียวอมเหลือง หากใบสีแดงและด่าง ก็จะมีผลเป็นสีแดงและด่างตามลำดับ ในขณะที่หากผลสีเขียวหรือเขียวอมเหลืองจะมีสีเนื้อเป็นสีขาวและชมพู ส่วนผลสีแดงจะมีเนื้อเป็นสีแดงและม่วง โดยฝรั่งที่มีสีเนื้อเป็นสีชมพูและแดง พบว่ามีสารไลโคปีน ฝรั่งเนื้อสีขาวและม่วงจะไม่พบสารไลโคปีน (Thakre et al., 2023; จุฑามาศ และ ธีรนุช, 2566) ส่วนฝรั่งเนื้อสีม่วงคาดว่าจะมีสารแอนโทไซยานินเช่นเดียวกับฝรั่งเนื้อสีม่วงพันธุ์ Thai Maroon ที่ตรวจพบสารแอนโทไซยานิน และไม่พบในฝรั่งที่มีสีชมพู (Flores et al., 2015) ดังนั้นสีผลของฝรั่งจะสามารถทำนายได้จากสีใบ โดยหากใบสีเขียวจะมีผลสีเขียวหรือเขียวอมเหลือง แล้วมีโอกาสมีเนื้อเป็นสีขาวหรือชมพู และมีรายงานว่าฝรั่งที่มีเนื้อสีขาวจะถ่ายทอดแบบยีนด้อย (homozygous recessive) ฝรั่งเนื้อสีชมพูเป็นกลุ่มที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส (Thakre et al., 2023) ส่วนฝรั่งใบสีแดงจะมีผลสีแดงและจะมีโอกาสมีเนื้อเป็นสีแดงหรือสีม่วง ซึ่งหากเป็นสีแดงจะมีสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีน) ส่วนสีม่วงจะมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (แอนโทไซยานิน)

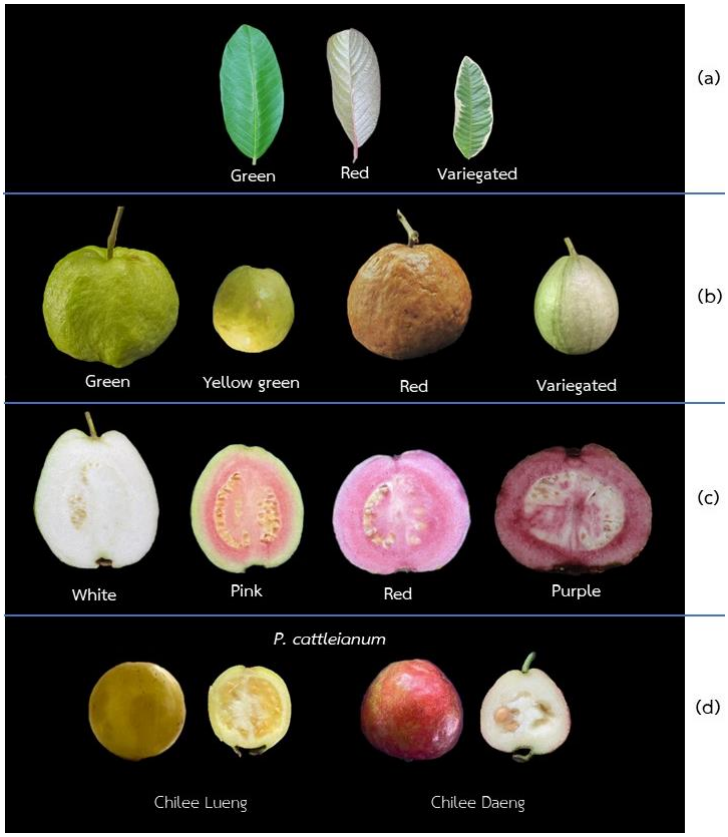

Figure 1 Phenotype of guava (a) classification of leaf color (b) classification of peel color (c) classification of pulp color and (d) *P. cattleianum*

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของฝรั่งด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องหมาย SSR พบแถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมายจำนวน 50 เครื่องหมาย **(Table 3)** ในฝรั่ง *P. guajava* จำนวน 68 พันธุ์ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละเครื่องหมายมีตั้งแต่ 1-5 แถบ โดยเครื่องหมายให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 1 แถบ ได้แก่ mPgCIR161 ในขณะเดียวกันเครื่องหมายให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 5 แถบ คือ mPgCIR34 ซึ่งบางเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ในการศึกษานี้เกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าการศึกษาอื่น อาจเนื่องมาจากการศึกษาในครั้งนี้สนใจเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่พบในฝรั่ง *P. guajava* เท่านั้น ในขณะที่การศึกษาอื่น ใช้ตัวอย่างพันธุ์ฝรั่งหลายสปีชีส์ ได้แก่ *P. quadrangularis*, *P. cattleianum* และ *P. chinensis* (Kherwer et al., 2018) *P. guineense*, *P. friedrichsthalianum* และ *P. sartorianum* (Sitther et al., 2014) และ *P. guajava*, *P. cattleianum*, *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Mehmood et al., 2016) โดยหากพิจารณาผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของฝรั่งทั้งหมด 70 สายพันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ *P. cattleianum* จำนวน 14 แถบ จากเครื่องหมาย mPgCIR02, mPgCIR05, mPgCIR13, mPgCIR16, mPgCIR34, mPgCIR36, mPgCIR99, mPgCIR111, mPgCIR161, mPgCIR171, mPgCIR180, mPgCIR183, mPgCIR350 และ mPgCIR418 เครื่องหมายละ 1 แถบ ซึ่งจะสามารถใช้เครื่องหมายเหล่านี้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งในกลุ่ม *P. cattleianum* ได้

นอกจากนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นทั้งหมดมีจำนวน 132 แถบ มีขนาดประมาณ 100-300 คู่เบส (bp) มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic DNA band) จำนวน 124 แถบ คิดเป็น 93.94 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่าง (monomorphic DNA band) มีจำนวน 8 แถบ คิดเป็น 6.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ค่า PIC ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภท co-dominance จะให้ค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.00-0.67 ซึ่งเครื่องหมายที่มีค่า PIC ต่ำสุดและสูงสุด คือ mPgCIR161 และ mPgCIR132 ตามลำดับ โดยมีค่า PIC เฉลี่ย 0.31 แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องหมายที่มีค่า PIC มากกว่า 0.5 ได้แก่ เครื่องหมาย mPgCIR32, mPgCIR132, mPgCIR139, mPgCIR150, mPgCIR383 และ mPgCIR446 จะเป็นเครื่องหมายที่สามารถนำไปจำแนกพันธุ์ฝรั่งได้ (Serrote et al., 2020) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ค่า H_e พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-0.72 ซึ่งเครื่องหมายที่มีค่า H_e ต่ำสุดและสูงสุด คือ mPgCIR161 และ mPgCIR132 ตามลำดับ โดยมีค่า H_e เฉลี่ย 0.37 **(Table 3)** ซึ่งบ่งชี้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งที่ใช้ในการศึกษา

จากการศึกษานี้ เครื่องหมาย mPgCIR161 มีค่า PIC และ H_e เป็น 0 เป็นเครื่องหมายที่ไม่แสดงความแตกต่างจึงไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกพันธ์ฝรั่งได้ ในขณะที่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งอื่นๆ จะมีค่า H ที่หลากหลายขึ้นกับสายพันธุ์ที่ใช่ในการศึกษา (Kumar et al., 2020; Naga Chaithanya et al., 2017) โดยข้อมูลแถบดีเอ็นเอเหล่านี้จะนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะสีของฝรั่ง และการตรวจสอบฝรั่งลูกผสมต่อไป

Table 3 Polymorphic DNA band, H_E and PIC of SSR markers in 68 *P. guajava* cultivars

