



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ Soluble Solid Content และลักษณะต้านทานโรคพืชหลายชนิด

Use of Molecular Markers in Tomato Breeding to Increase Soluble Solid Content and Multiple Disease Resistances

نامผู้วิจัย นางสาวรัตนา ลาสุข

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์จุลภาค กิ่งวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์พัชรินทร์ ตัญญา, ปร.ด.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสถิตี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ
Soluble Solid Content และลักษณะต้านทานโรคพืชหลายชนิด

Use of Molecular Markers in Tomato Breeding to Increase Soluble Solid Content
and Multiple Disease Resistances

โดย

นางสาวรัตนา ลาสุข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รัตนา ลาสุข 2554: การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ Soluble Solid Content และลักษณะต้านทานโรคพืชหลายชนิด ปรินญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์จุลภาค คูนวงศ์, Ph.D. 87 หน้า

การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 ที่มีปริมาณ soluble solid content (SSC) สูงและมีลักษณะต้านทานโรคหลายชนิดจากการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยคัดเลือกต้นลูกผสมกลับให้มียีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ที่ต้องการได้ เริ่มจากสร้างสายพันธุ์รับโดยการผสมเพื่อรวมยีนต้านทานโรคพืช 4 ยีน ได้แก่ ยีน *Mi Ph-3 Tm-2* และ *I2* เข้าไว้ในต้นเดียวกัน คัดเลือกต้นลูกผสมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่ง พบว่า สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคพืช 4 ยีนในมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 จากนั้นนำสายพันธุ์รับที่ได้จากการคัดเลือกลูกผสมกับลูกผสมกลับที่ได้รับการถ่ายทอดยีน *Brix9-2-5* ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มของปริมาณ SSC จากมะเขือเทศ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. lycopersicum* IL9-1-3 หรือ *S. pimpinellifolium* WVa700 โดยในแต่ละรุ่นของการผสมกลับจะผสมลูกผสมที่ได้เข้ากับสายพันธุ์รับ และคัดเลือกลูกผสมกลับที่ต้องการด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีน *Brix9-2-5* และยีนต้านทานโรค ผลที่ได้จากการเพิ่มยีน *Brix9-2-5* เข้าสู่มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรคพืชหลายชนิด พบว่า สามารถปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 ให้มียีน *Brix9-2-5* และยีนต้านทานโรคพืชหลายชนิดได้ โดยสามารถเพิ่มปริมาณ SSC ในมะเขือเทศพันธุ์ P502 ประมาณ 20-41 เปอร์เซ็นต์ และมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ประมาณ 16-46 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 กับ WVa700 ที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR ทั้งหมด 80 ตำแหน่ง ครอบคลุม 12 โครโมโซมของมะเขือเทศ สำหรับการทำให้ negative selection เพื่อช่วยคัดเลือกต้นลูกผสมที่มีสัดส่วนจีโนมเหมือนพันธุ์สิดาทิพย์ 3 อย่างรวดเร็ว พบว่า ในรุ่น BC_4F_1 สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับที่มีจีโนมเหมือนพันธุ์รับ 95-100 เปอร์เซ็นต์

Rattana Lasuk 2011: Use of Molecular Markers in Tomato Breeding to Increase Soluble Solid Content and Multiple Disease Resistances. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Julapark Chunwongse, Ph.D. 87 pages.

Near isogenic lines (NILs) of tomato 'P502' and 'Seedathip 3' that contained high soluble solid content and multiple disease resistances were created using marker assisted backcrossing. The recurrent parents for four disease resistant genes were derived from crossing of the single resistant gene NILs i.e., *Mi*, *Ph-3*, *Tm-2^a* and *I2* and selected using DNA markers associated with disease resistant genes. The construction of recurrent tomato of 'P502' and 'Seedathip 3' containing four disease resistant genes were accomplished. After that, the cross between the recurrent parents and the backcross progenies to transfer genes *Brix9-2-5* responsible with the increase of SSC from *S. lycopersicum* IL9-1-3 or *S. pimpinellifolium* WVa700. After initial cross, selected hybrids in each generation were crossed back to the recurrent parents with the help of molecular markers linked to *Brix9-2-5* gene and disease resistant genes. The use of marker-assisted selection for tomato breeding to increase soluble solid content and multiple disease resistances resulted in the construction of tomato NILs of 'P502' and 'Seedathip 3' containing *Brix9-2-5* gene and four disease resistant genes. The SSC in tomato cultivars 'P502' and 'Seedathip 3' were increased by 20-41 % and 16-46 % respectively. In addition, the cross between 'Seedathip 3' and 'WVa700' were selected to return to the recurrent genotype by using the negative selection technique which allow the wild genomic content to be reduced in few backcross generations by scanning with 80 molecular markers distributed on 12 chromosomes. We found that the negative selection technique to be highly effective at increasing the recurrent genome content to 95-100 % in four backcross generations.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. จุลภาค กุ๋นวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้ความรู้ คำแนะนำทั้งในด้านการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์รวมทั้งการตรวจแก้ไข ตลอดจนให้โอกาสในการเรียนรู้และประสบการณ์ในการทำงานวิจัย ดร. พชรินทร์ ตัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ. ดร. ชลิดา เส็กสมบูรณ์ ประธานการสอบ และดร.อรรพวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุ์พืชกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนงบประมาณการทำวิจัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ที่เอื้อเพื่อทุนการศึกษาและทุนวิจัย ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐมที่เอื้อเพื่อสถานที่ทำวิจัยระหว่างการดำเนินงาน

ขอขอบคุณคุณฉัฐพร กุ๋นวงศ์ ที่ให้โอกาสในการเรียนรู้ประสบการณ์การทำงานวิจัย ตลอดจนความรู้และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งคณาจารย์ทุกท่านที่คอยอบรมสั่งสอนและให้ความรู้ คุณณัฏฐา ศรีสวัสดิ์ คุณกมลศิริ เพชรบูรณ์ คุณพนิดา ฐาตุจรัสกุล และคุณกาญจนา จุ้ยเอี่ยม ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจและช่วยเหลืออย่างมากในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอย่างดีในการศึกษาตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้มาโดยตลอด

รัตนา ลาสุข

เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์คำและย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลการทดลอง	29
วิจารณ์	59
สรุปผลการทดลอง	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	79
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ดิเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกยีนต้านทานโรค 4 ยีน ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อรวมยีนต้านทานโรค	21
2 ดิเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบยีนต่างๆ ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีปริมาณ SSC สูงและต้านทานโรคหลายชนิด	26
3 ลักษณะของยีนต้านทานโรคแต่ละตำแหน่งที่ได้จากการรวมยีน (gene pyramiding) ในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 ในรุ่นที่ 3 และ 4	33
4 ลักษณะของยีนต้านทานโรคแต่ละตำแหน่งที่ได้จากการรวมยีน (gene pyramiding) ในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 (SD3) ในรุ่นที่ 3 และ 4	34
5 ค่าความแตกต่างในระดับดิเอ็นเอ (% DNA polymorphism) ของจีโนมมะเขือเทศที่ตรวจสอบด้วยดิเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR	43
6 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC ₄ F ₁ ของคู่ NIL P502 -Mi x IL 9-1-3	44
7 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC ₄ F ₁ ของคู่ NIL SD3 -Mi x IL 9-1-3	45
8 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC ₃ F ₁ ของคู่ NIL P502 -Ty-2x WVa700	46
9 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC ₃ F ₁ ของคู่ NIL SD3-Ty-2 x WVa700	48
10 เปอร์เซ็นต์จีโนมของมะเขือเทศลูกผสมกลับในรุ่นต่างๆ ในลูกผสมกลับรุ่น BC ₁ F ₁ ของคู่ผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700	56

ตารางผนวกที่

1 ดิเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซตเทลไลท์ (SSR) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศ	80
2 ปริมาณ SSC เฉลี่ย และค่า pH ในสายพันธุ์เริ่มต้นที่ใช้การปรับปรุงพันธุ์	86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แผนผังการสร้าง gene pyramiding รวมยีนต้านทานโรคพืชทั้ง 4 ยีน ได้แก่ <i>Tm-2^a</i> , <i>Mi</i> , <i>I2</i> และ <i>Ph-3</i> ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502	18
2 แผนผังการสร้าง gene pyramiding รวมยีนต้านทานโรคพืชทั้ง 4 ยีน ได้แก่ <i>Tm-2^a</i> , <i>Mi</i> , <i>I2</i> และ <i>Ph-3</i> ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3	18
3 แผนผังการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ให้มียีน <i>Brix 9-2-5</i> และยีนต้านทานโรคหลายชนิด	24
4 การตรวจวัดปริมาณ SSC และ pH ในผลของมะเขือเทศ	27
5 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ของการคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด CAPS ที่คัดเลือดยีนต้านทานโรค 4 ยีน ได้แก่ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย <i>Mi2</i> , <i>TG591</i> , <i>PrRuG248/249</i> และ <i>S20</i>	31
6 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ในการคัดเลือดยีนลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด CAPS	32
7 ลักษณะผลมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 ที่รวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน (NIL P502-4DR) ได้แก่ ยีน <i>I2</i> <i>Tm-2^a</i> <i>Ph-3</i> และ <i>Mi</i>	35
8 ลักษณะผลมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ที่รวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน (NIL SD3-4DR) ได้แก่ ยีน <i>I2</i> <i>Tm-2^a</i> <i>Ph-3</i> และ <i>Mi</i>	35
9 ลักษณะทรงต้นและผลของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้จากการรวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน ในสายพันธุ์ที่คัดเลือกลงไปใช้เป็นสายพันธุ์รับ (recurrent parents) ในการผสมกลับของการทดลองที่ 2	36
10 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอะครีลาไมด์ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ในการคัดเลือดยีนดีเอ็นเอเครื่องหมาย <i>Lin5</i> และ <i>Lin7</i> ที่ใช้คัดเลือดยีน <i>Lin5</i> และ <i>Lin7</i> ของแต่ละคู่ผสม	42
11 ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC ₄ F ₁ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ P502 กับ IL9-1-3	51
12 ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC ₄ F ₁ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 กับ IL9-1-3	52
13 ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC ₃ F ₁ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ P502 กับ WVa700	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- | | | |
|----|--|----|
| 14 | ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC_3F_1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 กับ WVa700 | 54 |
| 15 | สัดส่วนของจีโนมในลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ที่เหมือนกับพันธุ์สีดาทิพย์ 3 (% recurrent) จากการศึกษาด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายของกลุ่ม NIL SD3-Ty-2 x WVa700 | 56 |
| 16 | graphical genotype ของมะเขือเทศสายพันธุ์ผู้เผดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ในการผสมกลับรุ่น BC_3F_1 ของกลุ่ม NIL SD3-Ty-2 x WVa700 | 58 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BC	= backcross
°brix	= degree brix
bp	= base pairs
CAPS	= cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	= complementary deoxyribonucleic acid
cM	= centi Morgan
DR	= disease resistance
F ₁	= first filial generation
IL	= introgressed lines
MAS	= marker assisted selection
MgCl ₂	= magnesium chloride
NILs	= near isogenic lines
P502	= Pace setter 502
PCR	= polymerase chain reaction
QTL	= quantitative trait loci
TMV/ToMV	= tobacco/tomato mosaic virus
TYLCV	= tomato yellow leaf curl virus
SD3	= Seedathip 3
SSC	= soluble solid content
SSR	= simple sequence repeat

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ

Soluble Solid Content และลักษณะต้านทานโรคพืชหลายชนิด

Use of Molecular Markers in Tomato Breeding to Increase

Soluble Solid Content and Multiple Disease Resistances

คำนำ

มะเขือเทศเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย พบว่า มีปริมาณการปลูกและการบริโภคในหลายพื้นที่ของประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ มะเขือเทศบริโภคผลสด ได้แก่ สีดาทิพย์ สีดาห้างฉัตร เซอร์รี่ ราชนิ พลอราเดล และมะเขือเทศอุตสาหกรรม ได้แก่ P502 P600 VF-134-1-2 Roma VF โดยมะเขือเทศบริโภคผลสดนิยมนำมารับประทานสดเหมือนเป็นผลไม้ หรือ สามารถนำไปใช้ในการประกอบอาหารได้ เช่น ส้มตำ ยำ หรือ สลัด ส่วนมะเขือเทศอุตสาหกรรมนิยมนำมาใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น มะเขือเทศลวกผิวนึ่งบรรจุกระป๋อง ซอสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศเข้มข้น เป็นต้น ประเทศไทยนำผลผลิตและผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศที่ผลิตได้มาบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยปีละหลายล้านบาท โดยในปี 2551 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศเพิ่มขึ้นเป็น 52,000 ไร่ ได้ผลผลิต 191,000 ตัน และในปี 2552 มีการส่งออกมะเขือเทศสดมูลค่า 188 ล้านบาท ซอสมะเขือเทศมูลค่า 188.6 ล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2553; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2554) และปริมาณการส่งออกมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นทำให้ประเทศไทยให้ความสำคัญกับการผลิตมะเขือเทศทั้งมะเขือเทศบริโภคผลสดและมะเขือเทศอุตสาหกรรม

การผลิตมะเขือเทศในประเทศนั้นมักประสบปัญหาผลผลิตไม่เพียงพอกับความต้องการเนื่องจากมีโรคและแมลงเข้าทำลาย อีกทั้งคุณภาพของมะเขือเทศไม่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค โดยปัญหาที่พบเกี่ยวกับมะเขือเทศบริโภคผลสด ได้แก่ ไม่มีพันธุ์มะเขือเทศผลใหญ่ที่ใช้บริโภคสดโดยเฉพาะ ไม่มีพันธุ์ที่ทนทานต่อโรคพืชได้หลายชนิด และไม่มีพันธุ์ที่สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ส่วนมะเขือเทศที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแปรรูปที่สำคัญของไทยในปัจจุบันนั้นมีลักษณะต่างๆ ตามที่โรงงานต้องการ ได้แก่ ลักษณะผลสุกพร้อมกัน ขั้วผลหลุดง่าย สีผลแดงจัดตลอดผล ใ้สีกกลางผลสั้น เนื้อมาก น้ำน้อย และผลแน่นแข็ง แต่มีข้อเสียเนื่องจากมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (soluble solid content) ต่ำ สีของผลยังไม่ได้มาตรฐานโลก และไม่มีพันธุ์ที่ทนต่อโรค

ได้หลายชนิด (ศุกลักษณ์, 2536; ถาวร และคณะ, 2543) โดยปัญหาต่างๆ ที่พบสำหรับการผลิตมะเขือเทศทั้งมะเขือเทศบริโภคผลสดและมะเขือเทศอุตสาหกรรมทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พยายามที่จะปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อให้ได้พันธุ์ตรงตามที่ต้องการ

ลักษณะ soluble solid content (SSC) เป็นลักษณะที่มีความสำคัญต่อการผลิตมะเขือเทศบริโภคผลสดและมะเขือเทศอุตสาหกรรม เนื่องจากเกี่ยวข้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กรดซิตริก และกรดมาลิก เป็นส่วนประกอบหลัก ทำให้สามารถช่วยเพิ่มรสชาติและสารอาหารให้กับผลมะเขือเทศได้ และสามารถกล่าวได้ว่าปริมาณ SSC เกี่ยวข้องกับลักษณะความหวานในผลมะเขือเทศ ทำให้คุณภาพของมะเขือเทศบริโภคผลสดดีขึ้น เนื่องจากมีรสชาติหวานขึ้น และมีสารอาหารต่างๆ มากขึ้น อีกทั้งสามารถช่วยให้มะเขือเทศมีปริมาณความเข้มข้นของเนื้อผลเพิ่มขึ้นจึงช่วยลดระยะเวลาและพลังงานในการกำจัดปริมาณน้ำ (dehydration) ของขบวนการแปรรูปมะเขือเทศเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Davies and Hobson, 1981; Jones and Scott, 1993; Chen *et al.*, 1999; Fridman *et al.*, 2000)

การเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคพืชได้หลายชนิดเป็นอีกลักษณะที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ เนื่องจากเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศมีหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย และรา อีกทั้งประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นเหมาะต่อการเกิดโรคและแมลง เป็นผลให้ปริมาณผลผลิตของมะเขือเทศลดลงอย่างมาก หรือ บางครั้งไม่ได้ผลผลิตเลย เช่น โรคราดำที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปมทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศเสียหายมากถึง 51 เปอร์เซ็นต์ โรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากเชื้อ TYLCV ทำให้ผลผลิตมะเขือเทศเสียหายตั้งแต่ 50-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (อนงค์, 2536; สมชาย, 2549; Foolad and Sharma, 2005) และมีโรคพืชอีกหลายชนิดที่สามารถทำให้ผลผลิตมะเขือเทศลดลงในปริมาณมากเช่นกัน

ลักษณะ SSC และลักษณะต้านทานโรคมีความสำคัญต่อคุณภาพและปริมาณในการผลิตมะเขือเทศทั้งมะเขือเทศบริโภคผลสดและมะเขือเทศที่ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างมาก การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีลักษณะ SSC สูงและลักษณะต้านทานโรคสามารถใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยคัดเลือก (marker assisted selection: MAS) ได้โดยใช้ความสัมพันธ์จากลักษณะกายภาพกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการคัดเลือกเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ช่วงต้นของการเจริญพันธุ์ เช่น จากเมล็ดหรือใบเลี้ยง สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ทั้งที่เป็นลักษณะเด่นและลักษณะด้อยโดยไม่ต้องทำ testcross เนื่องจากเป็นการคัดเลือกที่ระดับจีโนไทป์ (genotype) สามารถช่วยคัดเลือกลักษณะ