No.	Markers	Total DNA bands	Polymorphic bands	Size (bp)	H_e	PIC
1	mPgCIR02	2	2	210-250	0.30	0.26
2	mPgCIR05	3	3	200-290	0.20	0.19
3	mPgCIR08	3	3	210-290	0.45	0.36
4	mPgCIR09	3	3	160-190	0.49	0.39
5	mPgCIR13	3	3	130-180	0.24	0.22
6	mPgCIR16	2	2	190-210	0.32	0.27
7	mPgCIR18	3	3	190-220	0.35	0.32
8	mPgCIR19	2	2	190-210	0.50	0.37
9	mPgCIR25	2	2	180-200	0.42	0.33
10	mPgCIR26	3	3	190-270	0.34	0.29
11	mPgCIR27	4	4	110-300	0.27	0.25
12	mPgCIR29	2	1	180-200	0.34	0.28
13	mPgCIR32	3	3	90-120	0.62	0.55
14	mPgCIR34	5	5	100-170	0.47	0.44
15	mPgCIR36	2	1	170-180	0.17	0.16
16	mPgCIR41	3	3	160-180	0.41	0.34
17	mPgCIR48	3	3	100-120	0.27	0.25
18	mPgCIR91	2	2	100-130	0.25	0.18
19	mPgCIR93	3	3	110-170	0.53	0.45
20	mPgCIR94	2	2	150-160	0.10	0.09
21	mPgCIR98	3	3	130-150	0.27	0.25
22	mPgCIR99	2	2	200-210	0.20	0.18
23	mPgCIR102	2	2	190-250	0.42	0.33
24	mPgCIR105	2	1	150-180	0.33	0.27
25	mPgCIR111	3	3	110-160	0.50	0.39
26	mPgCIR113	3	3	160-200	0.31	0.28
27	mPgCIR132	4	4	80-160	0.72	0.67
28	mPgCIR138	3	3	110-160	0.26	0.23
29	mPgCIR139	3	3	200-280	0.66	0.59
30	mPgCIR150	4	4	110-180	0.59	0.52
31	mPgCIR153	4	4	140-190	0.51	0.42
32	mPgCIR160	2	2	130-160	0.37	0.31
33	mPgCIR161	1	0	280	0.00	0.00
34	mPgCIR165	3	3	120-190	0.51	0.39
35	mPgCIR166	2	2	150-190	0.12	0.12

Table 3 Polymorphic DNA band, H_E and PIC of SSR markers in 68 *P. guajava* cultivars (continue)

No.	Markers	Total DNA bands	Polymorphic bands	Size (bp)	H_e	PIC
36	mPgCIR171	2	2	160-200	0.42	0.33
37	mPgCIR173	2	2	290-300	0.27	0.23
38	mPgCIR179	2	1	180-200	0.14	0.13
39	mPgCIR180	2	2	130-150	0.42	0.33
40	mPgCIR183	2	2	170-190	0.37	0.30
41	mPgCIR188	2	1	190-200	0.10	0.09
42	mPgCIR194	2	2	160-190	0.51	0.40
43	mPgCIR277	4	4	180-210	0.51	0.40
44	mPgCIR350	2	2	190-200	0.27	0.23
45	mPgCIR383	4	4	150-210	0.63	0.55
46	mPgCIR404	2	1	160-210	0.03	0.03
47	mPgCIR414	3	3	180-230	0.58	0.49
48	mPgCIR418	2	1	250-290	0.28	0.24
49	mPgCIR446	3	3	140-200	0.59	0.52
50	Guv 2-43	2	2	210-250	0.46	0.35
	Total	132	124		0.37	0.31

Remark: mPgCIR02-mPgCIR446 from Padmakar et al. (2015) except mPgCIR277 from Briceño et al. (2010) and GUV 2-43 originated from Kumar et al. (2020)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างฝรั่งและชมพู่รวมเป็น 70 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 50 เครื่องหมาย จำนวน 173 แถบ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฝรั่ง สร้างเป็นแผนภาพ dendrogram และคำนวณค่าดัชนีความเหมือน พบว่า สามารถแยกกลุ่มฝรั่ง *P. guajava* ออกจาก *P. cattleianum* และชมพู่ได้ โดยชมพู่ทั้ง 2 พันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนกับฝรั่งจำนวน 68 พันธุ์ ในช่วง 0.07-0.14 ส่วนฝรั่งชิลีแดงและชิลีเหลือง (*P. cattleianum*) มีค่าดัชนีความเหมือนกับฝรั่งกลุ่ม *P. guajava* อีก 68 พันธุ์ ในช่วง 0.26-0.48 ซึ่งฝรั่ง *P. guajava* จำนวน 68 พันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.30-0.99 โดยฝรั่งพันธุ์บางกอกแอปเปิลกับบิวมองต์ (แดงฮาวาย) และไต้หวันไส้แดงกับขี้นกสีชมพู มีค่าดัชนีความเหมือนต่ำสุด คือ 0.30 ส่วนไต้หวันไส้แดงกับหงเป่าสือ มีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุด คือ 0.99 (Supplement data) จากแผนภาพ dendrogram (Figure 2) สามารถจัดกลุ่มฝรั่ง *P. guajava* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Cluster I และ Cluster II) แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้ 8 กลุ่ม โดยเป็นกลุ่มที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน (clade/เคลด) 6 กลุ่ม ได้แก่

เคลด I มีจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ บิวมองต์ (แดงฮาวาย), พจ 13-10 และขี้นกไส้แดงเบอร์ 2

เคลด II มีจำนวน 3 พันธุ์ คือ ขี้นกไส้แดงเบอร์ 1, ขี้นกไส้ขาว และพุทรา

เคลด III มีจำนวน 3 พันธุ์ คือ จีบ, ขี้นกใบเล็ก และขี้นกสีชมพู

เคลด IV มีจำนวน 3 พันธุ์ คือ ขี้นกอินโดนีเซีย, พื้นเมือง และขาวเมืองชล

เคลด V มีจำนวน 23 พันธุ์ คือ หงเป่าสือ, ไต้หวันไส้แดง, หงจวนซือ, กิมจูแดง, จีนไส้แดง, เซียงซุยไส้ขาว, ไข่มุกแดง, น้ำหนึ่ง, ฟงมี่หงส์, น้ำเพชร, นิโกร, ไข่มุก, เจินจู, ไข่มุกไต้หวัน, เหวินหง, หงซิน, เพชรอ่างทอง, ชมพูพันธุ์ทิพย์, แตงโม, เด่นขุนวัง, ไร้เมล็ด, ขาวชาววัง และฮ่องเต้

เคลด VI มีจำนวน 31 พันธุ์ คือ สาลี่ทอง, สุ่ยมี่, กิมจู, เย็น 2, ขาวด่านช้าง, ไทยเนื้อขาว, เพชรหลังสวน, พิจิตร 1, หวานพิรุณ, แป้นสีทอง, ปุยฝ้าย, วังชมภู, บางกอกแอปเปิล, แดงพิจิตร 2, แม่โจ้ 341, แดงทับทิมสยาม, หงปี่หงษ์, เพชรน้ำผึ้ง, รจนา, แม่โจ้ 342, แม่โจ้ 343, แป้นไส้แดง, ไทยโบราณไส้แดง, เพชรชมพู, สามสีกรอบ, ม่วง, แดง, ฉานจิน, น้ำดอกไม้, ฝรั่งหอม และสามกษัตริย์

และพันธุ์ที่แยกกลุ่ม (outgroup) 2 พันธุ์ คือ เหลืองจอร์แดน (outgroup-1) และใบด่าง (outgroup-2) ซึ่งผลการจัดกลุ่มเป็นเช่นเดียวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งที่รวบรวมในประเทศอินเดีย จำนวน 40 พันธุ์ ที่สามารถจัดกลุ่มฝรั่งกลุ่ม *P. guajava* ออกจาก *Psidium* ssp. อื่นๆ ได้ และในส่วนฝรั่ง *P. guajava* จัดกลุ่มได้ 5 เคลด และมีบางตัวอย่างเป็นพันธุ์นอกกลุ่ม (outgroup) เช่นเดียวกัน (Kumar et al., 2020)