หลายลักษณะได้พร้อมกัน และสามารถช่วยคัดเลือกลักษณะทางปริมาณที่สภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกได้ ทำให้ได้ต้นพืชที่มียีนที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง และสามารถนำมาใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (backcross) ที่นำยีนที่ต้องการเข้าสู่พืชพันธุ์ดีหรือพันธุ์ที่นิยมปลูกแต่ยังขาดลักษณะใดลักษณะหนึ่ง สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้โดยนำต้นพันธุ์ดีผสมเข้ากับต้นที่มีลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์อื่นแล้วผสมกลับเข้ากับต้นพันธุ์ดีประมาณ 6-7 ครั้ง จนได้พืชสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic line: NIL) ที่มียีนที่ต้องการและมีลักษณะทั่วไปเหมือนพันธุ์ปลูก เป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ดีทำได้สะดวก รวดเร็ว และสามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือกได้ (จุลภาภ, 2548; Tanksley *et al.*, 1989) อีกทั้งในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาแผนที่โครโมโซมของมะเขือเทศที่มีความละเอียดสูงโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่างๆ ที่ครอบคลุมทั้งโครโมโซมมะเขือเทศ และมีการศึกษาโยงเครื่องหมายเพื่อหาตำแหน่งของยีนต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ (Tanksley *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานการหาลำดับเบสของมะเขือเทศทั้งจีโนมทำให้มะเขือเทศเป็นพืชที่มีความสมบูรณ์ของข้อมูลในระดับจีโนมไทป์ และลำดับเบสทั้งจีโนมที่สามารถจะนำมาใช้ประโยชน์ในการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือกลักษณะพันธุกรรมของพันธุ์ป่าที่ไม่ต้องการออกได้อย่างรวดเร็ว (negative selection) สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ผสมกลับได้ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายจากการดำเนินการได้อย่างมาก (Barone, 2004)

วัตถุประสงค์

1. รวมยีนต้านทานโรคแต่ละตำแหน่ง (gene pyramiding) เพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนควบคุมความต้านทานโรค 4 ยีน ได้แก่ *Mi Tm-2^a Ph-3* และ *I2*
2. ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน ได้แก่ *Mi Tm-2^a Ph-3* และ *I2* และมีปริมาณ soluble solid content เพิ่มขึ้น
3. ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค 5 ยีน ได้แก่ *Mi Tm-2^a Ph-3 I2* และ *Ty-2* และมีปริมาณ soluble solid content เพิ่มขึ้น

การตรวจเอกสาร

มะเขือเทศ (tomato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum lycopersicum* L. (Spooner, 2005) เดิมใช้ชื่อว่า *Lycopersicon esculentum* Mill. (Miller, 1754) มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (diploid) $2n = 2x = 24$ เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae เช่นเดียวกับ พริก มะเขือ มันฝรั่ง และยาสูบ มะเขือเทศนิยมปลูกกันแพร่หลายในประเทศแถบทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา และประเทศในเขตกึ่งหนาว มะเขือเทศเป็นพืชผสมตัวเองตามธรรมชาติมีการผสมข้าม 2-5 เปอร์เซ็นต์ ดอกเป็นช่อแบบ raceme ช่อดอกเจริญจากลำต้นบริเวณข้อ หรือ ระหว่างข้อ มีดอกย่อย 4-50 ดอก โดยดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกและกลีบเลี้ยงมี 5-7 กลีบ ล้อมรอบส่วนของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ส่วนของเกสรตัวผู้ประกอบด้วยอับละอองเกสรตัวผู้ (anther) 5-10 อัน มีลักษณะเป็นแท่งเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย เรียกว่า anther cap ซึ่งล้อมเกสรตัวเมียอยู่ เกสรตัวเมียประกอบด้วยรังไข่ (ovary) และก้านชูเกสรตัวเมีย (style) ลักษณะผลเป็นแบบ berry โดยมีช่องว่างภายในผล (locule) 2-25 ช่อง สีผลมีสีแดง ส้ม และเหลือง (จากลักษณะ, 2535; Barone and Frusciante, 2007)

มะเขือเทศอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการมีทั้งวิตามินเอ วิตามินซี สารต้านอนุมูลอิสระ และสารแคโรทีนอยด์ สารต่างๆ เหล่านี้เป็นสารที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ โดยมีการวิจัยพบว่าผลของสารไลโคพีนที่ได้จากมะเขือเทศสามารถช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด และมะเร็งกระเพาะอาหาร อีกทั้งยังช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจได้ด้วย (Rao and Agarwal, 2000; Giovannucci, 2005)

มะเขือเทศที่นิยมปลูกในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ พันธุ์ที่ใช้บริโภคผลสด ได้แก่ พันธุ์สีดาทิพย์ สีดาห้านัตร เซอร์รี่ ราชนิ ฟลอราเดล มาสเตอร์เบอร์ 3 และพันธุ์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมแปรรูป ได้แก่ P502 P600 VF-134-1-2 RomaVF โดยพื้นที่ที่มีการปลูกมะเขือเทศรับประทานสด ได้แก่ จังหวัด ลำปาง นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา และลพบุรี ส่วนพื้นที่ปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม ได้แก่ จังหวัด บุรีรัมย์ อุตรดิตถ์ สุรินทร์ หนองคาย สกลนคร นครพนม กาฬสินธุ์ เชียงใหม่ เชียงราย และตาก โดยผลผลิตและผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีทั้งมะเขือเทศที่ใช้บริโภคผลสดและมะเขือเทศอุตสาหกรรม ผลผลิตของมะเขือเทศบริโภคผลสดนิยมนำมารับประทานสด หรือ ใช้ในการประกอบอาหาร เช่น ส้มตำ ยำ และสลัด ส่วนผลผลิตของมะเขือเทศอุตสาหกรรมที่ผลิตได้ภายในประเทศส่วนใหญ่จะผลิตสำหรับส่งโรงงานอุตสาหกรรมเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น มะเขือเทศกระป๋อง ซอสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศ เป็นต้น โดยในปี 2551 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศเพิ่มขึ้นเป็น 52,000 ไร่ ได้ผลผลิต

191,000 ตัน และในปี 2552 มีการส่งออกมะเขือเทศสดมูลค่า 188 ล้านบาท และซอสมะเขือเทศมูลค่า 188.6 ล้านบาท ประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศไปยังประเทศต่างๆ เช่น ญี่ปุ่น สิงคโปร์ สหรัฐอเมริกา เวียดนาม เป็นต้น (สถาบันอาหาร, 2549; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550, 2554; กรมวิชาการเกษตร, 2553)

ลักษณะของแข็งที่ละลายน้ำได้ (soluble solid content)

ลักษณะของแข็งที่ละลายน้ำได้ (soluble solid content: SSC) เป็นลักษณะที่สำคัญในการผลิตมะเขือเทศบริโภคผลสดและมะเขือเทศอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นลักษณะที่สัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลและปริมาณกรด รวมถึงสารอาหารต่างๆ ที่พบในมะเขือเทศ จะเป็นน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสเป็นส่วนประกอบหลักโดยจะมีส่วนประกอบอยู่ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ใน SSC 50 เปอร์เซ็นต์ใน Total soluble solids (TSS) และส่วนประกอบที่เหลือของ SSC จะประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ (โดยเฉพาะกรดซิตริก และกรดมาลิก) ไขมัน แร่ธาตุ และองค์ประกอบอื่นๆ (เมล็ดและสารหอมระเหย เป็นต้น) การเพิ่มขึ้นของปริมาณ SSC ส่งผลให้มะเขือเทศมีรสชาติ สารอาหาร และมีความเข้มข้นของเนื้อผลเพิ่มขึ้นสามารถช่วยลดระยะเวลา และพลังงานในการกำจัดปริมาณน้ำ (dehydration) ของขบวนการแปรรูปมะเขือเทศเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Davies and Hobson, 1981; Jones and Scott, 1993; Chen *et al.*, 1999; Fridman *et al.*, 2000)

Tanksley and Hewitt (1988) ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RFLP ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายกับลักษณะ SSC ในมะเขือเทศระหว่างมะเขือเทศปลูกพันธุ์ *L. esculentum* (*S. lycopersicum*) ‘VF36’ และ ‘VF145’ กับพันธุ์ *L. chmielewskii* (*S. chmielewskii*) ‘LA1028’ โดยทดสอบปริมาณ SSC และ pH ในประชากรรุ่นลูก F₂ เพื่อศึกษาความแปรปรวนของปริมาณ SSC และ pH ในลูกผสมพบว่า มีค่า SSC หรือ °brix อยู่ระหว่าง 3.85-7.90 และ pH อยู่ระหว่าง 4.05 - 5.25 เมื่อศึกษาด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย RFLP ทั้งหมด 132 ตำแหน่งใน introgression lines พบว่า มี 4 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับลักษณะ SSC ที่อยู่บนโครโมโซม 7 ของมะเขือเทศ ได้แก่ *TG 64*, *Aco-2*, *Cab-4*, *TG13A* และที่ปลายแขนด้านบนของโครโมโซม 10 อีกหนึ่งตำแหน่ง คือ CD 56

การศึกษาผลของเวลา อุณหภูมิ pH และ SSC ต่อความเข้มข้นและสีของน้ำมะเขือเทศในขั้นตอนการผลิตและแปรรูปมะเขือเทศในกระบวนการผลิต โดยการเพิ่มเวลาและอุณหภูมิจะทำให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น และถ้า pH และ SSC เพิ่มขึ้นจะช่วยให้ความเข้มข้นของ

มะเขือเทศเพิ่มขึ้นส่งผลให้สามารถช่วยลดพลังงานและเวลาในการกำจัดน้ำ (dehydration) ได้ (Thakur *et al.*, 1997) โดยค่า pH ที่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปมะเขือเทศอยู่ที่ประมาณ 3.5-4 ซึ่งไม่ควรเกิน 4.5 เนื่องจากค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้กระป๋องมะเขือเทศแปรรูปบวม และเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นทำให้ต้องใช้เวลาในการนึ่งฆ่าเชือนานขึ้น (ถาวร, 2543)

Chen *et al.* (1999) ศึกษาแผนที่ลักษณะทางปริมาณหลายลักษณะในมะเขือเทศระหว่างคู่ผสม *L. esculentum* (*S. lycopersicum*) NC84173 กับ *L. pimpinellifolium* (*S. pimpinellifolium*) LA722 พบว่า ลักษณะ SSC เป็นลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci: QTL) ซึ่งมี QTL ที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว 32 QTLs ทำให้ปริมาณ SSC ในมะเขือเทศปลูกเพิ่มขึ้น 32.4-35.6 เปอร์เซ็นต์ ตำแหน่งของ QTLs ที่พบจะอยู่บนโครโมโซม 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10 และ 12 โดยในแต่ละตำแหน่งมีค่า LOD และค่า phenotypic variation explained (PVE) แตกต่างกันไป โดย QTLs ที่อยู่บนโครโมโซม 1, 2, 6 และ 9 ให้ค่า LOD และค่า PVE สูง โดยค่าปริมาณ °brix ของ *L. esculentum* NC84173 อยู่ระหว่าง 3.8-4.8 ของ *L. pimpinellifolium* 'LA722' อยู่ระหว่าง 6.3-6.8 จากการศึกษาพบว่าลูกผสมกลับที่ได้มีค่าปริมาณ °brix เฉลี่ยในประชากรลูกผสมรุ่น BC₁S₁ อยู่ระหว่าง 4.6-5.6

Fridman *et al.* (2000) ศึกษาลักษณะ SSC ในมะเขือเทศป่าพันธุ์ *L. pennellii* (*S. pennellii*) ร่วมกับ *L. esculentum* (*S. lycopersicum*) 'M.82' พบว่า ลักษณะ SSC ในมะเขือเทศเป็นลักษณะปริมาณ (quantitative trait loci: QTL) มียีนเกี่ยวข้องทั้งหมด 23 QTLs ที่ช่วยในการเพิ่มปริมาณ SSC ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Eshed and Zamir (1995) ที่ได้รายงานไว้ โดยพบว่ามีหนึ่งยีนหลัก (major gene) ในการควบคุมลักษณะ SSC อยู่ที่ตำแหน่ง *Brix 9-2-5* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 ของมะเขือเทศ ยีนมีขนาด 484 bp อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ตำแหน่ง 2799-3283 ในลักษณะ invertase domain เรียกตำแหน่งนี้ว่า apoplastic invertase (*Lin5*) เป็น small family ที่สามารถถอดรหัสให้ extracellular enzymes คือ เอนไซม์ไฮโดรเลสที่เมื่อถูกส่งถ่ายออกสู่เซลล์สามารถที่จะย่อยน้ำตาลซูโครสในเซลล์ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส

Yousef and Juvik (2001) ศึกษาการเพิ่มของปริมาณ SSC ในมะเขือเทศโรงงานของกลุ่มสมระหว่างพันธุ์ปลูก *L. esculentum* (*S. lycopersicum*) VF145B-7879 ที่มีปริมาณ °brix ประมาณ 4.25 กับพันธุ์ป่า *L. chmielewskii* (*S. chmielewskii*) VF145B-7M ที่มีปริมาณ °brix ประมาณ 4.79 พบว่ามีบริเวณที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ SSC อยู่บนโครโมโซม 7 ส่งผลให้ลูกในรุ่น F₁ มีปริมาณ °brix เพิ่มขึ้นเป็น 4.74

Fridman and Zamir (2003) ศึกษา ยีน *Lin5* ในมะเขือเทศที่มีลักษณะทางปริมาณ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณ total soluble solid (TSS) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลที่อยู่ในผลของมะเขือเทศได้ 20 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ยีน *Lin7* ที่มีลักษณะเป็น invertase domain สามารถช่วยเพิ่มปริมาณ SSC ในผลของมะเขือเทศได้เช่นกัน โดยมีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน *Lin5*

Roitsch and Gonzalez (2004) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับ invertase isoenzyme ในเซลล์พืช พบว่ามีสามชนิด ได้แก่ Vacuolar invertase (Inv-V) อยู่ในส่วนแวคิวโอล Extracellular invertase (Inv-CW) อยู่ในส่วนอะโพพลาสต์ และ Neutral invertase (Inv-N) อยู่ในส่วนไซโทพลาสซึม

โรคมะเขือเทศที่สำคัญของประเทศไทย

เชื้อสาเหตุโรคมะเขือเทศในประเทศไทยสามารถพบได้ทั้งเชื้อรา เช่น โรคเหี่ยวเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) โรคใบไหม้ (late blight) เชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) โรคใบจุด (bacterial spot) เชื้อไวรัส เช่น โรคใบด่าง (Tobacco/Tomato mosaic virus: TMV/ToMV) โรคใบหงิกเหี่ยวมะเขือเทศ (Tomato yellow leaf curl virus: TYLCV) ไร้เดือนฝอย ได้แก่ ไร้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode) เป็นต้น (Razdan and Mottoo, 2007) โดยโรคมะเขือเทศที่สำคัญและพบได้ทุกพื้นที่ของการปลูกมะเขือเทศ ได้แก่

โรคเหี่ยวเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt)

โรคเหี่ยวเหี่ยวเหลืองเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* เริ่มแสดงอาการที่ใบมะเขือเทศที่อยู่ด้านล่าง โดยจะเริ่มมีสีเหลืองแล้วค่อยๆ ลูกกลามขึ้นมามากขึ้น ในเวลากลางวันที่มีอากาศร้อนจัดต้นจะเหี่ยว เวลากลางคืนต้นจะกลับมาเป็นปกติ อาการเหี่ยวจะค่อยๆ เพิ่มมากขึ้นจนยอดเหี่ยวตาย เมื่อถอนรากขึ้นมาตรวจดูเนื้อเยื่อที่อาหาร และน้ำ จะมีสีน้ำตาลดำที่โคนต้นและรากเปื่อย มักจะมีรากเป็นผงสีขาวอมชมพูบางๆ ขึ้นตรงส่วนที่เป็นสีน้ำตาล (อนงค์, 2536) โดยพบยีน *I* ได้แก่ *I1* *I2* และ *I3* ที่เป็นยีนต้านทานต่อโรค Fusarium wilt ในมะเขือเทศ โดยยีน *I1* และ *I3* มีตำแหน่งของยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซม 7 ส่วนยีน *I2* มีตำแหน่งของยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซม 11 ยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวเหลืองใน race ที่ 1 (*I1*) และ 2 (*I2*) ได้ยีนต้านทานมาจากมะเขือเทศพันธุ์ *L. pimpinellifolium* (*S. pimpinellifolium*) ส่วนใน race ที่ 3 ได้ยีนต้านทานมาจากมะเขือเทศพันธุ์ *L. pennellii* (*S. pennellii*) (Bournival et al., 1989; Sarfatti et al., 1989; Hemming et al., 2004)

โรคใบไหม้ (Late blight)