ฝรั่งในเคลด I เป็นกลุ่มของฝรั่งที่ใช้ในการคั้นน้ำ โดยพบว่าฝรั่งพันธุ์พจ 13-10 คัดเลือกจากต้นจากการเพาะจากเมล็ดของฝรั่งพันธุ์ 11-56 ของประเทศออสเตรเลีย ซึ่งคัดเลือกมาจากต้นที่ได้จากเพาะด้วยเมล็ดของพันธุ์บิวมองต์ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช, 2566) จึงอาจจะอนุมานได้ว่าฝรั่งพันธุ์บิวมองต์เป็นบรรพบุรุษของฝรั่งพันธุ์พจ 13-10

ฝรั่งในเคลด II คือ ขี้นกไส้ขาวและขี้นกไส้แดง ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันสอดคล้องกับรายงานของ จินตนา และคณะ (2560) เนื่องจากลักษณะรูปร่างใบและผลมีความใกล้เคียงกันมาก ยกเว้นลักษณะสีเนื้อและสีไส้เท่านั้น ส่วนฝรั่งในเคลด III คือ พันธุ์จีบและขี้นกใบเล็ก พิจารณาลักษณะฟีโนไทป์ พบว่า มีลักษณะสีใบ และรูปร่างใบเหมือนกันมาก ฝรั่งพันธุ์ขี้นกใบเล็กมีใบขนาดใหญ่กว่าฝรั่งพันธุ์จีบ หากไม่นำมาวางเปรียบเทียบกัน จะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของทั้งสองพันธุ์ได้ด้วยสายตา **(Figure 3)** ซึ่งจากค่าดัชนีความเหมือน 0.67 ของ 2 พันธุ์ (Supplement data) แสดงความแตกต่างมากกว่าการเปรียบเทียบด้วยลักษณะฟีโนไทป์ โดยพบเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถระบุความแตกต่างของฝรั่งทั้งสองพันธุ์ได้ 20 เครื่องหมาย ตัวอย่างเช่น เครื่องหมาย mPgCIR132, mPgCIR139, mPgCIR150 และ mPgCIR446 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีค่า PIC มากกว่า 0.5 เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอมีคุณสมบัติเด่น คือ สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์พืชที่โดยไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง อีกทั้งตรวจสอบได้โดยใช้ส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช (อรรัตน์, 2548) โดยไม่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์

เคลด V มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.45-093 ส่วนใหญ่เป็นฝรั่งที่มีเนื้อเป็นสีชมพูและสีแดง มีเพียง 7 พันธุ์ มีเนื้อสีขาว ได้แก่ เซียงซุยไส้ขาว, ไข่มุก, เจินจู, เด่นขุนวัง, ไร้เมล็ด, ขาวชาววัง และฮ่องเต้ ซึ่งฝรั่งพันธุ์เด่นขุนวังและไร้เมล็ดเป็นฝรั่งที่ไม่มีเมล็ดเหมือนกัน จัดอยู่ในขั้ว (node) เดียวกัน ส่วนฝรั่งในเคลด VI เป็นเคลดใหญ่ มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.43-0.96 ส่วนมากเป็นฝรั่งพันธุ์การค้า ที่อาจจะได้มาจากการคัดเลือกพันธุ์ หรือใช้เป็นพ่อหรือแม่ในการผสมข้ามของพันธุ์ในกลุ่มเดียวกัน จึงทำให้พันธุ์ฝรั่งเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น พันธุ์แม่โจ้ 343 เป็นฝรั่งที่ได้จากการปลูกคัดเลือกจากต้นเพาะเมล็ดของฝรั่งพันธุ์วังชมภู ส่วนพันธุ์แม่โจ้ 341 เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์รจนาและแป้นสีทอง (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช, 2566)

การจัดจำแนกกลุ่มจะทำให้ทราบความสัมพันธ์ของฝรั่งพันธุ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพันธุ์ที่ไม่ทราบประวัติที่ชัดเจน เป็นข้อมูลให้นักปรับปรุงพันธุ์นำไปใช้คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการผสมข้ามได้ตรงความต้องการ เช่น หากต้องการผสมพันธุ์ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้กัน ก็ควรเลือกพ่อแม่ในกลุ่มเดียวกัน หากต้องการความดีเด่นเหนือพ่อแม่ ก็ควรเลือกใช้พันธุ์ที่ต่างกลุ่มกัน หรือพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง

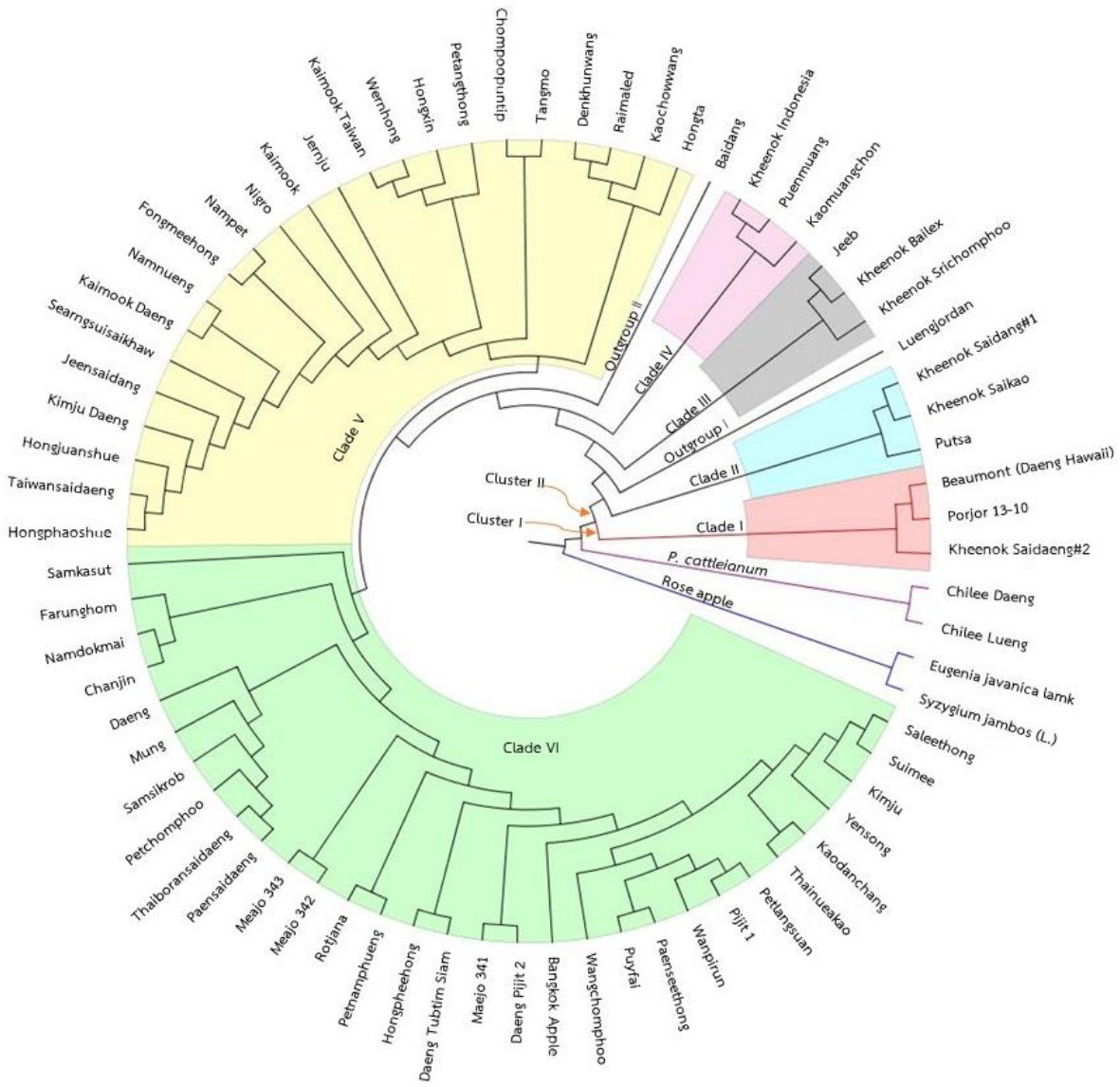

Figure 2 Genetic relationship among 68 *P. guajava* cultivars, 2 *P. cattleianum* cultivars and 2 rose apple generated from 50 SSR markers