โรคใบไหม้เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary มะเขือเทศที่ถูกเชื้อนี้เข้าทำลายสามารถแสดงอาการของโรคได้ทุกส่วน โดยลักษณะอาการที่แสดงบนใบมีดังนี้ ใบจะมีลักษณะจุดน้ำสีเขียวหม่น เนื้อเยื่อรอบๆ แผลมีสีเหลือง (halo) ด้านท้องใบมีสปอร์ของเชื้อราเป็นผงสีขาวเกิดขึ้นรอบขอบแผลซ้อนกัน 2-3 ชั้น แผลจะแห้งเป็นสีน้ำตาลภายในเวลาอันรวดเร็ว ทำให้ส่วนนั้นๆ เหี่ยวแห้งตายไป มะเขือเทศผลอ่อนจะมีสีน้ำตาล และเกิดสปอร์ของเชื้อราขึ้นเช่นกัน ผลสุกมักจะแตกและมีเชื้อราขึ้นตรงรอยแตกเห็นได้ชัดเจน เป็นโรคที่สำคัญทางภาคเหนือ (อนงค์, 2536) จากการศึกษาของ Al-Kherb *et al.* (1995) พบว่ายีนต้านทานโรคใบไหม้ในมันฝรั่งและมะเขือเทศมีลักษณะเป็นยีนเด่นที่ควบคุมลักษณะต้านทานเพียงหนึ่งตำแหน่ง (single dominant resistant gene) ยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบไหม้ในมะเขือเทศ ได้แก่ ยีน *Ph* เป็นยีนต้านทานโรคที่มาจากมะเขือเทศพันธุ์ *L. pimpinellifolium* (*S. pimpinellifolium*) โดยตำแหน่งยีน *Ph-1* อยู่บนโครโมโซม 7 ยีน *Ph-2* อยู่บนโครโมโซม 10 (Moreau *et al.*, 1998) และยีน *Ph-3* อยู่ที่ตำแหน่ง TG591A บนโครโมโซม 9 (Chunwongse *et al.*, 1998, 2002)

โรคใบด่าง (mosaic)

โรคใบด่างเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) หรือ *Tomato mosaic virus* (ToMV) เป็นเชื้อสาเหตุชนิดเดียวกัน โรคใบด่างเป็นโรคที่พบทั่วไปในทุกแหล่งปลูกมะเขือเทศ อาการที่พบในประเทศไทย คือ ใบด่าง (mosaic) ที่ใบอ่อน โดยจะแสดงอาการด่างสีเหลืองสลับสีเขียวเข้ม หรือ ใบขนาดเล็กกว่าปกติ ต้นมะเขือเทศจะชะงักการเจริญเติบโต (ศุภลักษณ์, 2536) ยีนต้านทานมีลักษณะเป็นยีนเด่น (dominant resistance) มี 3 ยีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Tm-1*, *Tm-2* และ *Tm-2'* (*Tm-2^a*) (Razden and Mottoo, 2007) ตำแหน่งของยีนต้านทาน *Tm-2'* อยู่บนโครโมโซม 9 มีแหล่งกำเนิดของยีนต้านทานมาจากมะเขือเทศพันธุ์ *L. peruvianum* (*S. peruvianum*) (Young and Tanksley, 1989) ส่วนยีนต้านทาน *Tm-1* และ *Tm-2* มีแหล่งกำเนิดของยีนต้านทานมาจากมะเขือเทศพันธุ์ *L. hirsutum* (*S. habrochaites*) (Levesque *et al.*, 1990)

โรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ (Tomato yellow leaf curl disease)

โรคใบหงิกเหลืองเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) ทำให้ใบอ่อนของมะเขือเทศตรงส่วนเนื้อใบระหว่างก้านใบชิดเหลือง ใบหยักเป็นคลื่น เนื้อใบแข็ง และมีขนาดเล็กลง ใบบิดเบี้ยว ยอดหงิกและลดรูป ไม่เจริญเติบโต เชื้อไวรัสชนิดนี้มีแมลงหวี่ขาเป็นพาหะของโรค เป็นโรคที่พบแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางทั้งภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตลอดจนแถบภาคกลาง ทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศเสียหายตั้งแต่ 50-100 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามะเขือเทศเป็นโรคในระยะต้นกล้าหรือระยะก่อนออกดอกอาจจะไม่ได้ผลผลิตเลย มะเขือเทศพันธุ์สีดาอ่อนแอต่อโรคนี้นมาก (อนงค์, 2536) ตำแหน่งของยีนต้านทาน *Ty-1* และ *Ty-2* ในมะเขือเทศที่ต้านทานเชื้อ TYLCV มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 6 และ 11 ตามลำดับ โดยยีนต้านทาน *Ty-1* มีแหล่งกำเนิดของยีนมาจากมะเขือเทศพันธุ์ *L. chilense* (*S. chilense*) LA 1969 (Zamir *et al.*, 1994) ส่วนยีนต้านทาน *Ty-2* ได้ยีนจากมะเขือเทศพันธุ์ *L. hirsutum* (*S. habrochaites*) (Hanson *et al.*, 2000) ยีนต้านทาน *Ty-3* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 6 และ *Ty-4* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 3 ซึ่งได้ยีนต้านทานจากมะเขือเทศพันธุ์ *S. chilense* (Ji *et al.*, 2007; 2009) และ *Ty-5* ที่ได้ยีนต้านทานจากมะเขือเทศพันธุ์ *S. peruvianum* ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 4 (Anbinder *et al.*, 2009)

โรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย (Root knot disease)

ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นปัญหาที่พบในการผลิตมะเขือเทศที่ปลูกในพื้นที่ที่เป็นดินทราย ซึ่งจะเข้าทำลายและทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตอย่างมาก พบมีการระบาดของโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปมนี้ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศที่ปลูกในพื้นที่แถบนั้นเสียหาย 10-15 เปอร์เซ็นต์ โดยผลผลิตของมะเขือเทศพันธุ์ Rutger ลดลงถึง 51 เปอร์เซ็นต์ ประเทศไทยพบไส้เดือนฝอยรากปม 2 ชนิด ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ ได้แก่ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* ความเสียหายที่เกิดกับมะเขือเทศส่วนใหญ่เกิดจาก *M. incognita* ตามแหล่งปลูกมะเขือเทศทั่วประเทศ มะเขือเทศที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะแสดงอาการใบเหลือง เหี่ยว แคระแกร็น ผลผลิตต่ำ เกิดปุ่มปมที่ระบบราก โดยพันธุ์สีดา และมะเขือเทศสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนใหญ่อ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยรากปม (สมชาย, 2549) ยีนต้านทานไส้เดือนฝอย *Mi* ได้มาจากมะเขือเทศ *L. peruvianum* (*S. peruvianum*) ส่งผลให้เกิดความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม 3 ชนิด ได้แก่ *M. incognita*, *M. arenaria* และ *M. javanica* (Yaghoobi *et al.*, 1995)

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก

จุดมุ่งหมายเบื้องต้นของนักปรับปรุงพันธุ์พืช คือ การพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์และเศรษฐกิจ นักวิจัยต้องมีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงความถี่ยีน และพัฒนาจีโนมใหม่แบบใหม่ร่วมกับการใช้เทคนิคใหม่ๆ เพื่อช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถที่จะพัฒนาไปได้อย่างรวดเร็ว

Stubber and Edwards (1986) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการคัดเลือกผลผลิตระหว่างการใช้โมเลกุลเครื่องหมายกับการคัดเลือกโดยคุณลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) พบว่า การคัดเลือกที่ใช้โมเลกุลเครื่องหมายทำให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกโดยคุณลักษณะที่ปรากฏ และความน่าเชื่อถือจะมากขึ้นเมื่อเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีนหรือเป็นยีน และครอบคลุมทั้งจีโนม

Tanksley *et al.* (1989) ปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือก สามารถคัดเลือกพืชที่มีลักษณะตรงตามที่ต้องการ และสามารถทำได้ในทุกระยะของกาเจริญเติบโตของพืช หรือแม้แต่การใช้เมล็ดในการคัดเลือก นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกลักษณะหลายลักษณะได้พร้อมๆ กัน เช่น ความต้านทานโรคหลายโรค ช่วยในการนำเอาลักษณะที่สำคัญต่อการผลิตจากพันธุ์ป่าเข้าสู่พันธุ์ปลูกเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถช่วยในการวิเคราะห์ลักษณะทางปริมาณที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง (quantitative trait loci) ได้เสมือนเป็นยีนเดี่ยว

Lande and Thompson (1990) กล่าวว่า การคัดเลือกจะมีประสิทธิภาพเมื่อใช้โมเลกุลเครื่องหมายร่วมกับข้อมูลลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) แต่ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับอัตราพันธุกรรม (heritability) ของลักษณะที่สนใจ โดยการคัดเลือกที่ใช้โมเลกุลเครื่องหมายจะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อลักษณะที่สนใจมีค่าอัตราทางพันธุกรรมที่ต่ำ และส่วนของยีนที่มีการแสดงออกแบบบวกลบผสม มีความสัมพันธ์กันสูงกับตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมาย

Hospital *et al.* (1992) กล่าวว่า การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับชนิด (species-specific) สามารถช่วยลดปริมาณจีโนมของพันธุ์ป่าลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถช่วยคัดเลือกต้นลูกผสมกลับให้มีจีโนมกับมาเหมือนพันธุ์รับได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับชนิดเข้ามาช่วยคัดเลือกจีโนมของพันธุ์ป่าทิ้งทำให้สัดส่วนจีโนมของลูกผสมกลับที่ได้จากการคัดเลือกมีสัดส่วนจีโนมกับมาเหมือนกับพันธุ์รับเร็วขึ้น และสามารถลดการเกิด linkage drag ที่เป็นการลากติดมาของชิ้นส่วนจีโนมของสายพันธุ์ให้ได้

Tanksley *et al.* (1992) สร้างแผนที่โครโมโซมของมะเขือเทศที่มีความละเอียดสูง โดยใช้ ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่างๆ เช่น ไอโซไซม์ และยีนเครื่องหมาย รวมทั้งได้หาตำแหน่งของยีนในตำแหน่งต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Edward and Johnson (1994) ศึกษาข้าวโพดหวานสายพันธุ์แท้ (inbred lines) โดยสร้างดัชนีในการคัดเลือก (selection index) ใน 34 ลักษณะ เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์ของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายกับ index performance ที่ต้องการในลักษณะที่สนใจพบว่า ลูกผสมที่สร้างขึ้นจากสายพันธุ์แท้ที่ได้นั้นมีสมรรถภาพ (hybrid performance) ที่ดี และการคัดเลือกโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยให้การปรับปรุงลักษณะทางปริมาณที่มีกระบวนการดำเนินการที่ยากและซับซ้อนให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้รวดเร็วและถูกต้อง

Roumen *et al.* (1998) ศึกษาความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศในประเทศไทย โดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่างๆ และประชากรลูกผสม recombinant inbred ที่มีแหล่งความต้านทานมาจากพันธุ์ L285 จาก AVRDC ประเทศไต้หวันพบว่า ยีนต้านทานโรคเหี่ยวมีอย่างน้อย 2 ตำแหน่งบนโครโมโซม 2 และโครโมโซม 10 ที่ตอบสนองต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้

Servin *et al.* (2004) ศึกษาการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือกต้นลูกผสมที่ได้จากการรวมยีน (gene pyramiding) ที่มียีนต้านทานโรครอยจุดและดำนให้มารวมในต้นเดียวกัน สามารถช่วยลดจำนวนรุ่น (generation) ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้ได้ต้นพืชที่มีหลายยีนในต้นเดียวกันได้อย่างรวดเร็วโดยพบว่าสามารถรวมยีนได้ 6 ยีนในรุ่นที่ 4 ของการคัดเลือก

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับ (backcross: BC) นิยมใช้เมื่อมีพืชพันธุ์ดีอยู่แล้วแต่ยังขาดลักษณะบางลักษณะ โดยการนำยีนที่สนใจเข้าไปยังพันธุ์ที่ต้องการเพื่อปรับปรุงให้ลักษณะที่ดีอยู่แล้วนั้นดียิ่งขึ้น โดยจะคงลักษณะเดิมที่ดีอยู่แล้วของพันธุ์ปลูกไว้ และรับการถ่ายทอดลักษณะที่ยังขาดเพิ่มเติมเข้ามา ในการผสมกลับแต่ละครั้งลูกผสมที่ได้ในแต่ละรุ่นจะมีสัดส่วนจีโนมของพันธุ์รับ (recurrent parent) เท่ากับ $1 - (1/2)^{t+1}$ เมื่อ t เป็นจำนวนครั้งของการผสมกลับ (Babu *et al.*, 2004) และเมื่อผสมลูกผสมกลับไปยังพันธุ์รับประมาณ 6 รุ่น ลูกผสมที่ได้จะมีสัดส่วนจีโนมเหมือนกับพันธุ์รับประมาณ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ได้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic line: NIL) (Semagn *et al.*, 2006) การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection: MAS) สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ทั้งที่เป็น

ลักษณะเด่นและลักษณะด้อย และในกรณีที่พืชนั้นมีดีเอ็นเอเครื่องหมายครอบคลุมทั้งจีโนมสามารถนำมาคัดเลือกต้นลูกผสมที่มีชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับ (recurrent parent) มากที่สุดพร้อมกับยีนเป้าหมายที่ต้องการเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ดีทำได้สะดวก (จุลภาค, 2543, 2548)

Barone (2004) พบว่าการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือก สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมกลับที่มียีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการได้ทั้งลักษณะคุณภาพและลักษณะทางปริมาณ เช่น ยีนต้านทานโรค ยีนควบคุมปริมาณผลผลิต ที่เป็นการคัดเลือกแบบบวก (positive selection) และเมื่อได้ต้นลูกผสมกลับที่มียีนจากพันธุ์ป่าที่ต้องการแล้วจะคัดเลือกต้นลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกให้มีพันธุกรรมพื้นฐานทั่วไปนอกจากยีนที่ต้องการให้มีลักษณะเหมือนพันธุ์รับ (recurrent parent) โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับชนิด (species-specific) ในการคัดเลือกเพื่อลดพันธุกรรมของพันธุ์ป่า (negative selection) สามารถช่วยลดจำนวนรุ่นของการผสมกลับลงได้

ในช่วงระยะเวลา 10 กว่าปีที่ผ่านมา นักปรับปรุงพันธุ์พืช และบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์หลายๆ บริษัทให้การยอมรับเทคนิค marker assisted selection (MAS) ว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์พืชว่าสามารถพัฒนาและปล่อยพันธุ์ใหม่ออกสู่ตลาดได้เร็วขึ้น โดยนำมาใช้ในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ถั่ว ฯลฯ และในปัจจุบันบริษัทเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศหลายบริษัทในสหรัฐอเมริกา ได้แก่ Seminis Syngenta Harris Moran Sakata และ Asgrow และในยุโรป ได้ใช้ MAS ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเป็นส่วนใหญ่กับลักษณะความต้านทานโรคที่เป็นแบบ vertical (race-specific) resistance เช่น ลักษณะต้านทานโรค corky root, fusarium wilt, late blight, powdery mildew, bacterial speck และ verticillium wilt เป็นต้น และสามารถปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะทางปริมาณ ได้แก่ bacterial wilt และ bacterial canker หรือโรคที่เกิดจากเชื้อ *tomato yellow leaf curl virus* และลักษณะปริมาณ soluble solids content (Foolad and Sharma, 2005)

ชนิดของดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) เป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ หรือต่างชนิด ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายด้วยกัน (การสร้างแผนที่โครโมโซม) หรือ ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายกับลักษณะที่แสดงออก (การหาคำแหน่งของยีน) โดยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีรายงานในปัจจุบันมีหลายประเภท ได้แก่

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เทคนิค RFLP เป็นเทคนิคที่ศึกษาความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่สามารถทำให้เกิดความหลากหลายของขนาดที่เกิดจากการตัดชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณที่แตกต่างกัน และนำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดไปแยกขนาดด้วยเจลอะกาโรส (agarose gel) ด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสไปบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) โดยวิธี Southern blot และนำดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลาก (probe) มาไฮบริไดซ์ (hybridize) กับดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอได้ (Tanksley *et al.*, 1989)

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นมาโดยการรวมเทคนิค RAPD กับ เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เข้าด้วยกัน มีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนดังนี้ 1. ตัดดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดมาต่อด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ (adapter) ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับจุดตัดของเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ไลเกส (ligase) 2. ทำ pre-selective amplification ที่ใช้ปฏิกิริยาจากข้อหนึ่งมาทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นมาโดยให้มีลำดับเบสที่เข้าคู่กัน (complementary) กับลำดับเบสของตัว adapter และเพิ่มลำดับเบสเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ต่อจากลำดับเบสที่เข้าคู่กันกับ adapter 1 เบส 3. selective amplification ใช้ปฏิกิริยา PCR จากข้อสองมาเป็นดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มลำดับเบสไปที่ปลาย 3' สอง หรือ สามเบส เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยการแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะคริลามิด (acrylamide gel) (Vos *et al.*, 1995)

Simple-Sequence Repeat (SSR) หรือ Microsatellite

ไมโครแซทเทลไลต์เป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นชุดที่ซ้ำกัน ชุดหนึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 2-6 เบส จำนวนซ้ำที่พบต่ำกว่า 100 ซ้ำ จำนวนซ้ำจะแตกต่างกันไปไม่แน่นอน พบมากในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน (non-gene) ในการสร้าง SSR เพื่อเป็นเครื่องหมายสามารถทำได้โดยการค้นหาข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอจากฐานข้อมูลลำดับเบสทางอินเทอร์เน็ต ในพืชที่มีการศึกษาข้อมูลของพันธุกรรมภายในจีโนมแล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์ (primer) หรือใช้ซีดีเอ็นเอ (cDNA) ที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ มาไฮบริดซ์กับโคลนในจีโนมิกไลบรารี (genomic library) ที่มีอยู่แล้วเลือกเอาโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ออกมาหาลำดับเบสแล้วนำไปออกแบบไพรเมอร์ต่อไป (Tautz, 1989)

Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด CAPS เป็นการพัฒนาเครื่องหมายชนิด RFLP ที่มีหลายขั้นตอน และมีความยุ่งยากมาเป็นวิธี PCR โดยการนำเอาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RFLP ไปหาลำดับเบสและสร้างไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ RFLP ตำแหน่งนั้นๆ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR แล้ว นำดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่ศึกษาได้ ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้มีขั้นตอนในการทำที่ไม่ยุ่งยาก และได้ผลที่รวดเร็วกว่าการใช้เทคนิค RFLP (Konieczny and Ausubel, 1993)