Figure 3 Phenotype of guava leaf (a) Kheenok-Bailex and (b) Jeeb

4. การวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะสีของฝรั่ง

นำแถบดีเอ็นเอจำนวน 132 แถบ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 50 เครื่องหมาย กับแถบดีเอ็นเอฝรั่งกลุ่ม *P.guajava* จำนวน 68 พันธุ์ มาวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์แบบไม่อิงพารามิเตอร์กับสีใบ/สีผล เนื่องจากสีใบและสีผลมีความสัมพันธ์กัน 100 เปอร์เซ็นต์ และกับสีเนื้อ ในกรณีที่จัดกลุ่มสีมากกว่า 2 กลุ่ม จะวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์คราเมอร์ (Cram'er coefficient, *V*) และในกรณีที่จัดกลุ่มสีเป็น 2 กลุ่ม จะวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ฟาย (Phi coefficient)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอกับสีใบ/สีผล ที่จัดกลุ่มสีเขียว สีแดง และด่าง พบความเชื่อมโยงกับแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ได้แก่ mPgCIR111-160, mPgCIR150-110 และ mPgCIR446-140 เป็นแถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย mPgCIR111, mPgCIR150 และ mPgCIR446 ตามลำดับ มีค่า Cram'er coefficient เป็น 0.48, 0.44 และ 0.40 ตามลำดับ โดยที่แถบ mPgCIR111-160 จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในฝรั่งที่มีใบ/ผลสีเขียวและด่างเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แถบ mPgCIR446-140 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในฝรั่งที่ใบ/ผลสีแดงเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า Cram'er coefficient และ Phi coefficient ทั้ง 2 แถบดีเอ็นเอไปในทางเดียวกัน ในขณะที่เครื่องหมาย mPgCIR150-110 นั้น จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในฝรั่งที่มีใบ/ผลสีเขียวและด่าง 88.76 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในฝรั่งที่มีใบ/ผลสีแดง 75 เปอร์เซ็นต์ จึงมีค่า Cram'er coefficient เป็น 0.44 เมื่อคำนวณค่า Phi coefficient ในฝรั่งกลุ่มสีใบ/ผลสีเขียวและด่างกับกลุ่มฝรั่งสีใบ/ผลสีแดง จึงมีค่าเป็น -0.42 เนื่องจากการเกิดแถบจะปรากฏในสีเขียว/ด่าง ในขณะที่เครื่องหมาย mPgCIR111-160 และ mPgCIR446-140 จะไม่ปรากฏแถบในกลุ่มสีเขียว/ด่าง **(Table 4)**

Table 4 Correlation analysis of *P. guava* leaf and peel color

DNA bands	Band appearance	Cram'er method			Phi method	
		Green (58 cultivars)	Variegated (2 cultivars)	Red (8 cultivars)	Green/Variegated (60 cultivars	Red (8 cultivars)
mPgCIR111-160	Absent	58 (100%)	2 (100%)	6 (75%)	60 (100%)	6 (75%)
	Present	0 (0%)	0 (0%)	2 (25%)	0 (0%)	2 (25%)
	Coefficient	**0.48**			**0.48**	
mPgCIR150-110	Absent	10 (17.24%)	1 (50%)	6 (75%)	11 (18.33%)	6 (75%)
	Present	48 (82.76%)	1 (50%)	2 (25%)	49 (81.67%)	2 (25%)
	Coefficient	**0.44**			**-0.42**	
mPgCIR446-140	Absent	33 (56.90%)	2 (100%)	0 (0%)	35 (58.33%)	0 (0%)
	Present	25 (43.10%)	0 (0%)	8 (100%)	25 (41.67%)	8 (100%)
	Coefficient	**0.40**			**0.38**	

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอกับสีเนื้อที่แบ่งกลุ่มเป็นสีขาว ชมพู แดงและม่วง พบความเชื่อมโยงกับแถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 แถบ ได้แก่ mPgCIR446-140, mPgCIR160-160 และ mPgCIR153-150 เป็นแถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย mPgCIR446, mPgCIR160 และ mPgCIR153 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า Cram'er Coefficient เป็น 0.63, 0.59 และ 0.53 ตามลำดับ โดยที่แถบดีเอ็นเอ mPgCIR446-140 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในฝรั่งเนื้อสีแดงและม่วง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แถบดีเอ็นเอ mPgCIR160-160 จะไม่ปรากฏแถบในฝรั่งเนื้อสีขาว 93.10 เปอร์เซ็นต์ และแถบดีเอ็นเอ mPgCIR153-150 จะปรากฏแถบในฝรั่งเนื้อสีชมพู 90.32 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการวิเคราะห์ค่า Phi co-efficient ฝรั่งกลุ่มเนื้อสีขาว (ไม่มีสี) กับกลุ่มมีสี พบว่า mPgCIR160-160 ไม่ปรากฏแถบในกลุ่มเนื้อสีขาว 93.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน mPgCIR153-150 จะปรากฏแถบในฝรั่งกลุ่มเนื้อมีสี 87.18 เปอร์เซ็นต์ **(Table 5)**

เมื่อนำข้อมูลวิเคราะห์มาคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับสีใบ/ผล พบว่าเครื่องหมาย mPgCIR111 ที่มี 3 อัลลีล โดยการไม่ปรากฏแถบขนาด 160 คู่เบสสัมพันธ์กับสีใบ/ผล **(Figure 4a)** ส่วนเครื่องหมาย mPgCIR150 มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ หรือ 4 อัลลีล ที่มีขนาด 110, 120, 130 และ 180 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งอัลลีลขนาด 110 คู่เบส สัมพันธ์กับใบสีเขียว/ผลสีเขียว 82.76 เปอร์เซ็นต์ **(Table 5 และ Figure 4b)** เครื่องหมาย mPgCIR446 มี 3 อัลลีล ที่มีขนาด 140, 170 และ 200 คู่เบส ซึ่งอัลลีลขนาด 140 คู่เบส สัมพันธ์กับใบสีแดง/ผลสีแดง 100 เปอร์เซ็นต์ **(Table 5 และ Figure 4e)**

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับสีเนื้อ พบว่า เครื่องหมาย mPgCIR446 อัลลีล 140 คู่เบส สัมพันธ์กับเนื้อสีแดงและม่วง 100 เปอร์เซ็นต์ **(Table 5 และ Figure 4e)** และเครื่องหมาย mPgCIR153 ที่มี 4 อัลลีล ขนาด 140, 150, 160 และ 190 คู่เบส โดยที่อัลลีล 150 คู่เบส สัมพันธ์กับสีเนื้อสีชมพู 90.32 เปอร์เซ็นต์ **(Table 5 และ Figure 4c)** ส่วนเครื่องหมาย mPgCIR160 ที่มี 2 อัลลีล โดยการไม่ปรากฏแถบขนาด 160 คู่เบสสัมพันธ์กับเนื้อสีครีม **(Table 5 และ Figure 4d)**

โดยหากใช้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป็นเกณฑ์เช่นเดียวกับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR กับลักษณะสีเนื้อจากแหล่งรวมรวมพันธุ์ฝรั่งในประเทศเม็กซิโก (Campos et al., 2017) พบว่าเครื่องหมาย mPgCIR150 สัมพันธ์กับใบหรือผลสีเขียว เครื่องหมาย mPgCIR153 สัมพันธ์กับเนื้อสีชมพู และ mPgCIR446 สัมพันธ์กับใบ/ผลสีแดง และเนื้อสีแดงและม่วง ซึ่งเครื่องหมาย mPgCIR446 ที่ตำแหน่ง 96.96 cM ยึดกับเครื่องหมาย mPgCIR246 ที่ตำแหน่ง 119.15 cM ของ qARI-5-1 ที่เป็น QTL ที่สัมพันธ์กับสีใบ จากการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินของประชากร F_1 ของคู่ผสมฝรั่ง Purple guava ที่มีแอนโทไซยานินสูงกับฝรั่ง Allahabad Safeda ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำ (Sohi et al., 2022)