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

SSCP เป็นวิธีการตรวจสอบหาความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแตกต่างกันเพียงหนึ่งเบสได้โดยอาศัยหลักการขดตัว หรือ พันกันภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันเกิดเป็นโครงสร้างดีเอ็นเอที่จำเพาะแตกต่างกัน ทำให้เคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นแผ่นเจลอะครีลาไมด์ได้ช้าเร็วต่างกัน (Orita *et al.*, 1989)

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์รับ (recurrent parent) ที่มียีนควบคุมความต้านทานโรค 4 ยีน โดยการรวมยีนต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่ง (gene pyramiding)

1. พันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อรวมยีนต้านทานโรค

มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีกาทิพย์ 3 (SD3) ที่ปรับปรุงพันธุ์ให้มียีนควบคุมความสามารถในการต้านทานโรคลักษณะต่างๆ ทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ ยีน *Mi* มีตำแหน่งยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซม 6 สามารถต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม ยีน *Ph-3* มีตำแหน่งยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซม 9 ที่ต้านทานโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* race 3 ยีน *Tm-2⁺* มีตำแหน่งยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซม 9 ที่ต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* และยีน *I2* มีตำแหน่งยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซม 11 ที่ต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 โดยยีนต้านทานโรคที่นำมาทำ gene pyramiding แต่ละยีนมีลักษณะเป็นยีนเด่นที่ควบคุมความสามารถในการต้านทานโรคด้วยยีนเพียง 1 คู่ (single dominant gene)

ในการทดลองนี้ได้ใช้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของ P502 ที่มียีนต้านทานโรคแต่ละยีน ได้แก่ TOMAC 461 (NIL P502- *Mi*) TOMAC 482 (NIL P502- *Ph-3*) TOMAC 464 (NIL P502- *Tm-2⁺*) และ TOMAC 479 (NIL P502- *I2*) และมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของสีกาทิพย์ 3 (SD3) ที่มียีนต้านทานโรคแต่ละยีน ได้แก่ TOMAC 460 (NIL SD3- *Mi*) TOMAC 476 (NIL SD3- *Ph-3*) TOMAC 463 (NIL SD3- *Tm-2⁺*) และ TOMAC 462 (NIL SD3- *I2*)

2. การสร้าง gene pyramiding รวมยีนต้านทานโรคของมะเขือเทศสายพันธุ์ P502 และสีกาทิพย์ 3

การรวมยีนต้านทานโรค (disease resistant gene pyramiding) แต่ละตำแหน่งโดยการผสมมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีกาทิพย์ 3 ที่มียีนต้านทานโรคอยู่คนละตำแหน่งตามแผนผังการสร้าง gene pyramiding เพื่อรวมยีนต้านทานโรคของมะเขือเทศสายพันธุ์ P502 และสีกาทิพย์ 3 ดังภาพที่ 1 และ 2 (ดัดแปลงมาจาก Servin *et al.*, 2004)

2.1 สร้างลูกผสม (F_1) ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดสองสายพันธุ์ ได้แก่ คู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีน $Tm-2^a$ กับ Mi และคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีน $I2$ กับ $Ph-3$ คัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีนต้านทานโรค 2 ยีน ของแต่ละคู่ผสมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายดังตารางที่ 1

2.2 นำต้นลูกผสมจากแต่ละคู่ผสมในรุ่นที่ 1 มาผสมรวมกันและคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายหาต้นมะเขือเทศที่ยีนมีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีน ในรุ่นที่ 2

2.3 นำต้นลูกผสมที่มีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีน มาผสมตัวเองและคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายหาต้นมะเขือเทศที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน ในรุ่นที่ 3

3. จำนวนต้นที่ใช้คัดเลือกในแต่ละรุ่น

จำนวนต้นที่ใช้ในการคัดเลือกทางทฤษฎีในขั้นตอนการรวมยีน (gene pyramiding) คำนวณจากสูตรที่ดัดแปลงจาก Witcombe and Virk (2001) ในรุ่นที่ 2 ของการผสมจะต้องคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่ยีนทั้ง 4 ตำแหน่งให้มีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซโกตโดยใช้การคำนวณจำนวนต้นจากสูตรที่ 1

$$N_1 = \log (0.05) / \log (1-1/2^n)$$

เมื่อ N_1 = จำนวนต้นที่คัดเลือกทางทฤษฎีในรุ่นที่ 2

n = จำนวนคู่ของยีนที่เป็นเฮเทอโรไซกัส

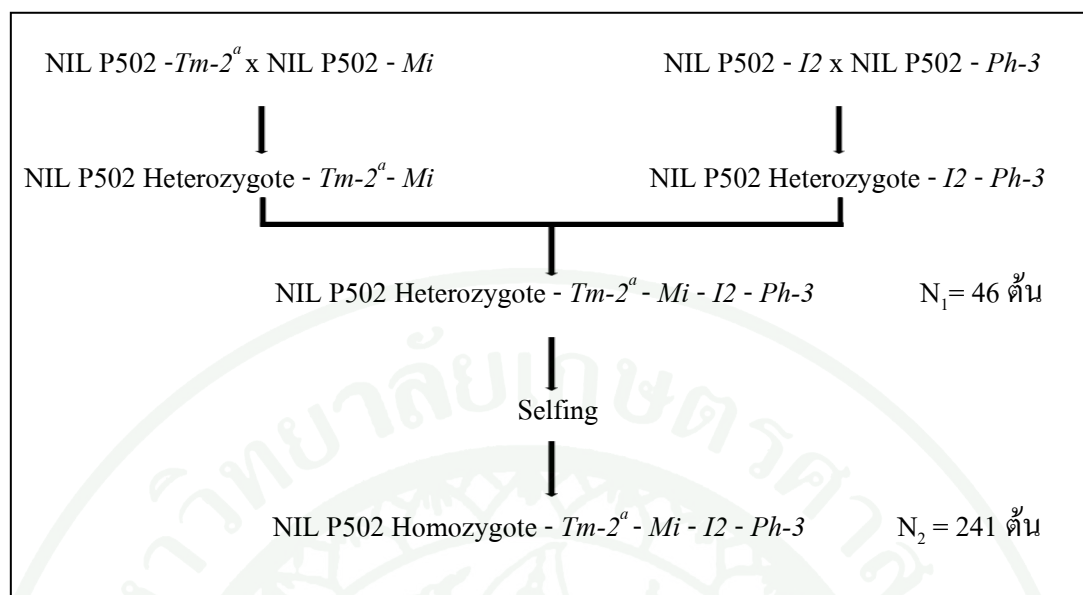
ในรุ่นที่ 3 จะต้องคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่ยีนทั้ง 4 ตำแหน่งที่มีลักษณะเป็นโฮโมไซโกตโดยใช้การคำนวณจำนวนต้นจากสูตรที่ 2

$$N_2 = \log (0.05) / \log (1-1/3^n)$$

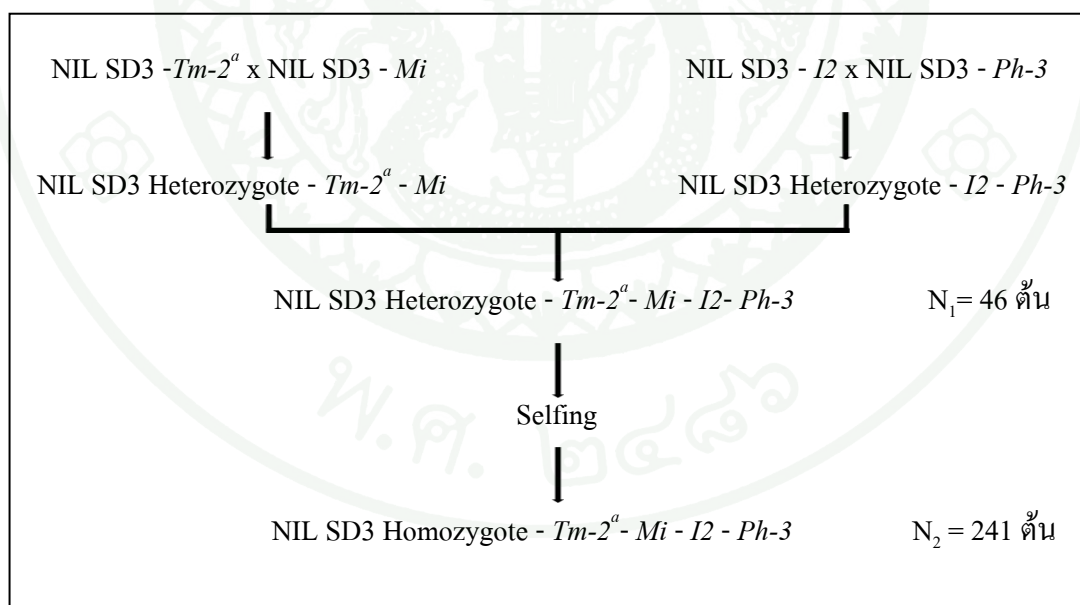
เมื่อ

N_2 = จำนวนต้นที่คัดเลือกทางทฤษฎีในรุ่นที่ 3

n = จำนวนคู่ของยีนที่เป็นเฮเทอโรไซกัส



ภาพที่ 1 แผนผังการสร้าง gene pyramiding รวมยีนต้านทานโรค 4 ยีนได้แก่ $Tm-2^a$, Mi , $I2$ และ $Ph-3$ ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502



ภาพที่ 2 แผนผังการสร้าง gene pyramiding รวมยีนต้านทานโรค 4 ยีนได้แก่ $Tm-2^a$, Mi , $I2$ และ $Ph-3$ ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีกาพิย์ 3

4. การคัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์

4.1 สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีของ Fulton *et al.* (1995)

ในการสกัดดีเอ็นเอของมะเขือเทศโดยเก็บใบอ่อนจากส่วนยอด หรือ ใบเลี้ยงของ ต้นกล้ามะเขือเทศใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ที่ผสมใหม่ก่อนใช้ (DNA extraction buffer, Nuclei lysis buffer และ 5 เปอร์เซ็นต์ Sarkosyl ในอัตราส่วน 2.5 : 2.5 : 1 และเติม NaHSO_4 0.3-0.5 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ pH 8.0) เติมบัฟเฟอร์ที่ผสมไว้ลงในแต่ละหลอดของใบพืช โดยใช้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บดใบพืชด้วยสว่านไฟฟ้าที่ติดหัวบดพลาสติกจนละเอียด แล้วเติม บัฟเฟอร์อีก 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) ปริมาตรเท่าตัว ผสมให้เข้ากันนำไปปั่น เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบน ออกใส่หลอดใหม่ ประมาณ 500 ไมโครลิตร เติม isopropanol ปริมาตรเท่าตัว แล้วพลิกหลอดเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และล้างตะกอน ดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทเอทานอลทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอไปอบให้แห้งที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 10 นาที จากนั้นละลายตะกอน ดีเอ็นเอโดยเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จนดีเอ็นเอละลายนำสารละลายดีเอ็นเอไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้ในขั้นตอน ต่อไป

4.2 การตรวจสอบด้วยวิธี CAPS

4.2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 25-100 นาโนกรัม 10X PCR buffer 1 มิลลิโมล dNTPs 1.5 มิลลิโมล MgCl_2 ไพรเมอร์ 1 ไมโครโมล (ประกอบด้วย forward 0.5 ไมโครโมล และ reverse 0.5 ไมโครโมล) และ Taq DNA polymerase 0.2 ยูนิต ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาดำเนินการด้วยเครื่องควบคุม อุณหภูมิอัตโนมัติดังต่อไปนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นปรับอุณหภูมิ ให้ลดลงเป็น 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1-2.30 นาที (ขึ้นกับชนิดไพรเมอร์ที่ใช้) เพิ่มปริมาณทั้งหมด 35 รอบ

4.2.2 จากนั้นตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วย
เอ็นไซม์ตัดจำเพาะตามชนิดของดีเอ็นเอเครื่องหมายดังตารางที่ 1 ตรวจสอบผลโดยการแยกชิ้นส่วน
ดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์



ตารางที่ 1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกยีนต้านทานโรค 4 ยีน ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อรวมยีนต้านทานโรค

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	ยีน	ลักษณะ	โครโมโซม	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)		อ้างอิง
					S	R	
Mi2	<i>Mi</i>	ต้านทาน Nematode	6	<i>Hinf</i> I	450	360	Messeguer <i>et al.</i> , 1991
TG591	<i>Ph-3</i>	ต้านทาน Late blight	9	<i>Hinf</i> I	355	255	Chunwongse <i>et al.</i> , 2002
PrRuG248/249	<i>Tm-2^a</i>	ต้านทาน TMV	9	<i>Acc</i> I	370	595	Sobir <i>et al.</i> , 2000
S20	<i>I2</i>	ต้านทาน Fusarium wilt	11	<i>Dra</i> I + <i>Hha</i> I	900	835	Sarfatti <i>et al.</i> , 1989

หมายเหตุ S = ขนาดแถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะอ่อนแอ (susceptible genotype)

R = ขนาดแถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะต้านทาน (resistance genotype)

การทดลองที่ 2 สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 (SD3) ให้มียีน *Brix9-2-5* ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ soluble solid content และยีนต้านทานโรคหลายชนิด

1. พันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

1.1 พันธุ์รับ (recurrent parents)

มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 (SD3) ที่ปรับปรุงพันธุ์ให้มียีน *Mi* ต้านทานโรครากปม และยีน *Ty-2* ต้านทานโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ ได้แก่ TOMAC 461 (NIL P502-*Mi*) TOMAC 584 (NIL P502-*Ty-2*) TOMAC 460 (NIL SD3-*Mi*) และ TOMAC 583 (NIL SD3-*Ty-2*) และมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ที่ปรับปรุงพันธุ์โดยการรวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน จากการทดลองที่ 1

1.2 พันธุ์ให้ (donor parents)

มะเขือเทศที่มียีน *brix 9-2-5* ในตำแหน่ง 9-2-5 บนโครโมโซม 9 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเพิ่มขึ้นของปริมาณ soluble solid content (SSC) ได้แก่

1.2.1 มะเขือเทศสายพันธุ์ *S. lycopersicum* IL 9-1-3 ที่ได้รับยีน *brix 9-2-5* จากมะเขือเทศพันธุ์ *S. pennellii* (Eshed and Zamir, 1995) จาก Tomato Genetic Research Center มหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย วิทยาเขตเดวิส ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.2 มะเขือเทศป่าพันธุ์ *S. pimpinellifolium* WVa700 ที่มีปริมาณ SSC สูง มีลักษณะผลกลม-เล็ก

2. การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ SSC และลักษณะต้านทานโรคหลายชนิด

2.1 ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มียีน *Lin5* และ *Lin7* เพื่อเพิ่มปริมาณ SSC โดยการสร้างลูกผสม (F_1) ระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 (SD3) ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ (recurrent parents) ผสมเข้ากับต้นพันธุ์ให้ (donor parents) ที่มียีน *Lin5* และ *Lin7* ทั้งหมด 4 คู่ ดังนี้

- NIL P502- *Mi* x IL 9-1-3

- NIL P502-*Ty*-2 x WVa700

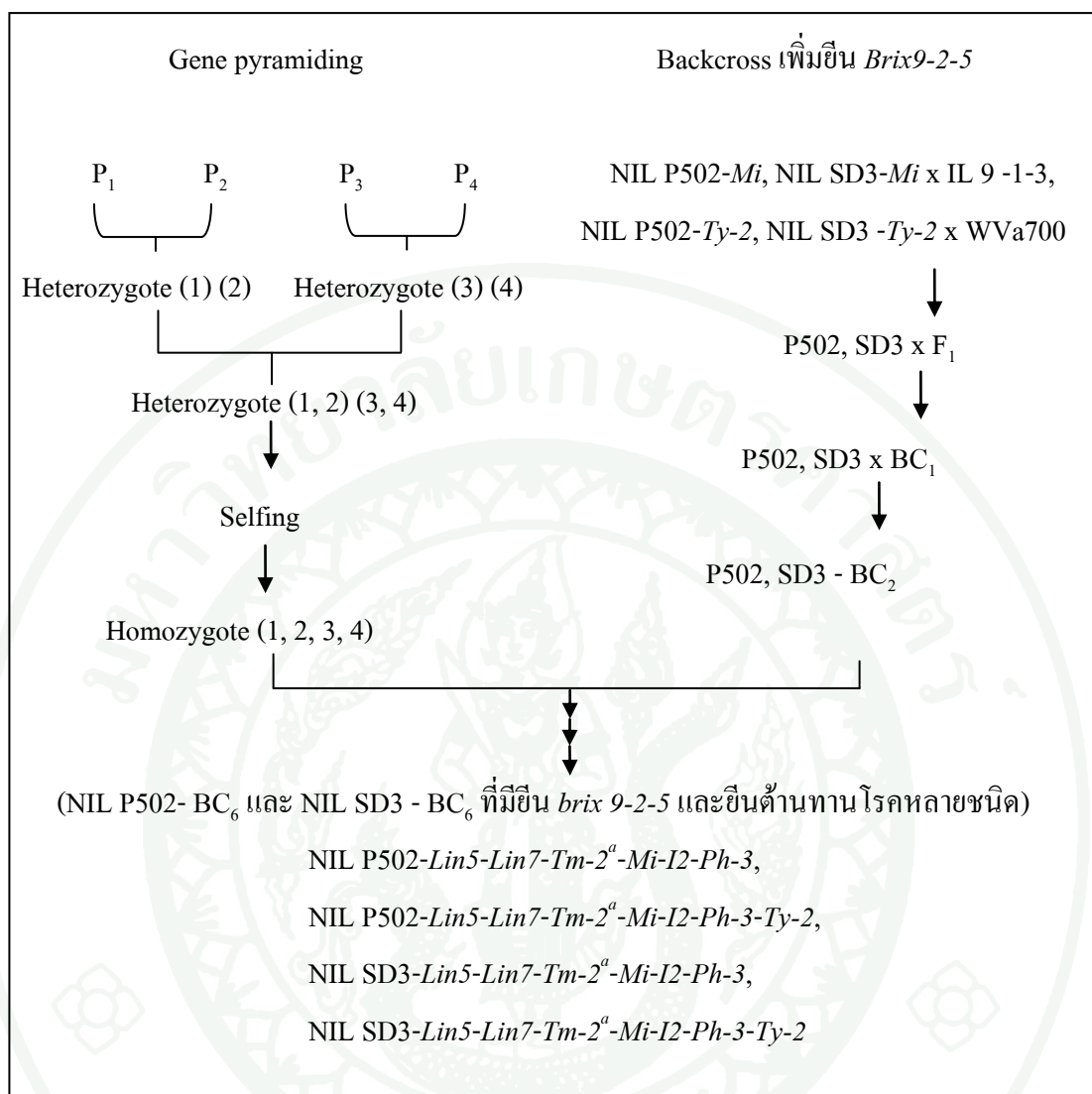
- NIL SD3-*Mi* x IL 9-1-3

- NIL SD3-*Ty*-2 x WVa700

โดยคัดเลือกลูกผสมในรุ่น F_1 ของแต่ละคู่ผสมให้มียีนที่ต้องการด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย *Lin5* และ *Lin7* และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ควบคุมความสามารถในการต้านทานโรค ได้แก่ *Mi2* และ *Ty2* ดังตารางที่ 2

2.2 จากนั้นนำต้นที่ได้จากการคัดเลือกในรุ่น F_1 ของแต่ละคู่ผสมกลับ (backcross: BC) ไปยังพันธุ์รับ (recurrent parent) ที่เป็นต้นแม่ของแต่ละคู่ผสมแล้วคัดเลือกให้ได้ต้นลูกผสมกลับที่มียีนที่ต้องการด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย

2.3 ผสมมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic line: NIL) ที่มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีนที่ได้จากการรวมยีนต้านทานโรคของการทดลองที่ 1 เข้ากับมะเขือเทศลูกผสมกลับของพันธุ์ P502 หรือ สิดาทิพย์ 3 ที่มียีน *Lin5* และ *Lin7* จากนั้นทุกรุ่นของการผสมจะผสมกลับไปยังสายพันธุ์รับที่ได้จากการทดลอง 1 ประมาณ 6 ชั่วโมง จนได้ลูกผสมกลับที่มีลักษณะต่างๆ เหมือนต้นแม่แต่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณ SSC เพิ่มขึ้น และยีนต้านทานโรคชนิดต่างๆ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แผนผังการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์ P502 และสีกาทิพย์ 3 ให้มียีน *Brix 9-2-5* และยีนต้านทานโรคหลายชนิด

กำหนดให้ P_1 คือ NIL P502-*Tm-2^a*, NIL SD3- *Tm-2^a*

P_2 คือ NIL P502-*Mi*, NIL SD3- *Mi*

P_3 คือ NIL P502-*I2*, NIL SD3- *I2*

P_4 คือ NIL P502-*Ph-3*, NIL SD3- *Ph-3*

3. การคัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์ และลักษณะทางฟีโนไทป์

3.1. การคัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์

3.1.2 Positive selection

การคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมกลับของทั้ง 4 กลุ่มผสม โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคชนิดต่างๆ และยีนที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ soluble solid content (SSC) ในมะเขือเทศด้วยวิธี Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีของ Fulton *et al.* (1995) และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลักษณะต้านทานโรค และลักษณะ SSC จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยามาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามชนิดของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างทางจีโนไทป์ดังที่แสดงในตารางที่ 2 นำไปป่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม ตรวจสอบความแตกต่างด้วยเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ หรือตรวจสอบความแตกต่างด้วยแผ่นเจลอะครีลาไมด์ 4.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

3.1.3 Negative selection หรือ Background selection

กลุ่มผสม NIL SD3-Ty-2 กับ WVa700 หลังจากคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรค และยีนที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ SSC จากนั้นนำต้นลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกมาตรวจสอบในระดับจีโนไทป์ให้มีพันธุกรรมพื้นฐานทั่วไปในบริเวณอื่นๆ ของจีโนมเหมือนกับพันธุ์รับ (recurrent parent) มากที่สุดด้วยเทคนิค negative selection หรือ background selection ช่วยคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมกลับในแต่ละรุ่น เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีของ Fulton *et al.* (1995) และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (simple sequence repeat: SSR) ทั้งหมด 80 ตำแหน่ง ครอบคลุม 12 โครโมโซมมะเขือเทศ ที่มีระยะห่างแต่ละดีเอ็นเอเครื่องหมายประมาณ 25 cM และคัดเลือกต้นลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนของจีโนมเหมือนกับพันธุ์รับ (recurrent parent) มากที่สุดของแต่ละรุ่นเพื่อนำไปใช้เป็นต้นพ่อแม่ในการผสมกลับรุ่นต่อไป ตรวจสอบความแตกต่างด้วยแผ่นเจลอะครีลาไมด์ 4.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

ตารางที่ 2 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบยีนต่างๆ ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีปริมาณ SSC สูงและต้านทานโรคหลายชนิด

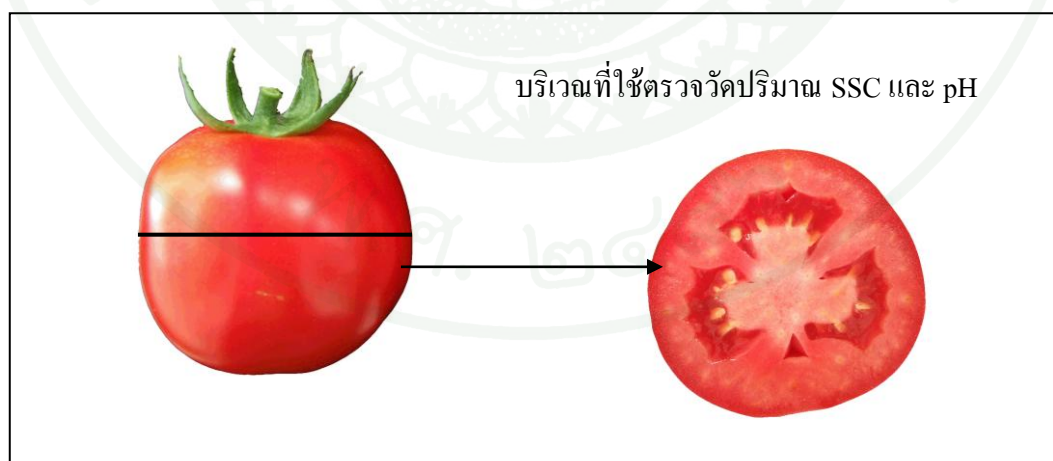
ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	ยีน	ลักษณะ	โครโมโซม	เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)		อ้างอิง
					พันธุ์รับ	พันธุ์ให้	
Mi2	<i>Mi</i>	ต้านทาน Nematode	6	<i>Hinf</i> I	360	450	Messeguer <i>et al.</i> , 1991
TG591	<i>Ph-3</i>	ต้านทาน Late blight	9	<i>Hinf</i> I	255	355	Chunwongse <i>et al.</i> , 2002
PrRuG248/249	<i>Tm-2^a</i>	ต้านทาน TMV	9	<i>Acc</i> I	595	370	Sobir <i>et al.</i> , 2000
S20	<i>I2</i>	ต้านทาน Fusarium wilt	11	<i>Dra</i> I + <i>Hha</i> I	835	900	Sarfatti <i>et al.</i> , 1989
Ty2	<i>Ty-2</i>	ต้านทาน TYLCV	11	<i>Taq</i> I	350	220	Hanson <i>et al.</i> , 2000
Lin5	<i>Lin5</i>	ปริมาณ SSC	9	<i>Mse</i> I	126,180	114,176	Fridman and Zamir, 2003
Lin7	<i>Lin7</i>	ปริมาณ SSC	9	<i>Mse</i> I	214,211	236,214	Fridman and Zamir, 2003

3.2 การคัดเลือกลักษณะทางฟีโนไทป์

ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของต้นลูกผสมกลับที่ได้จากการคัดเลือกในระดับจีโนไทป์ โดยการตรวจวัดปริมาณ SSC ด้วยเครื่อง hand refractometer ของบริษัท ATAGO รุ่น E type series (N-1E brix 0~32 %) ตรวจวัด pH ด้วย pH paper (Universalindikator pH 0 -14) และลักษณะทั่วไป เช่น สีและรูปร่าง ของผลมะเขือเทศที่มีอายุประมาณ 35-40 วัน หลังดอกบานจำนวน 5-10 ผลต่อต้น โดยการตัดแบ่งครึ่งผลมะเขือเทศแล้วนำส่วนล่างของผลไปตรวจวัดปริมาณ SSC และ pH ดังภาพที่ 4 จากนั้นคัดเลือกต้นที่มีปริมาณ SSC สูงและมีลักษณะทั่วไปตรงตามลักษณะที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการผสมกลับของแต่ละรุ่น

4. เปรียบเทียบวิธีการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ

เปรียบเทียบการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศระหว่างการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้การผสมกลับ 6 ชั่วรุ่น ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนที่ต้องการ (positive selection) และการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้การผสมกลับ 3 ชั่วรุ่นร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนที่ต้องการ (positive selection) และใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกต้นลูกผสมที่มีพันธุกรรมพื้นฐานทั่วไปเหมือนกับสายพันธุ์รับ (negative selection หรือ background selection)



ภาพที่ 4 การตรวจวัดปริมาณ SSC และ pH ในผลของมะเขือเทศ

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของลูกผสมกลับที่ได้จากการเพิ่มยีนต้านทานโรค และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณ SSC และการใช้เทคนิค negative selection ของคู่ผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700 โดยนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GGT 2.0 (Berloo, 2008) เพื่อช่วยศึกษาสัดส่วนพันธุกรรมพื้นฐานของจีโนมและยีนที่ต้องการ

สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม และศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

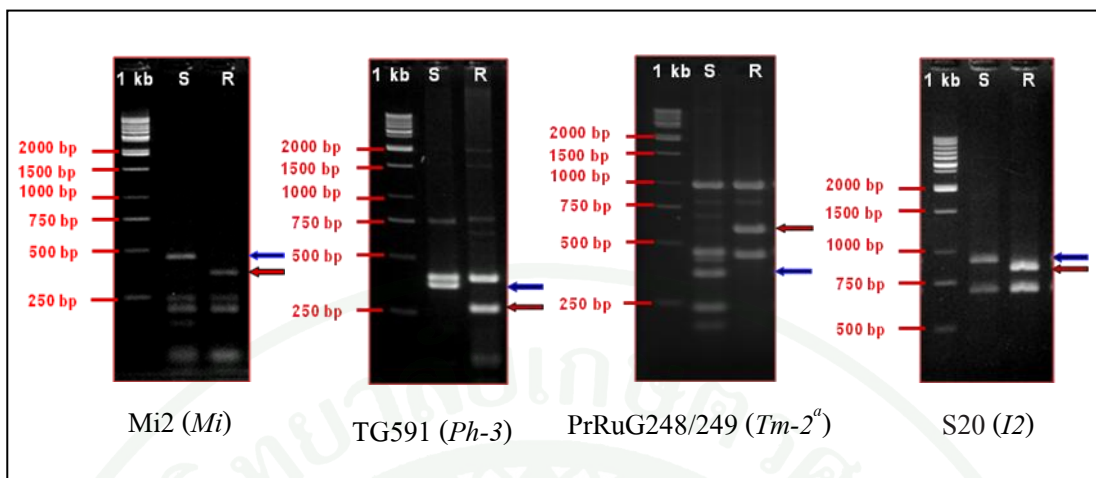
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์รับ (recurrent parent) ที่มียีนควบคุมความต้านทานโรค 4 ยีน โดยการรวมยีนต้านทานโรคในแต่ละตำแหน่ง (gene pyramiding)

จากการผสมพันธุ์มะเขือเทศเพื่อรวมยีนต้านทานโรคลักษณะต่างๆ ทั้ง 4 ยีน ได้แก่ ยีน *Mi* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรครากปมจากไส้เดือนฝอยรากปมที่อยู่บนโครโมโซม 6 ยีน *Ph-3* ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* race 3 ที่อยู่บนโครโมโซม 9 ยีน *Tm-2^a* ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) ที่อยู่บนโครโมโซม 9 และยีน *I2* ควบคุมลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 ที่อยู่บนโครโมโซม 11 ไว้ในต้นเดียวกัน โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคของมะเขือเทศทั้ง 4 ยีน ดังตารางที่ 1 ช่วยคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับจีโนไทป์ พบว่า สามารถคัดเลือกมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีนได้ในรุ่นที่ 3 และ 4 ของการผสมพันธุ์

การคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ในรุ่นที่ 2 นั้น ได้คัดเลือกในมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 สายพันธุ์ละสองชั่วเพื่อคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มีลักษณะตามที่ต้องการสายพันธุ์ละ 2 ต้น โดยได้คัดเลือกในมะเขือเทศพันธุ์ P502 ทั้งหมด 125 ต้น พบต้นที่ยีนมีลักษณะเฮเทอโรไซโกตทั้งหมด 2 ต้น (คัดเลือกประมาณ 62 ต้นต่อต้นที่มีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีน จำนวน 1 ต้น) ในมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ได้คัดเลือกทั้งหมด 108 ต้น พบต้นที่ยีนมีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีน ทั้งหมด 2 ต้น (คัดเลือก 54 ต้นต่อต้นที่มีลักษณะเฮเทอโรไซโกต 4 ยีน จำนวน 1 ต้น) ในรุ่นที่ 3 ที่คัดเลือกให้ได้ต้นมะเขือเทศที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน ได้คัดเลือกในมะเขือเทศพันธุ์ P502 ทั้งหมด 244 ต้น พบต้นที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต 3 ยีน เฮเทอโรไซโกต 1 ยีน จำนวน 8 ต้น และที่เป็นโฮโมไซโกต 4 ยีน จำนวน 1 ต้น ส่วนมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 คัดเลือกทั้งหมด 254 ต้น พบต้นที่เป็นโฮโมไซโกต 3 ยีน เฮเทอโรไซโกต 1 ยีน จำนวน 2 ต้น แต่ยังไม่พบต้นที่มีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน โดยในการศึกษาต้องการคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มียีนทั้ง 4 ยีนให้อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน จึงนำต้นที่มีลักษณะโฮโมไซโกต 3 ยีน เฮเทอโรไซโกต 1 ยีน ของทั้งสองสายพันธุ์มาผสมตัวเอง และคัดเลือกในรุ่นที่ 4 พบว่า สามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มียีนอยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีนได้ โดยในพันธุ์ P502 สามารถคัดเลือกได้จำนวน 3 ต้น และพันธุ์สิดาทิพย์ 3 สามารถคัดเลือกได้จำนวน 12 ต้น

จากการศึกษาเพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์รับ (recurrent parent) ให้มียืนด้านทานโรคทั้ง 4 ยีน พบว่า สามารถคัดเลือกมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนด้านทานโรคทั้ง 4 ยีน อยู่ในลักษณะไฮโมไซโกตในมะเขือเทศสายพันธุ์ P502 ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ NIL P502-4DR # 96-6, NIL P502-4DR # 96-10, NIL P502-4DR # 96-11 และ NIL P502-4DR # 188 (ภาพที่ 7) ในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ได้แก่ NIL SD3-4DR # 1-7, NIL SD3-4DR # 1-11, NIL SD3-4DR # 1-13, NIL SD3-4DR # 1-21, NIL SD3-4DR # 1-22, NIL SD3-4DR # 1-26, NIL SD3-4DR # 1-30, NIL SD3-4DR # 32-3, NIL SD3-4DR # 32-7, NIL SD3-4DR # 32-12, NIL SD3-4DR # 32-14 และ NIL SD3-4DR # 32-18 (ภาพที่ 8) คัดเลือกสายพันธุ์ 96-10 ของมะเขือเทศพันธุ์ P502 (NIL P502- 4DR # 96-10) และสายพันธุ์ 32-14 ของมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 (NIL SD3- 4DR # 32-14) ไปใช้เป็นสายพันธุ์รับ (recurrent parents) ในการทดลองที่ 2 สำหรับปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ soluble solid content (SSC) และยืนด้านทานโรคหลายชนิด เนื่องจากเมื่อศึกษารูปทรงผลและลักษณะทั่วไปของมะเขือเทศหลังการรวมยืนด้านทานโรคทั้ง 4 ยีนแล้ว พบว่า มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้จากการรวมยืนของพันธุ์ P502 สายพันธุ์ที่ 96-10 (NIL P502-4DR # 96-10) มีลักษณะของผลเป็นทรงกลม สีผลส้ม-แดง ใกล้เคียงกับพันธุ์ P502 ส่วนมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สิดาทิพย์ 3 สายพันธุ์ที่ 32-14 (NIL SD3-4DR # 32-14) พบว่า ผลมีลักษณะรีและสีผลแดงชมพูใกล้เคียงกับพันธุ์สิดาทิพย์ 3 จึงคัดเลือกมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์นี้ไปใช้เป็นสายพันธุ์รับ (recurrent parents) ในการผสมกลับของการทดลองที่ 2 เพื่อทำการเพิ่มยืนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ SSC ต่อไป