Table 5 Correlation analysis of *P. guava* pulp color

DNA bands	Band appearance	Cram'er method				Phi method	
		White (29 cultivars)	Pink (31 cultivars)	Red (5 cultivars)	Purple (3 cultivars)	White (29 cultivars)	Color (39 cultivars)
mPgCIR446-140	Absent	25 (82.21%)	10 (32.26%)	0 (0%)	0 (0%)	25 (82.21%)	10 (25.64%)
	Present	4 (13.79%)	21 (67.74%)	5 (100%)	3 (100%)	4 (13.79%)	29 (74.36%)
	Coefficient	**0.63**				**0.60**	
mPgCIR160-160	Absent	27 (93.10%)	13 (41.94%)	1 (20%)	1 (33.33%)	27 (93.10%)	15 (38.46%)
	Present	2 (6.90%)	18 (58.06%)	4 (80%)	2 (66.67%)	2 (6.90%)	24 (61.54%)
	Coefficient	**0.59**				**0.56**	
mPgCIR153-150	Absent	18 (62.07%)	3 (9.68%)	1 (20%)	1 (33.33%)	18 (62.07%)	5 (12.82%)
	Present	11 (37.93%)	28 (90.32%)	4 (80%)	2 (66.67%)	11 (37.93%)	34 (87.18%)
	Coefficient	**0.53**				**0.51**	

KHON KAEN AGRICULTURE JOURNAL 52 (1): 52-74 (2024)./doi:10.14456/kaj2024.xx.

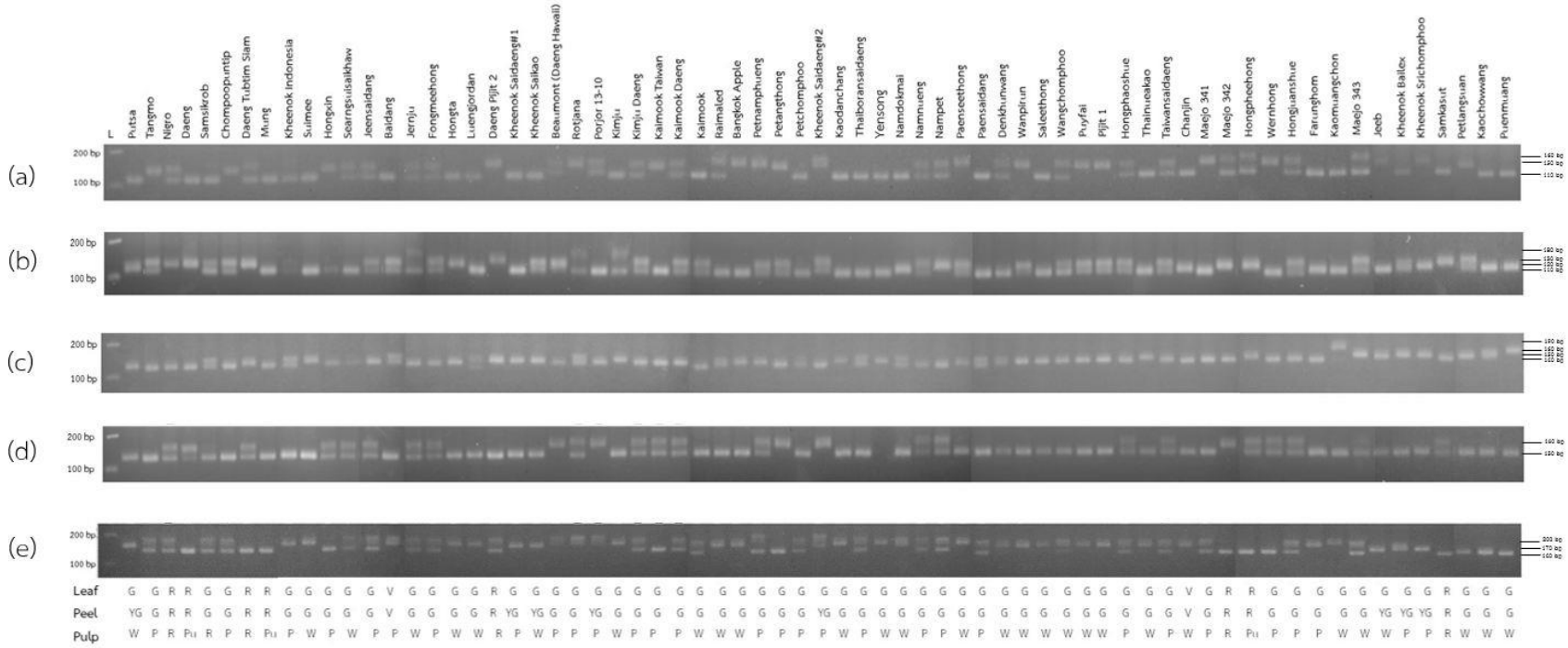

Figure 4 DNA amplification of 68 guava cultivar that relative with leaf/peel and pulp color (a) mPgCIR111 (b) mPgCIR150 (c) mPgCIR153 (d) mPgCIR160 and (e) mPgCIR446

Remark: G = green, V = variegated, R = red, Yg = yellow green, W = white, P = pink, Pu = Purple and Y = yellow color

จากนั้นนำข้อมูลการปรากฏ/ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายที่แสดงความสัมพันธ์กับสีใบ/ผล และสีเนื้อ มาประเมินประสิทธิภาพด้วยเมทริกซ์ความสับสนในลักษณะสีใบ/ผล พบแถบดีเอ็นเอ mPgCIR111-100 มีค่าความแม่นยำสูงสุด คือ 91 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการทำนายผลลบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แถบดีเอ็นเอ mPgCIR446-140 มีค่าการทำนายผลบวก 100 เปอร์เซ็นต์ **(Table 6)** ดังนั้นหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะสีใบ/ผล จึงควรใช้การไม่ปรากฏของแถบ mPgCIR111-160 ในฝรั่งกลุ่มสีใบ/ผลสีเขียวร่วมกับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ mPgCIR446-140 ในฝรั่งกลุ่มสีสีใบ/ผลสีแดง ที่จะทำให้ความถูกต้องเพิ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

ในลักษณะสีเนื้อ แถบดีเอ็นเอ mPgCIR446-140 มีค่าความแม่นยำสูงสุดคือ 79 เปอร์เซ็นต์ แถบดีเอ็นเอ mPgCIR160-160 มีค่าการทำนายผลลบสูงสุด คือ 93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแถบดีเอ็นเอ mPgCIR153-150 ค่าการทำนายผลบวกสูงสุด คือ 87 เปอร์เซ็นต์ **(Table 6)** ซึ่งหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะสีเนื้อ จึงควรใช้การไม่ปรากฏแถบ mPgCIR160-160 ในฝรั่งกลุ่มเนื้อสีขาวรวมกับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ mPgCIR153-150 ในฝรั่งกลุ่มเนื้อมีสีที่จะทำให้ความถูกต้องจากการคัดเลือกเพิ่มเป็น 90 เปอร์เซ็นต์จากเดิม 79 เปอร์เซ็นต์

Table 6 Confusion matrix analysis

DNA bands	Band appearance	Green/ White	Red/ Color	Accuracy	Positive Prediction Value (PPV)	Negative Prediction Value (NPV)
Leaf/Peel color						
mPgCIR111-160	Absent	**60**	6	91	25%	100%
	Present	0	**2**			
mPgCIR150-110	Present	**49**	2	81	75%	82%
	Absent	11	**6**			
mPgCIR446-140	Absent	**35**	0	63	100%	58%
	Present	25	**8**			
Pulp color						
mPgCIR446-140	Absent	**25**	10	79	74%	86%
	Present	4	**29**			
mPgCIR160-160	Absent	**27**	15	75	62%	93%
	Present	2	**24**			
mPgCIR153-150	Absent	**18**	5	76	87%	62%
	Present	11	**34**			

Remark: The number of correctly assigned cultivars is indicated in bold.

ซึ่งจากการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะใบสีแดงในฝรั่งโดยการผสมข้ามใบสีแดง (พันธุ์แดงสยาม) กับใบสีเขียว (พันธุ์แป้นสีทอง) และใบสีเขียว (พันธุ์ขี้นกแคระ) กับใบสีแดง (พันธุ์ฟิลิปปินส์) พบว่า ลูก F_1 มีสีเขียวทั้งหมด (สุเมธ, 2548) และการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสีใบเพิ่มเติมในประชากรรุ่น F_1, F_2 และ BC_1 ระหว่างฝรั่งใบสีเขียวและสีแดง รายงานยีนที่ควบคุมลักษณะใบเขียวเป็นลักษณะเด่น (วรพล, 2562) โดยผลการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของฝรั่งในกลุ่ม *P. guajava* นี้ พบว่าลักษณะสีใบจะเชื่อมโยงกับลักษณะสีผล กล่าวคือ ใบสีเขียวจะมีผลสีเขียว ใบสีแดงจะมีผลสีแดง และใบด่างก็พบว่ามีผลด่างเช่นเดียวกัน แสดงว่าลักษณะผลสีเขียวก็น่าจะเป็นลักษณะเด่นเช่นเดียวกัน อีกทั้งทำให้สามารถคัดเลือกสีผลจากลักษณะสีใบในระยะกล้า แต่อย่างไรก็ตาม

หากต้องการคัดเลือกจากเมล็ดหรือต้นอ่อนที่ยังไม่แสดงสีใบชัดเจน สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกลักษณะสีผล เนื่องจากสีใบจะแสดงชัดเจนในต้นกล้าอายุประมาณ 45 วันขึ้นไป

ส่วนสีเนื้อของฝรั่งนั้นทำได้เพียงคาดคะเนจากสีผล ไม่สามารถคัดเลือกได้จากสีใบ/ผล โดยผลสีเขียวจะมีสีเนื้อ 2 สี คือ สีขาวและสีชมพู ส่วนผลสีแดงจะมีสีเนื้อ 2 สี คือ สีแดงและสีม่วง ที่เป็นผลมาจากการสะสมของสารไลโคปีนและแอนโทไซยานิน การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของสีเนื้อ พบว่า ฝรั่งเนื้อสีขาวเป็นการทำงานแบบยีนด้อย ส่วนเนื้อสีชมพูเป็นเฮเทอโรไซกัส (Thakre et al., 2023) ปัจจุบันมีการค้นพบเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่สัมพันธ์กับเนื้อฝรั่งสีครีม คือ เครื่องหมาย mPgCIR161 ที่ได้จากการศึกษาฝรั่งที่เก็บรวบรวมในประเทศเม็กซิโก จำนวน 70 พันธุ์ โดยผลการศึกษานี้พบความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR กับสีเนื้อกลุ่มสีชมพู แดง และม่วง คือ เครื่องหมาย mPgCIR153 สัมพันธ์กับเนื้อสีชมพู และเครื่องหมาย mPgCIR446 สัมพันธ์กับเนื้อสีแดงและม่วง ที่นับเป็นรายงานแรก โดยลักษณะสีเนื้อเป็นลักษณะที่ไม่สามารถคัดเลือกได้จากระยะต้นกล้า ในการคัดเลือกจะต้องทำการปลูกจนฝรั่งให้ผลผลิตจะต้องอาศัยระยะเวลา อีกทั้งใช้พื้นที่และงบประมาณในการปลูกคัดเลือกอีกด้วย ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถนำไปใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกสีเนื้อของฝรั่งลูกผสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

5. การตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมาย SSR

จากการผสมข้ามพันธุ์ฝรั่งจำนวน 5 คู่ผสม โดยส่วนใหญ่จะเป็นการผสมข้ามกลุ่ม ยกเว้นคู่ผสมที่ 5 เป็นการผสมข้ามภายในเคลดเดียวกัน **(Table 7)**

Table 7 List of guava F_1 hybrids from cross pollination and their verifying DNA markers

No.	Cross pollination (Peel/Pulp color)	Cluster of genetic relationship	DNA markers
1	Paenseethong x Putsa (green/white) (green/white)	clade VI X clade I	mPgCIR08, mPgCIR91, mPgCIR93, mPgCIR102
2	Chompoopuntip x Daeng (green/pink) (red/purple)	clade V X clade VI	mPgCIR05, mPgCIR09, mPgCIR16, mPgCIR20, mPgCIR26, mPgCIR32
3	Tangmo x Daeng Tubtim Siam (green/pink) (red/red)	clade V X clade VI	mPgCIR09, mPgCIR20, mPgCIR26, mPgCIR32
4	Paenseethong x Baidang (green/white) (variegated/pink)	clade VI X clade IV	mPgCIR08, mPgCIR91, mPgCIR111
5	Daeng x Kimju (red/purple) (green/white)	clade VI X clade VI	mPgCIR16, mPgCIR33

คัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการตรวจสอบฝรั่งลูกผสม และได้คัดเลือกเครื่องหมาย จำนวน 2-6 เครื่องหมาย มาใช้ตรวจสอบลูกผสม โดยคู่ผสมที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสูงสุด คือ ชมพูพันธุ์ทิพย์ x แดง จำนวน 6 เครื่องหมาย และคู่ผสมที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ แดง x กิมจู จำนวน 2 เครื่องหมาย โดยจากการตรวจสอบฝรั่งลูกผสมของคู่ผสมแป้นสีทอง x พุทรา ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่าต้นลูกทั้ง 10 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งแม่และพ่อ ทั้ง 4 เครื่องหมาย คือ mPgCIR08, mPgCIR91, mPgCIR93 และ mPgCI102 ที่ใช้ในการตรวจ **(Figure 5a)** ผลการตรวจสอบฝรั่งลูกผสมของคู่ผสมแตงโม x แดงทับทิมสยาม ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่าต้นลูกทั้ง 10 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งแม่และพ่อ จำนวน 1 เครื่องหมาย คือ mPgCIR20 ส่วนอีก 3 เครื่องหมาย คือ mPgCIR09, mPgCIR26 และ mPgCIR32 มีต้นลูกแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แบบ คือ เหมือนทั้งแม่และพ่อ และแถบดีเอ็นเอเหมือนพ่อ **(Figure 5b)** ผลการตรวจสอบคู่ผสมชมพูพันธุ์ทิพย์ x แดง ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่าต้นลูกทั้ง 10 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอ

เหมือนทั้งแม่และพ่อ จำนวน 4 เครื่องหมาย คือ mPgCIR16, mPgCIR20, mPgCIR26 และ mPgCI32 ส่วนเครื่องหมาย mPgCIR05 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพ่อ ในขณะที่เครื่องหมาย mPgCIR09 มีแถบดีเอ็นเอ 2 แบบ คือ เหมือนทั้งพ่อและแม่ และเหมือนพ่อ **(Figure 5c)** ผลการตรวจสอบฝรั่งลูกผสมของคู่ผสมแป้นสีทอง x ใบด่าง ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่า ต้นลูกทั้ง 10 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งแม่และพ่อ จำนวน 2 เครื่องหมาย คือ mPgCIR08 และ mPgCIR91 ส่วนเครื่องหมาย mPgCIR111 มีต้นลูกที่มีแถบดีเอ็นเอ 2 แบบ คือ เหมือนทั้งแม่และพ่อ และแถบดีเด็นเอเหมือนพ่อ **(Figure 5d)** เช่นเดียวกับการตรวจสอบฝรั่งลูกผสมของคู่ผสมลูกผสมแดง x กิมจู ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่า ต้นลูกทั้ง 10 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งแม่และพ่อ จำนวน 1 เครื่องหมาย คือ mPgCIR16 ส่วนเครื่องหมาย mPgCIR33 มีต้นลูกที่มีแถบดีเอ็นเอ 2 แบบ คือ เหมือนทั้งแม่และพ่อ และแถบดีเอ็นเอเหมือนพ่อ **(Figure 5e)**