ภาพที่ 5 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ของการคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอ เครื่องหมายชนิด CAPS ที่คัดเลือกรุ่นต้านทานโรค 4 รุ่น ได้แก่ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย Mi2, TG591, PrRuG248/249 และ S20

1 kb

= 1 Kb ladder

S

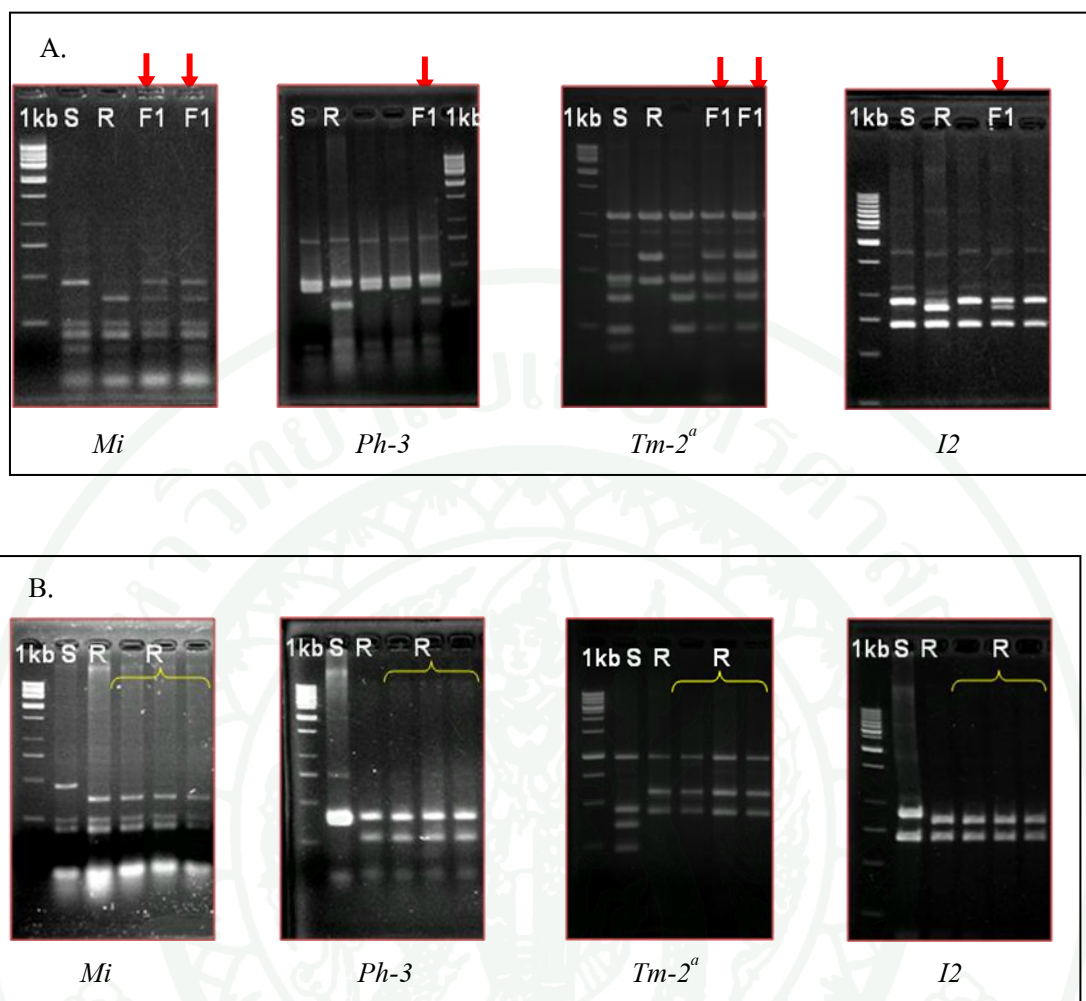
= ลักษณะ susceptible genotypes ของพันธุ์อ่อนแอ

R

= ลักษณะ resistant genotypes ของพันธุ์ต้านทาน

ลูกศร

= แถบดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทาน (R) และพันธุ์อ่อนแอ (S) ที่ยีนมีลักษณะโฮโมไซโกต



ภาพที่ 6 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ในการคัดเลือกลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด CAPS A. การคัดเลือกลูกผสมในรุ่นที่ 2 ที่คัดเลือกขึ้นทั้ง 4 ยีน ให้มีลักษณะเฮเทอโรไซโกต B. การคัดเลือกลูกผสมในรุ่นที่ 3 ที่คัดเลือกขึ้นทั้ง 4 ยีน ให้มีลักษณะโฮโมไซโกต

1 kb = 1 Kb ladder

S = ลักษณะ Susceptible genotypes

R = ลักษณะ Resistant genotypes

F₁ = ต้นลูกผสมที่มียีนที่คัดเลือกอยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต

↓ = ต้นลูกผสมที่คัดเลือกในรุ่นที่ 2 ที่ยีนมีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซโกตทั้ง 4 ยีน

ตารางที่ 3 ลักษณะของยีนต้านทานโรคแต่ละตำแหน่งที่ได้จากการรวมยีน (gene pyramiding) ในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 ในรุ่นที่ 3 และ 4

พันธุ์	Generations	ต้นเบอร์	Genotype scoring*			
			<i>I2</i>	<i>Tm-2^a</i>	<i>Ph-3</i>	<i>Mi</i>
NIL P502	3	96	3	3	3	2
NIL P502	3	148	3	3	3	2
NIL P502	3	150	3	3	2	3
NIL P502	3	152	3	3	3	2
NIL P502	3	174	2	3	3	3
NIL P502	3	188	3	3	3	3
NIL P502	3	199	3	3	3	2
NIL P502	3	203	3	3	2	3
NIL P502	3	216	3	3	3	2
NIL P502	4	96-6	3	3	3	3
NIL P502	4	96-10	3	3	3	3
NIL P502	4	96-11	3	3	3	3

หมายเหตุ Genotype scoring* 2 = Heterozygous gene

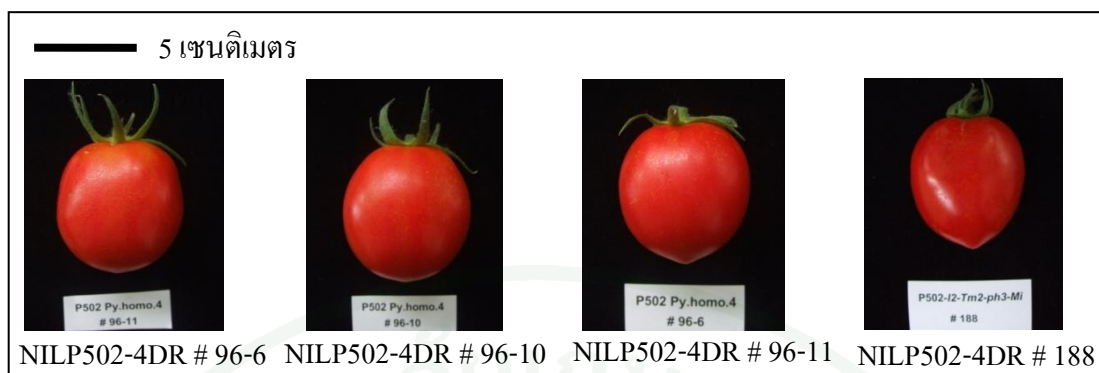
3 = Homozygous dominant gene

ตารางที่ 4 ลักษณะของยีนต้านทานโรคแต่ละตำแหน่งที่ได้จากการรวมยีน (gene pyramiding) ในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 (SD3) ในรุ่นที่ 3 และ 4

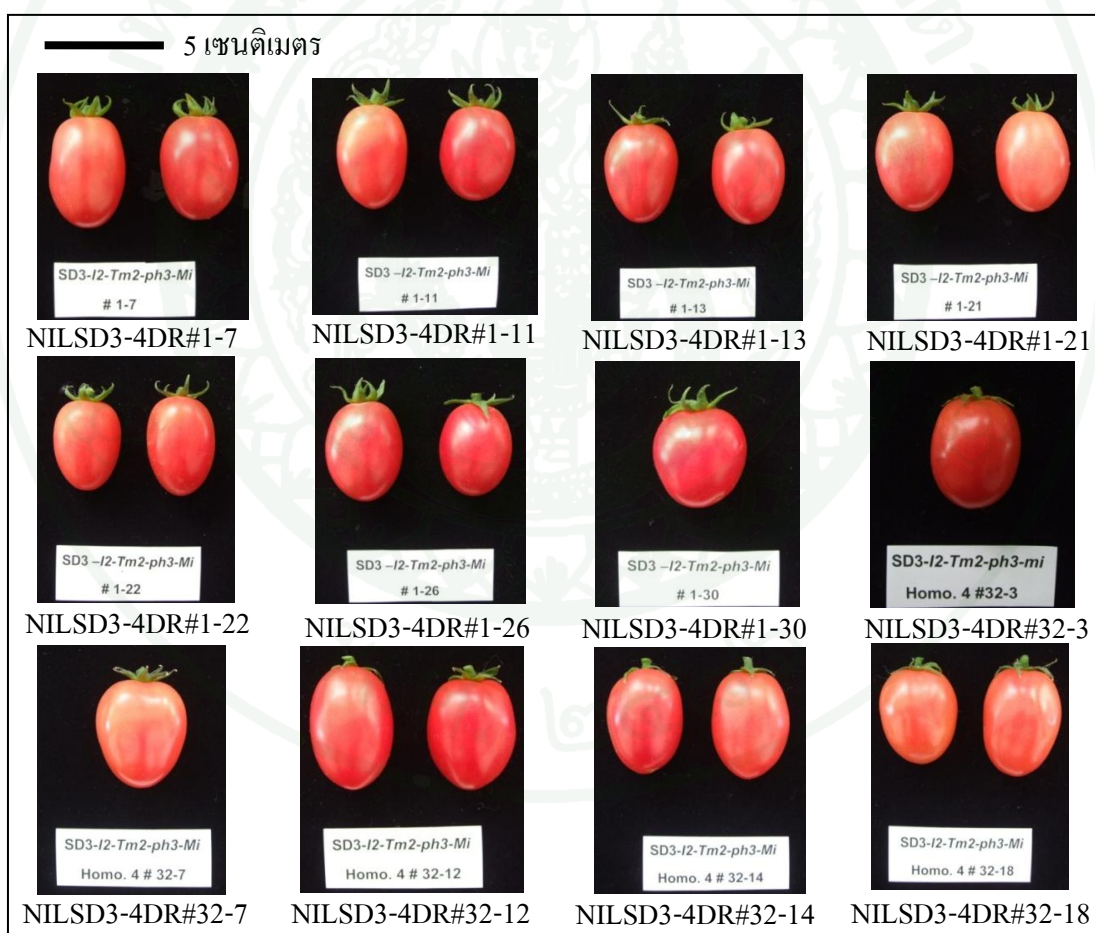
พันธุ์	Generations	ต้นเบอร์	Genotype scoring*			
			<i>I2</i>	<i>Tm-2^a</i>	<i>Ph-3</i>	<i>Mi</i>
NIL SD3	3	1	3	2	3	3
NIL SD3	3	32	3	3	3	2
NIL SD3	4	1-7	3	3	3	3
NIL SD3	4	1-11	3	3	3	3
NIL SD3	4	1-13	3	3	3	3
NIL SD3	4	1-21	3	3	3	3
NIL SD3	4	1-22	3	3	3	3
NIL SD3	4	1-26	3	3	3	3
NIL SD3	4	1-30	3	3	3	3
NIL SD3	4	32-3	3	3	3	3
NIL SD3	4	32-7	3	3	3	3
NIL SD3	4	32-12	3	3	3	3
NIL SD3	4	32-14	3	3	3	3
NIL SD3	4	32-18	3	3	3	3

หมายเหตุ Genotype scoring* 2 = Heterozygous gene

3 = Homozygous dominant gene



ภาพที่ 7 ลักษณะผลมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 ที่รวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน (NIL P502-4DR) ได้แก่ ยีน *I2 Tm-2^a Ph-3* และ *Mi*



ภาพที่ 8 ลักษณะผลมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีกาทิพย์ 3 ที่รวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน (NIL SD3-4DR) ได้แก่ ยีน *I2 Tm-2^a Ph-3* และ *Mi*

A. NIL P502-4DR # 96-10



5 เซนติเมตร



B. NIL SD3-4DR # 32-14



5 เซนติเมตร



ภาพที่ 9 ลักษณะทรงต้นและผลของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่ได้จากการรวมยีนต้านทานโรค ทั้ง 4 ยีน ในสายพันธุ์ที่คัดเลือกนำไปใช้เป็นสายพันธุ์รับ (recurrent parents) ในการผสมกลับของการทดลองที่ 2

A. มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 สายพันธุ์ 96-10 (NIL P502-4DR # 96-10)

B. มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 สายพันธุ์ 32-14 (NIL SD3-4DR # 32-14)

การทดลองที่ 2 สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 (SD3) ให้มียีน *Brix9-2-5* ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ soluble solid content และยีนต้านทานโรคหลายชนิด

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อสร้างสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต่างๆ ที่ต้องการ นิยมใช้การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (backcross: BC) เพื่อถ่ายทอดยีนที่ต้องการเข้าสู่พันธุ์ปลูก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับเพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดให้มียีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ soluble solid content (SSC) และยีนต้านทานโรคหลายชนิด โดยการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 (SD3) ที่มียีนต้านทาน *Mi* ได้แก่ NIL P502-*Mi* และ NIL SD3-*Mi* เข้ากับมะเขือเทศที่มียีน *Brix9-2-5* เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ SSC ได้แก่ *S. lycopersicum* IL9-1-3 ที่ได้รับยีนจากมะเขือเทศพันธุ์ *S. pennellii* และการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ที่มียีนต้านทาน *Ty-2* ได้แก่ NIL P502-*Ty-2* และ NIL SD3-*Ty-2* เข้ากับมะเขือเทศที่มีปริมาณ SSC สูง ได้แก่ *S. pimpinellifolium* 'WVa700'

การศึกษาความแตกต่างของจีโนมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย

จากการศึกษาความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศในระดับดีเอ็นเอ (% DNA polymorphism) ของแต่ละคู่ผสมทั้ง 4 คู่ผสม ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (simple sequence repeat: SSR) ทั้งหมด 80 ตำแหน่ง ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมมะเขือเทศพบว่า ค่าความแตกต่างของจีโนมระหว่างมะเขือเทศปลูกพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 กับมะเขือเทศปลูก IL9-1-3 มีค่าความแตกต่างของจีโนมระหว่างคู่ผสมเท่ากับ 3.8 และ 10 ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศปลูกพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 กับมะเขือเทศป่าพันธุ์ WVa700 ที่เป็นการผสมข้ามชนิดพบว่า มีค่าความแตกต่างของจีโนมที่มากกว่าการผสมระหว่างมะเขือเทศที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันโดยมีค่าเท่ากับ 27.8 และ 25 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

การคัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์

ในแต่ละรุ่นของการผสมกลับได้คัดเลือกต้นลูกผสมกลับของทั้ง 4 กลุ่ม ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะด้านทานโรคชนิดต่างๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย *Mi2* ใช้ในการคัดเลือกยีน *Mi* ที่อยู่บนโครโมโซม 6 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย *TG591* ใช้ในการคัดเลือกยีน *Ph-3* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย *PrRuG248/249* ใช้ในการคัดเลือกยีน *Tm-2^a* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย *S20* ใช้ในการคัดเลือกยีน *I2* ที่อยู่บนโครโมโซม 11 และดีเอ็นเอเครื่องหมาย *Ty2* ใช้ในการคัดเลือกยีน *Ty-2* ที่อยู่บนโครโมโซม 11 และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ soluble solid content (SSC) ได้แก่ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย *Lin5* ใช้ในการคัดเลือกยีน *Lin5* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 และดีเอ็นเอเครื่องหมาย *Lin7* ใช้ในการคัดเลือกยีน *Lin7* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 ของมะเขือเทศ เป็นการคัดเลือกในระดับจีโนไทป์ที่มีลักษณะเป็น Positive selection โดยใช้วิธี Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) ในการคัดเลือกลูกผสมกลับแต่ละรุ่น โดยผลที่ได้จากการคัดเลือกยีนที่ต้องการในแต่ละกลุ่มได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 6, 7, 8 และ 9)

การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับจีโนไทป์ที่ได้จากกลุ่มผสม NIL P502-*Mi* กับ IL9-1-3 ในรุ่นการผสมกลับชั่วที่ 1 และ 2 ที่ใช้ NIL P502-*Mi* เป็นสายพันธุ์รับ ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ของลูกผสมกลับที่ได้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีน *Mi* และลักษณะ SSC สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีน *Lin5* และ *Lin7* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต และยีน *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกตได้ และในการผสมกลับชั่วที่ 3 และ 4 ของการผสมกลับที่ใช้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แข่งที่มียีนด้านทานโรค 4 ยีน (NIL P502-4DR # 96-10) ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเป็นสายพันธุ์รับ ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ของลูกผสมกลับที่ได้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนด้านทานโรคทั้ง 4 ยีน ได้แก่ ยีน *I2*, *Tm-2^a*, *Ph-3* และ *Mi* ร่วมกับยีน *Lin5* และ *Lin7* จากการคัดเลือกลูกผสมกลับของมะเขือเทศพันธุ์ P502 ในชั่วที่ 4 รุ่นที่ 1 (BC₄F₁) สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์มียีน *Lin5*, *Lin7*, *I2*, *Tm-2^a*, *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะต่างๆ กันดังนี้