จากการตรวจสอบฝรั่งต้นลูกทั้งหมด 5 คู่ผสม จะเห็นได้ว่าต้นลูกทั้งหมดเกิดจากการผสมข้าม เนื่องจากไม่มีต้นลูกที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนแม่ แม้ว่าเครื่องหมาย SSR ว่าเป็นเครื่องหมายที่มีการถ่ายทอดลักษณะแบบข่มไม่สมบูรณ์ (co-dominant transmission) แต่อย่างไรก็ตามในบางครั้งเครื่องหมายชนิดนี้สามารถถ่ายทอดลักษณะแบบข่มสมบูรณ์ (dominant transmission) ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yazdani et al. (2003) ใช้เครื่องหมาย SSR ในการตรวจสอบลูกผสมของต้นสนนอร์เวย์ พบผลการตรวจสอบลูกผสมแสดงผลแบบข่มสมบูรณ์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ในบริเวณที่มีการจับของเครื่องหมาย ซึ่งอาจส่งผลในการเพิ่มปริมาณทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552; สุรีพร, 2546)

จากผลการตรวจสอบฝรั่งต้นลูก จำนวน 5 คู่ผสม แสดงว่าต้นลูกที่เหลือทั้งหมดเป็นลูกผสมทั้งหมด สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของสีเนื้อและการคัดเลือกฝรั่งลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการได้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดสอบนี้จะเป็นประโยชน์ให้กับนักวิจัยที่สนใจตรวจสอบลูกผสมฝรั่งอื่นๆ จากฝรั่งพันธุ์พ่อและแม่เหล่านี้

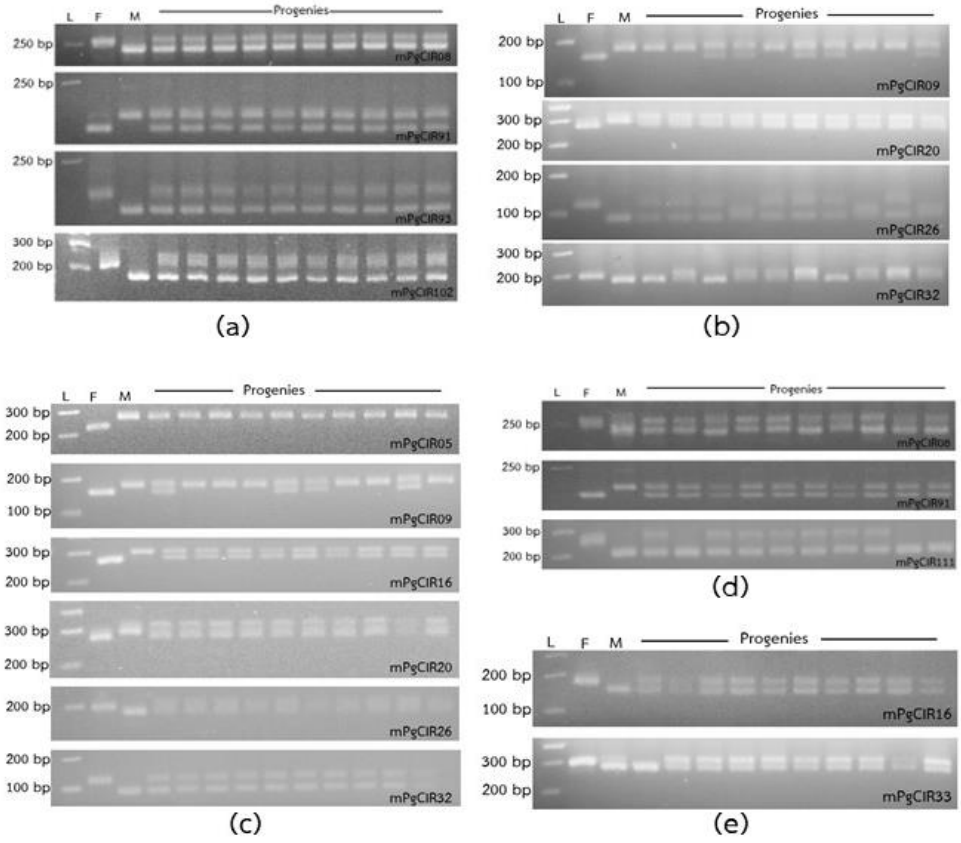

Figure 5 DNA amplification products of guava F_1 hybrids used SSR markers (a) Paenseethong x Putsa (b) Tangmo x Daengtubtimsiam (c) Chompoopuntip x Daeng (d) Paenseethong x Baidang and (e) Daeng x Kimju. L, F and M are DNA ladder, female and male respectively

สรุป

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งในแปลงรวบรวมพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย SSR พบว่า ลักษณะฟีโนไทป์ของกลุ่มฝรั่ง *P. guajava* จำนวน 68 พันธุ์ มีลักษณะสีใบ 3 กลุ่ม คือ สีเขียว สีแดง และด่าง ลักษณะสีผล 4 กลุ่ม คือ สีเขียว สีเขียวแกมเหลือง สีแดง และด่าง ส่วนลักษณะสีของเนื้อ 4 กลุ่ม คือ สีขาว สีชมพู สีแดง และสีม่วง ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SSR พบ 50 เครื่องหมาย แสดงแถบดีเอ็นเอในฝรั่ง 68 พันธุ์ โดยเครื่องหมายที่มีค่า PIC มากกว่า 0.5 ได้แก่ เครื่องหมาย mPgCIR32, mPgCIR132, mPgCIR139, mPgCIR150, mPgCIR383 และ mPgCIR446 เป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้จำแนกพันธุ์ฝรั่งได้ ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่งโดยใช้เครื่องหมาย SSR พบว่า สามารถแยกกลุ่มฝรั่ง *P. guajava* ออกจากฝรั่ง *P. cattleianum* ได้ โดยในกลุ่ม *P. guajava* มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.30-0.99 สามารถจัดกลุ่มใหญ่ได้จำนวน 2 กลุ่ม และกลุ่มย่อยที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน 6 เคลด นอกจากนี้ยังเป็นรายงานแรกที่พบความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR กับสีเนื้อกลุ่มสีชมพู แดง และม่วง คือ เครื่องหมาย mPgCIR153 สัมพันธ์กับเนื้อสีชมพู และเครื่องหมาย mPgCIR446 สัมพันธ์กับเนื้อสีแดงและม่วง และได้นำเครื่องหมาย SSR มาใช้ตรวจสอบฝรั่งลูกผสม 5 คู่ผสม พบว่าเป็นลูกที่ได้จากการผสมข้ามทั้งหมด ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกสีเนื้อฝรั่ง หรือตรวจสอบลูกผสมในการปรับปรุงพันธุ์ฝรั่งต่อไป

คำขอบคุณ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์พัฒนาพันธุ์พืชจักรพันธ์เพ็ญศิริและมูลนิธิชัยพัฒนา และขอขอบคุณ ผศ. ฉันทนา วิชรัตน์ ที่ให้คำปรึกษาการปลูก เก็บข้อมูลและผสมพันธุ์ฝรั่ง อาจารย์ ดร.ศรัณย์ จีนะเจริญ ที่ให้ข้อเสนอแนะร่างบทความ รวมถึงกองพลทหารราบที่ 7 จังหวัดเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปลูกเก็บข้อมูลลักษณะฟีโนไทป์

เอกสารอ้างอิง

จินตนา สามารถ, ฉันทนา วิชรัตน์, ธีรนุช เจริญกิจ และจันทร์เพ็ญ สะระ. 2560. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฝรั่งในแปลงรวบรวมพันธุ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี. น.30-37. ใน: รายงานการประชุมวิชาการประจำปี 2560 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 7-8 ธันวาคม 2560. สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

จุฑามาศ ดำแก้ว และธีรนุช เจริญกิจ. 2566. พัฒนาการของผลดัชนีการเก็บเกี่ยวและปริมาณความร้อนสะสมของฝรั่งพันธุ์กิมจูแตงโมและนิโกร. วารสารผลิตกรรมการเกษตร. 5 (2): 86-96.

ตลาดไท. 2566. ราคาสินค้า. แหล่งข้อมูล: https://talaadthai.com/product-search/result?q=%E0%B8%9D%E0%B8%A3%E0%B8%B1%E0%B9%88%E0%B8%87. ค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2566.