- BC₄F₁ # 59-2-6-15 มียีน *Lin5*, *Lin7* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2*, *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₄F₁ # 59-2-6-18 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ph-3* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₄F₁ # 59-2-6-21, BC₄F₁ # 59-2-6-28 และ BC₄F₁ # 59-2-6-29 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ph-3*, *I2* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับจีโนไทป์ที่ได้จากกลุ่มผสม NIL SD3-*Mi* กับ IL9-1-3 ในรุ่นการผสมกลับชั่วที่ 1 และ 2 ที่ใช้ NIL SD3-*Mi* เป็นสายพันธุ์รับ สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีน *Lin5* และ *Lin7* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต และยีน *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกตได้ และในการผสมกลับชั่วที่ 3 และ 4 ของการผสมกลับที่ใช้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน (NIL SD3-4DR # 32-14) ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเป็นสายพันธุ์รับ จากการคัดเลือกลูกผสมกลับของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ในชั่วที่ 4 รุ่นที่ 1 (BC₄F₁) สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์มียีน *Lin5*, *Lin7*, *I2*, *Tm-2^a*, *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะต่างๆ กันดังนี้

- BC₄F₁ # 28-11-21-18 มียีน *Lin5*, *Lin7* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2*, *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₄F₁ # 59-2-10-11, BC₄F₁ # 59-2-12-5 และ BC₄F₁ # 59-2-12-19 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ph-3* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₄F₁ # 59-2-12-7 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *I2* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₄F₁ # 59-2-12-24 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *I2*, *Ph-3* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับจีโนไทป์ที่ได้จากกลุ่มผสม NIL P502-*Ty-2* กับ WVa700 ในรุ่นการผสมกลับชั่วที่ 1 ที่ใช้ NIL P502-*Ty-2* เป็นสายพันธุ์รับ ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ของลูกผสมกลับที่ได้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีน *Ty-2* และลักษณะ SSC สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีน *Lin5* และ *Lin7* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต และยีน *Ty-2* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกตได้ และในการผสมกลับชั่วที่ 2 และ 3 ของการผสมกลับที่ใช้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน (NIL P502-4DR # 96-10) มาเป็นสายพันธุ์รับ ตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ของลูกผสมกลับที่ได้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคทั้ง 5 ยีน ได้แก่ ยีน *Ty-2*, *I2*, *Tm-2^a*, *Ph-3* และ *Mi* ร่วมกับยีน *Lin5* และ *Lin7* จากการคัดเลือกลูกผสมกลับของมะเขือเทศพันธุ์ P502 ในชั่วที่ 3 รุ่นที่ 1 (BC₃F₁) สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับได้ทั้งหมด

12 สายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์มียีน *Lin5*, *Lin7*, *I2*, *Tm-2^a*, *Ph-3*, *Mi* และ *Ty-2* อยู่ในลักษณะต่างๆ กันดังนี้

- BC₃F₁ # 28-8-1 และ BC₃F₁ # 29-15-14 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2*, *Tm-2^a*, *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₃F₁ # 28-8-3, BC₃F₁ # 28-13-1 และ BC₃F₁ # 29-15-12 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2*, *Tm-2^a* และ *Mi* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *Ph-3* และ *I2* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₃F₁ # 28-8-6 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2*, *I2* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₃F₁ # 28-13-4, BC₃F₁ # 29-7-4, BC₃F₁ # 29-15-1 และ BC₃F₁ # 29-15-23 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2*, *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₃F₁ # 29-15-4 และ BC₃F₁ # 29-15-17 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2*, *Tm-2^a* และ *Ph-3* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

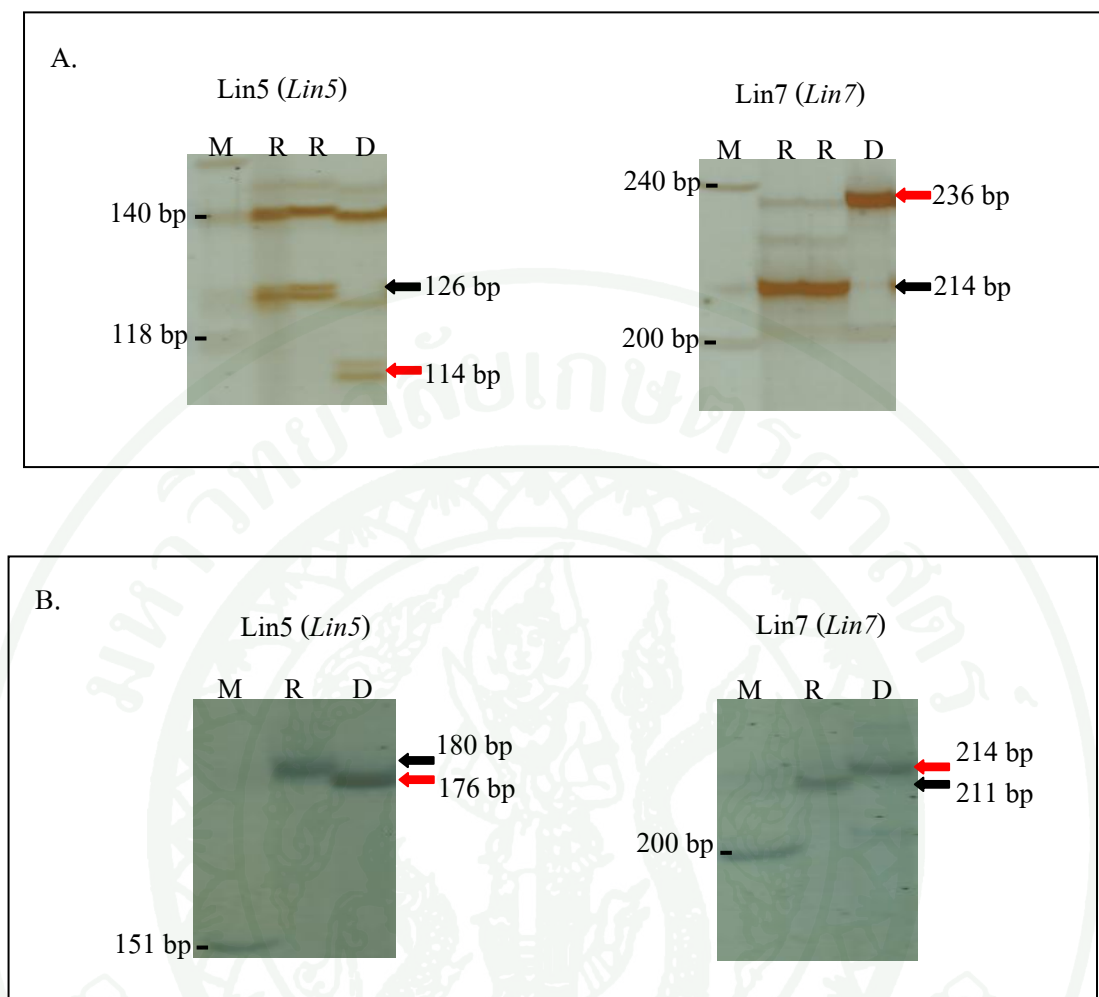
การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับจีโนไทป์ที่ได้จากกลุ่มผสม NIL SD3-*Ty-2* กับ WVa700 ในรุ่นการผสมกลับชั่วที่ 1 ที่ใช้ NIL SD3-*Ty-2* เป็นสายพันธุ์รับ สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีน *Lin5* และ *Lin7* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต และยีน *Ty-2* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกตได้ และในการผสมกลับชั่วที่ 2 และ 3 ของการผสมกลับที่ใช้มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน (NIL SD3-4DR # 32-14) เป็นสายพันธุ์รับ จากการคัดเลือกลูกผสมกลับของมะเขือเทศพันธุ์สีกาทิพย์ 3 ในชั่วที่ 3 รุ่นที่ 1 (BC₃F₁) สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับได้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ โดยในแต่ละสายพันธุ์มียีน *Lin5*, *Lin7*, *I2*, *Tm-2^a*, *Ph-3*, *Mi* และ *Ty-2* อยู่ในลักษณะต่างๆ กันดังนี้

- BC₃F₁ # 55-16-2, BC₃F₁ # 55-16-12 และ BC₃F₁ # 101-7-20 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2* และ *Tm-2^a* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2*, *Ph-3* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₃F₁ # 55-16-18 และ BC₃F₁ # 101-7-10 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2*, *Tm-2^a* และ *Ph-3* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *I2* และ *Mi* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต

- BC₃F₁ # 101-9-12 มียีน *Lin5*, *Lin7*, *Ty-2*, *Tm-2^a* และ *Mi* อยู่ในลักษณะเฮเทอโรไซโกต ส่วนยีน *Ph-3* และ *I2* อยู่ในลักษณะโฮโมไซโกต





ภาพที่ 10 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอะคริลาไมด์ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ในการคัดเลือกว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย *Lin5* และ *Lin7* ที่ใช้คัดเลือกรุ่น *Lin5* และ *Lin7* ของแต่ละกลุ่มผสม

- A. ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการคัดเลือกรุ่น *Lin5* และ *Lin7* ของกลุ่มผสม NIL P502-*Mi* x IL 9-1-3 และ NIL SD3-*Mi* x IL 9-1-3 ที่ใช้ IL 9-1-3 เป็นสายพันธุ์ให้
- B. ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการคัดเลือกรุ่น *Lin5* และ *Lin7* ของกลุ่มผสม NIL P502-*Ty*-2 x WVa700 และ NIL SD3-*Ty*-2 x WVa700 ที่ใช้ WVa700 เป็นสายพันธุ์ให้

M = DNA marker ϕ X 174 / *Hinf*I

R = recurrent parent

D = donor parent

ลูกศร = แถบดีเอ็นเอที่ใช้แยกความแตกต่างของมะเขือเทศระหว่างสายพันธุ์รับ (recurrent parent) และสายพันธุ์ให้ (donor parent)

ตารางที่ 5 ค่าความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ (% DNA polymorphism) ของจีโนมมะเขือเทศที่ตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR

	NILP502 <i>Mix</i> 9-1-3	NILP502 <i>Ty</i> -2xWva700	NILSD3 <i>Mix</i> 9-1-3	NILSD3 <i>Ty</i> -2xWva700
จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ทดสอบ	79	79	80	80
จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่าง	3	22	8	20
ค่าความแตกต่างระดับดีเอ็นเอ (%)	3.8	27.8	10	25

ตารางที่ 6 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC₄F₁ ของคู่ NIL P502 -*Mi* x IL 9-1-3

พันธุ์	ค่าเฉลี่ย SSC		SSC เพิ่มขึ้นจาก P502 (%)	Genotype scoring*					
	± SD	pH		<i>Lin5</i>	<i>Lin7</i>	<i>I2</i>	<i>Tm-2^a</i>	<i>Ph-3</i>	<i>Mi</i>
NIL P502- <i>Mi</i>	4.3 ± 0	4	-	1	1	1	1	1	3
NIL P502-4DR # 96-10	4.2 ± 0.1	4	-	1	1	3	3	3	3
IL 9-1-3	4.2 ± 0.4	4	-	3	3	1	1	1	1
F ₁ (NIL P502- <i>Mi</i> x IL 9-1-3)	5.1 ± 0.4	4							
BC ₄ F ₁ (NIL P502-4DR # 96-10 x BC ₃)									
BC ₄ F ₁ # 59-2-6-15	5.1 ± 0.3	4	20.5	2	2	3	2	3	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-6-18	5.1 ± 0.2	4	20.8	2	2	3	2	2	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-6-21	5.6 ± 0.6	4	32.1	2	2	2	2	2	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-6-28	5.7 ± 0.3	4	34.4	2	2	2	2	2	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-6-29	5.3 ± 0.4	4	24.3	2	2	2	2	2	3

หมายเหตุ Genotype scoring* 1 = Homozygous recessive gene 2 = Heterozygous gene 3 = Homozygous dominant gene

DR = Disease Resistance

ตารางที่ 7 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC₄F₁ ของคู่ NIL SD3 -*Mi* x IL 9-1-3

พันธุ์	ค่าเฉลี่ย SSC		SSC เพิ่มขึ้นจาก SD3 (%)	Genotype scoring*					
	± SD	pH		<i>Lin5</i>	<i>Lin7</i>	<i>I2</i>	<i>Tm-2^a</i>	<i>Ph-3</i>	<i>Mi</i>
NIL SD3- <i>Mi</i>	4.6 ± 0	4	-	1	1	1	1	1	3
NIL SD3-4DR # 32-14	4 ± 0.2	4	-	1	1	3	3	3	3
IL 9-1-3	4.2 ± 0.4	4	-	3	3	1	1	1	1
F ₁ (NIL SD3- <i>Mi</i> x IL 9-1-3)	4.7 ± 0.6	4							
BC ₄ F ₁ (NIL SD3-4DR # 32-14 x BC3)									
BC ₄ F ₁ # 28-11-21-18	5.1 ± 0.4	4	19.3	2	2	3	2	3	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-10-11	6.1 ± 0.1	4	41.4	2	2	3	2	2	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-12-5	6.3 ± 0.7	4	46.5	2	2	3	2	2	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-12-7	5.6 ± 0.4	4	29.5	2	2	2	2	3	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-12-19	5.4 ± 0.4	4	26.3	2	2	3	2	2	3
BC ₄ F ₁ # 59-2-12-24	5.5 ± 0.5	4	28.4	2	2	2	2	2	3

หมายเหตุ Genotype scoring* 1 = Homozygous recessive gene 2 = Heterozygous gene 3 = Homozygous dominant gene

DR = Disease Resistance

ตารางที่ 8 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC₃F₁ ของคู่ NIL P502 -Ty-2x WVa700

พันธุ์	ค่าเฉลี่ย SSC	SSC เพิ่มขึ้นจาก P502		Genotype scoring*						
	± SD	pH	(%)	<i>Lin5</i>	<i>Lin7</i>	<i>I2</i>	<i>Tm-2^a</i>	<i>Ph-3</i>	<i>Mi</i>	<i>Ty-2</i>
NIL P502-Ty-2	4.8 ± 0.2	4.3	-	1	1	1	1	1	1	3
NIL P502-4DR # 96-10	4.2 ± 0.1	4	-	1	1	3	3	3	3	1
WVa700	7.7 ± 0.3	4	-	3	3	1	1	1	1	1
F ₁ (NIL P502-Mi x WVa700)	5.9 ± 0.2	4								
BC ₃ F ₁ (NIL P502-4DR # 96-10 x BC ₂)										
BC ₃ F ₁ # 28-8-1	5.3 ± 0.7	4	26.4	2	2	3	2	2	2	2
BC ₃ F ₁ # 28-8-3	5.4 ± 0.3	4	27.9	2	2	3	2	3	2	2
BC ₃ F ₁ # 28-8-6	5.5 ± 0.7	4	30.2	2	2	3	2	3	2	2
BC ₃ F ₁ # 28-13-1	5.9 ± 0.4	4	41.4	2	2	3	2	3	2	2
BC ₃ F ₁ # 28-13-4	5.6 ± 0.5	4	34.3	2	2	3	2	3	3	2
BC ₃ F ₁ # 29-7-4	5.5 ± 0.5	4	31.9	2	2	3	2	3	3	2
BC ₃ F ₁ # 29-15-1	5.7 ± 0.3	4	35.7	2	2	3	2	3	3	2

ตารางที่ 8 (ต่อ) ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC₃F₁ ของคู่ NIL P502 -Ty-2 x WVa700

พันธุ์	ค่าเฉลี่ย SSC		SSC เพิ่มขึ้นจาก P502 (%)	Genotype scoring*						
	± SD	pH		<i>Lin5</i>	<i>Lin7</i>	<i>I2</i>	<i>Tm-2^a</i>	<i>Ph-3</i>	<i>Mi</i>	<i>Ty-2</i>
BC ₃ F ₁ # 29-15-4	5.5 ± 0.3	4	30.9	2	2	3	2	2	3	2
BC ₃ F ₁ # 29-15-12	5.4 ± 0.5	4	29.3	2	2	3	2	3	2	2
BC3F1 # 29-15-14	5.4 ± 0.4	4	27.6	2	3	2	2	2	2	2
BC3F1 # 29-15-17	5.9 ± 0.3	4	39.3	2	3	2	2	3	2	2
BC3F1 # 29-15-23	5.9 ± 0.2	4	40.2	2	3	2	3	3	2	2

หมายเหตุ Genotype scoring* 1 = Homozygous recessive gene 2 = Heterozygous gene 3 = Homozygous dominant gene
DR = Disease Resistance

ตารางที่ 9 ค่า soluble solid content ที่เพิ่มขึ้นและลักษณะจีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคในลูกผสมรุ่น BC₃F₁ ของคู่ NIL SD3-Ty-2 x WVa700

พันธุ์	ค่าเฉลี่ย	SSC เพิ่มขึ้น			Genotype scoring*						
	SSC ± SD	pH	จาก SD3 (%)	% ที่เหมือน SD3	<i>Lin5</i>	<i>Lin7</i>	<i>I2</i>	<i>Tm-2^a</i>	<i>Ph-3</i>	<i>Mi</i>	<i>Ty-2</i>
NIL SD3- <i>Ty-2</i>	4.3 ± 0.4	4	-	-	1	1	1	1	1	1	3
NIL SD3-4DR # 32-14	4 ± 0.2	4	-	-	1	1	3	3	3	3	1
WVa700	7.7 ± 0.3	4	-	-	3	3	1	1	1	1	1
F ₁ (NIL SD3-Mi x WVa700)	6.8 ± 0.5	4									
BC ₃ F ₁ (NIL SD3-4DR # 32-14 x BC ₂)											
BC ₃ F ₁ # 55-16-2	6 ± 0.4	4	39.5	95	2	2	3	2	3	3	2
BC ₃ F ₁ # 55-16-12	6 ± 0.6	4	39.5	95	2	2	3	2	3	3	2
BC ₃ F ₁ # 55-16-18	6 ± 0.8	4	39.5	95	2	2	3	2	2	3	2
BC ₃ F ₁ # 101-7-10	5.2 ± 0.1	4	20.9	90	2	2	3	2	2	3	2
BC ₃ F ₁ # 101-7-20	5 ± 0	4	16.3	90	2	2	3	2	3	3	2
BC ₃ F ₁ # 102-9-12	5.4 ± 0.3	4	26.3	90	2	2	3	2	3	2	2