มนตรี แสนสุข. 2558. ฝรั่งพันธุ์ใหม่ หวานพิรุณ ดางรุ่งกำลังมาแรง. Vol. 1. นานาสำนักพิมพ์ ในเครือ บริษัท ยิปซีกรุ๊ป จำกัด. กรุงเทพฯ.

วรพล ลากุล. 2562. องค์ประกอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะทางปริมาณในคุณภาพผลฝรั่ง, วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต วิทยาการพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.

สัจจะ ประสงค์ทรัพย์. 2564. ฐานข้อมูลพันธุกรรมพืช. แหล่งข้อมูล: http://hort.ezathai.org/?p=9450. ค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2566.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช. 2566. รายชื่อพันธุ์ใหม่ที่ได้รับหนังสือสำคัญแสดงการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ (ค.พ.2) (837 พันธุ์). แหล่งข้อมูล: https://www.doa.go.th/pvp/?page_id=479. ค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2566.

สุเมธ กาญจนแสนส่ง. 2548. การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะใบสีแดงในฝรั่ง. ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน. นครปฐม.

สุพรรณิกา สงวนศิลป์, อุณารุจ บุญประกอบ และเกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์. 2554. กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระฟีนอลิกฟลาโวนอยด์และคุณภาพผลของฝรั่งชนิดรับประทานสด. วิทยาศาสตร์เกษตร. 42 (3/1 (พิเศษ): 4.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5 (2): 37-59.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์. กรุงเทพฯ.

Ahmed, B., M. A. Mannan, and S. A. Hossain. 2011. Molecular characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm by RAPD analysis. International Journal of Natural Sciences. 1.

Amiteye, S. 2021. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. Heliyon. 7 (10): e08093.

Briceño, A., Y. Aranguren, and G. Fermin. 2010. Assessment of guava-derived SSR markers for the molecular characterization of Myrtaceae from different ecosystems in Venezuela. In Proceeding of In II International Symposium on Guava and other Myrtaceae 31 Janunry 2010. Belgium.

Campos, G., C. E, M. C. Tamayo Ordoñez, Y. Tamayo Ordoñez, P. J.S, Q. A, and L. Sánchez-Teyer. 2017. Application of sequence specific amplified polymorphism (SSAP) and simple sequence repeat (SSR) markers for variability and molecular assisted selection (MAS) studies of the Mexican guava. African journal of agricultural research. 12: 2372-2387.

Chen, C.-C., C.-W. Huang, C.-Y. Lin, C.-H. Ho, H. N. Pham, T.-H. Hsu, T.-T. Lin, R.-H. Chen, S.-D. Yang, and C.-I. Chang. 2021. Development of disease-resistance-associated microsatellite DNA markers for selective breeding of Tilapia (*Oreochromis* spp.) farmed in Taiwan. Genes. 13 (1): 99.

Flores, G., S. B. Wu, A. Negrin, and E. J. Kennelly. 2015. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. Food chemistry. 170: 327-335.

Hwang, S.-K., and Y.-M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. Journal of biochemistry and molecular biology. 33 (6): 537-540.

Jahnke, G., J. Smidla, and P. Poczai. 2022. MolMarker: a simple tool for DNA fingerprinting studies and polymorphic information content calculation. Diversity. 14 (6): 497.

Kar, P. K., P. P. Srivastava, A. K. Awasthi, and S. R. Urs. 2008. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available in India. Tree Genetics & Genomes. 4 (1): 75-83.

Kherwar, D., K. Usha, S. V. A. Mithra, and B. Singh. 2018. Microsatellite (SSR) marker assisted assessment of population structure and genetic diversity for morpho-physiological traits in guava (*Psidium guajava* L.). Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 27 (3): 284-292.

Kumar, C., R. Kumar, S. K. Singh, A. K. Goswami, A. Nagaraja, R. Paliwal, and R. Singh. 2020. Development of novel g-SSR markers in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda and their application in genetic diversity, population structure and cross species transferability studies. PLoS One. 15 (8): e0237538.

Mehmood, A., S. Luo, N. Ahmad, C. Dong, T. Mahmood, Y. Sajjad, M. Jaskani, and P. Sharp. 2015. Molecular variability and phylogenetic relationships of guava (*Psidium guajava* L.) cultivars using inter-primer binding site (iPBS) and microsatellite (SSR) markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 63: 1345-1361.

Naga Chaithanya, M. V., D. Sailaja, M. R. Dinesh, C. Vasugi, D. C. Lakshmana Reddy, and C. Aswath. 2017. Microsatellite-Based DNA Fingerprinting of Guava (*Psidium guajava*) Genotypes. In Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 01 September 2017. India.

Padmakar, B., C. Kanupriya, P. M. Latha, K. Prashant, M. Dinesh, D. Sailaja, and C. Aswath. 2015. Development of SRAP and SSR marker-based genetic linkage maps of guava (*Psidium guajava* L.). Scientia Horticulturae. 192: 158-165.

Pavlíek, A. 1999. Free tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus Frenkelia. Folia Biol (Prague). 45: 97-99.

Rambaut, A. 2018. FigTree–Tree Figure Drawing Tool Version v. 1.4. 4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh: Edinburgh.

Risterucci, A., M.-F. Duval, W. Rohde, and N. Billotte. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. Molecular Ecology Notes. 5 (4): 745-748.

Risterucci, A. M., G. Nansot, R. Grangeon, V. Lepitre, A. Reeper, X. Argout, M. Ruiz, and N. Billotte. 2010. Development of guava microsatellite (SSR) markers using the SAT software. Acta Horticulturae. 849: 113-120.

Ruan, C. 2010. Germplasm-regression-combined marker-trait association identification in plants. African Journal of Biotechnology. 9 (5): 573-580.

Serrote, C. M. L., L. R. S. Reiniger, K. B. Silva, S. M. dos Santos Rabaiolli, and C. M. Stefanel. 2020. Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. Gene. 726: 144175.

Shalini, K. V., S. Manjunatha, P. Lebrun, A. Berger, L. Baudouin, N. Pirany, R. M. Ranganath, and D. T. Prasad. 2007. Identification of molecular markers associated with mite resistance in coconut (*Cocos nucifera* L.). Genome. 50 (1): 35-42.

Sitther, V., D. Zhang, D. L. Harris, A. K. Yadav, F. T. Zee, L. W. Meinhardt, and S. A. Dhekney. 2014. Genetic characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm in the United States using microsatellite markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 61: 829-839.

Sohi, H. S., M. I. S. Gill, P. Chhuneja, N. K. Arora, S. S. Maan, and J. Singh. 2022. Construction of Genetic Linkage Map and Mapping QTL Specific to Leaf Anthocyanin Colouration in Mapping Population 'Allahabad Safeda'×'Purple Guava (Local)'of Guava (*Psidium guajava* L.). Plants. 11 (15): 2014.

Thakre, M., H. S, R. M.K, R. Senapati, S. G. Rudra, S. Saha, A. Nagaraja, M. K. Verma, G. K. S, E. Varghese, and A. M. Sevanthi. 2023. Pigment composition analysis of fruit pulp in the recombinant progenies reveals the polygenic nature of pulp color inheritance in guava (*Psidium guajava* L.). Tree Genetics & Genomes. 19 (2): 20.

Valdés-Infante Herrero, J., N. N. Rodríguez, D. Becker, B. Velázquez, D. Sourd, G. Espinosa, and W. Rohde. 2007. Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in Cuba. Cultivos Tropicales. 28 (3): 61-67.

Wu, S., J. Yang, Y. Huang, Y. Li, T. Yin, S. D. Wullschleger, G. A. Tuskan, and R. Wu. 2010. An improved approach for mapping quantitative trait Loci in a pseudo-testcross: revisiting a poplar mapping study. Bioinformatics and biology insights. 4: BBI-S4153.

Yazdani, R., I. Scotti, G. Jansson, C. Plomion, and G. Mathur. 2003. Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of Picea abies. Hereditas. 138 (3): 219-227.