หมายเหตุ Genotype scoring* 1 = Homozygous recessive gene 2 = Heterozygous gene 3 = Homozygous dominant gene

DR = Disease Resistance

การคัดเลือกลักษณะทางฟีโนไทป์

ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของลูกผสมกลับทุกคู่ผสมทั้ง 4 คู่ผสม หลังจากคัดเลือกด้วย ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนที่ต้องการ (marker assisted selection) จากนั้นนำลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกมาตรวจวัดปริมาณ soluble solid content (SSC) ในผลมะเขือเทศด้วยเครื่อง hand refractometer ของบริษัท ATAGO รุ่น E type series (N-1E brix 0~32 %) เพื่อใช้ตรวจสอบต้นลูกผสมกลับที่ได้จากการคัดเลือก พบว่า ลูกผสมกลับที่ได้จากคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 กับ IL9-1-3 ในรุ่น BC₄F₁ มีปริมาณ SSC เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.1-5.7 โดยมีเปอร์เซ็นต์ SSC เพิ่มขึ้นจากพันธุ์ P502 ประมาณ 20.5-34.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) ลูกผสมกลับที่ได้จากคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 กับ IL9-1-3 ในรุ่น BC₄F₁ มีปริมาณ SSC เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.1-6.3 โดยมีเปอร์เซ็นต์ SSC เพิ่มขึ้นจากพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ประมาณ 19.3-46.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) ลูกผสมกลับที่ได้จากคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 กับ WVa700 ในรุ่น BC₃F₁ มีปริมาณ SSC เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.3-5.9 โดยมีเปอร์เซ็นต์ SSC เพิ่มขึ้นจากพันธุ์ P502 ประมาณ 26.4-41.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) และลูกผสมกลับที่ได้จากคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 กับ WVa700 ในรุ่น BC₃F₁ มีปริมาณ SSC เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5-6 โดยมีเปอร์เซ็นต์ SSC เพิ่มขึ้นจากพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ประมาณ 16.3-39.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

การตรวจวัด pH ด้วย pH paper (Universalindikator pH 0-14) ในการคัดเลือกลูกผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีปริมาณ SSC สูง โดยหลังจากคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายในลูกผสมกลับแต่ละรุ่นทั้ง 4 คู่ผสม และตรวจวัดปริมาณ SSC แล้วนำต้นที่มีปริมาณ SSC สูงมาตรวจวัด pH พบว่า ลูกผสมกลับในรุ่น BC₄F₁ ของคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 กับ IL9-1-3 มีค่าความเป็นกรดที่ได้จากการวัดประมาณ 4 และลูกผสมกลับในรุ่น BC₃F₁ ของคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 กับ WVa700 มีค่าความเป็นกรดที่ได้จากการวัดประมาณ 4 โดยค่าที่วัดได้จากลูกผสมของทั้ง 4 คู่ มีค่าเท่ากับมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 ที่นำมาใช้เป็นสายพันธุ์รับ

การศึกษารูปร่างผลและลักษณะทั่วไปของมะเขือเทศหลังจากรวมยีนด้านทานโรคและยีนที่เกี่ยวกับปริมาณ SSC พบว่า ลูกผสมกลับในชั่วรุ่น BC₄F₁ ของคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 กับ IL9-1-3 มีลักษณะผลของมะเขือเทศเป็นทรงกลม สีผลส้ม-แดง ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับพันธุ์ P502 (ภาพที่ 11) ลูกผสมกลับในรุ่น BC₄F₁ ของคู่ผสมระหว่าง

มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 กับ IL9-1-3 มีลักษณะผลของมะเขือเทศมีลักษณะกลม-รี สีผลออกส้มแดง (ภาพที่ 12) ลูกผสมกลับในรุ่น BC_3F_1 ของคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 กับ WVa700 ผลของมะเขือเทศมีลักษณะเป็นทรงกลม สีผลส้ม-แดง ขนาดผลเล็กกว่าพันธุ์ P502 เล็กน้อย (ภาพที่ 13) และลูกผสมกลับในรุ่น BC_3F_1 ของคู่ผสมระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดาทิพย์ 3 กับ WVa700 ผลของมะเขือเทศมีลักษณะ กลม-รี สีผลชมพูส้ม-แดง (ภาพที่ 14)

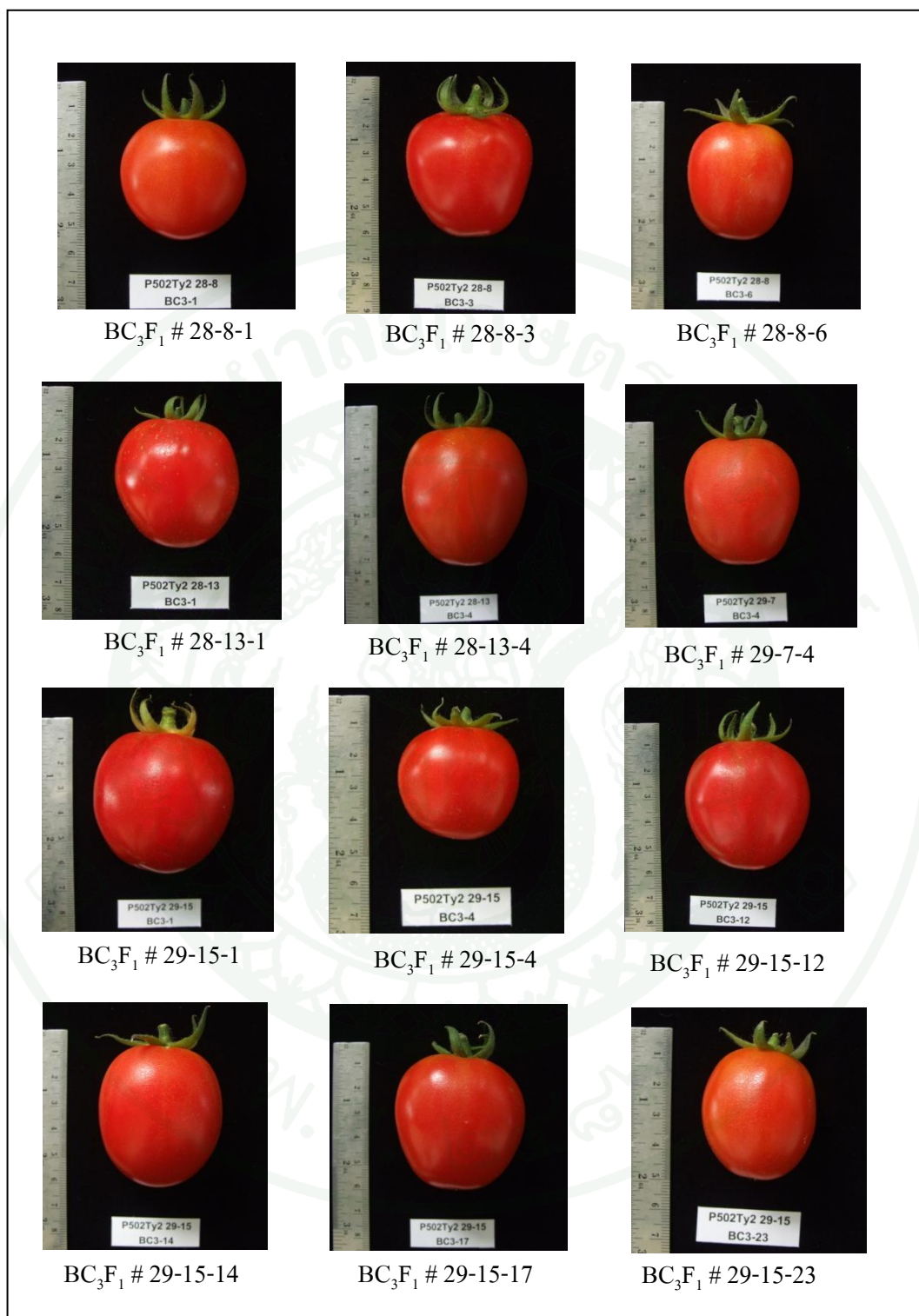
ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนต่างๆ ที่ต้องการ จะต้องคัดเลือกต้นลูกผสมกลับที่มียืนที่ต้องการทุกลักษณะทั้งลักษณะด้านทานโรคและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ SSC อีกทั้งต้องศึกษาลักษณะทั่วไปของลูกผสมที่ได้ว่าตรงตามลักษณะที่ต้องการในแต่ละคู่ผสมเพื่อนำไปใช้ในการผสมกลับในแต่ละรุ่น



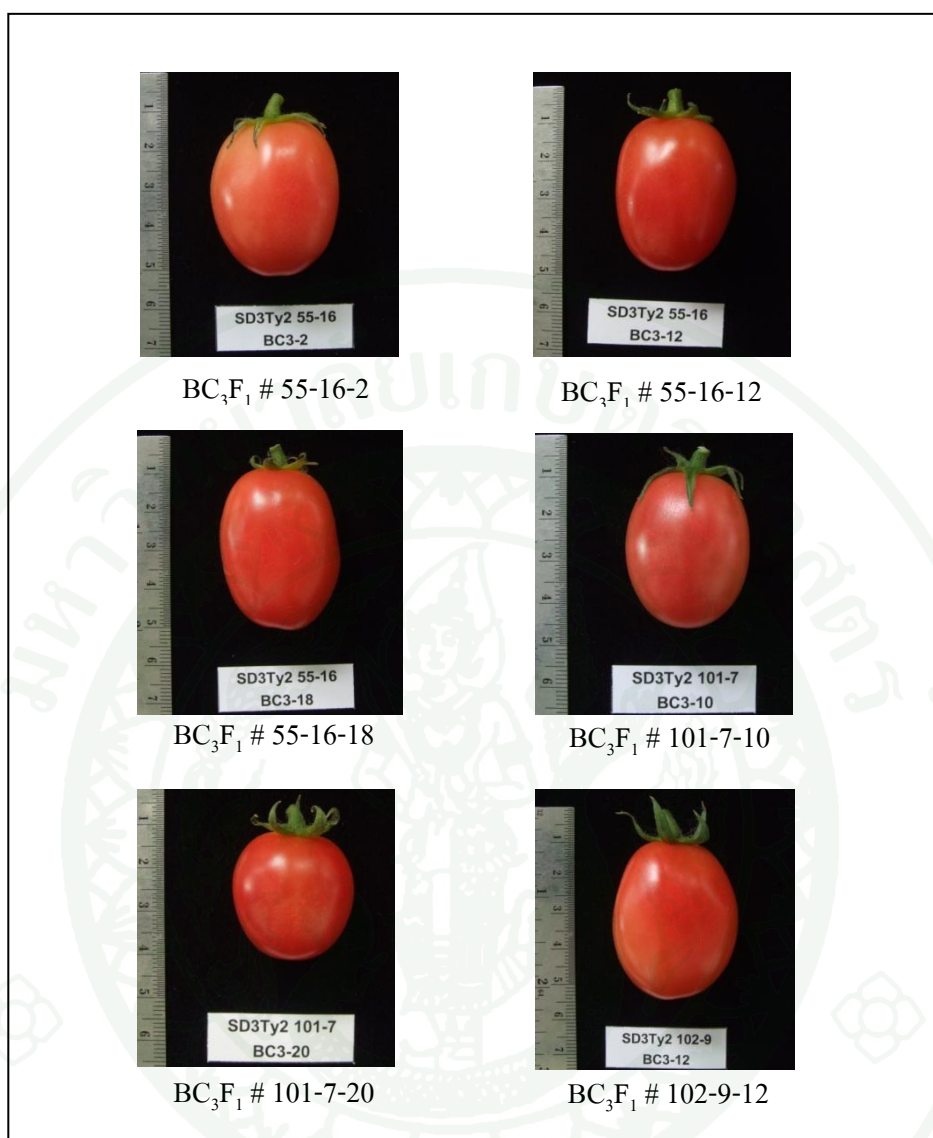
ภาพที่ 11 ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC₄F₁ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ P502 กับ IL9-1-3



ภาพที่ 12 ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC₄F₁ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 กับ IL9-1-3



ภาพที่ 13 ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC₃F₁ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ P502 กับ WVa700

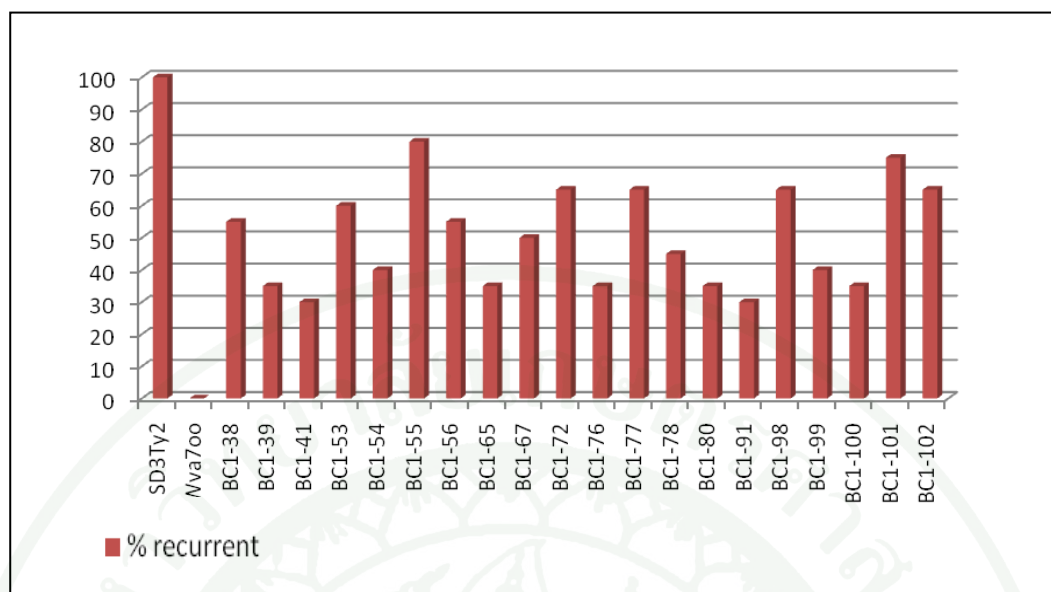


ภาพที่ 14 ลักษณะผลของมะเขือเทศในรุ่น BC₃F₁ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ สีดาทิพย์ 3 กับ WVa700

Negative selection (Background selection)

การคัดเลือกลูกผสมกลับด้วยเทคนิค negative selection หรือ background selection ของ
 กลุ่มระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดำทิพย์ 3 กับ WVa700 (NIL SD3-Ty-2 x WVa700)
 ในรุ่นที่ 1 ของการคัดเลือกได้ปลูกลูกผสมกลับชั่วที่ 1 รุ่นที่ 1 (BC_1F_1) ทั้งหมด 102 ต้น หลังจาก
 คัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย Lin5 และ Lin7 ที่สัมพันธ์กับยีน *Brix 9-2-5* แล้วนำต้นลูกผสมที่มี
 ยีนมาตรวจวัดปริมาณ soluble solid content (SSC) และคัดเลือกต้นลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ที่มี
 ปริมาณ SSC สูงทั้งหมด 20 ต้น มาตรวจสอบจีโนมของลูกผสมกลับด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด
 SSR จากการศึกษพบว่า ลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ที่นำมาทำ negative selection นั้นมีเปอร์เซ็นต์ของ
 จีโนมที่เหมือนกับพันธุ์รับที่แตกต่างกัน โดยเปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการศึกษามีตั้งแต่ 30 ถึง 80
 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) จากนั้นคัดเลือกต้นที่มีค่า SSC สูง และมีเปอร์เซ็นต์ของจีโนมเหมือนกับ
 พันธุ์สีดำทิพย์ 3 สูง เพื่อนำไปใช้เป็นต้นพ่อแม่ในการผสมกลับชั่วที่ 2 ซึ่งต้นลูกผสมที่คัดเลือกจาก
 รุ่นที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์ของจีโนมที่เหมือนกับพันธุ์สีดำทิพย์ 3 อยู่ระหว่าง 65 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และ
 ในการคัดเลือกรุ่นต่อไปของการผสมกลับจะคัดเลือกเช่นเดียวกับรุ่นที่ 1 ผลที่ได้จากการศึกษา
 ในแต่ละรุ่นแสดงในตารางที่ 10

การใช้ negative selection ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศสามารถช่วยคัดเลือกต้น
 ลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนของจีโนมที่เหมือนกับพันธุ์รับได้อย่างรวดเร็ว จากการศึกษจีโนมของ
 ลูกผสมกลับชั่วที่ 4 รุ่นที่ 1 (BC_4F_1) ของกลุ่ม NIL SD3-Ty-2 x WVa700 พบว่า ลูกผสมกลับรุ่น
 BC_4F_1 ที่คัดเลือกได้มีเปอร์เซ็นต์จีโนมเหมือนพันธุ์สีดำทิพย์ 3 อยู่ระหว่าง 90 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์
 ทำให้ช่วยลดจำนวนรุ่นของการปรับปรุงพันธุ์ลงได้



ภาพที่ 15 สัดส่วนของจีโนมในลูกผสมกลับรุ่น BC₁F₁ ที่เหมือนกับพันธุ์ผู้ติดาพิย 3 (% recurrent) จากการศึกษาด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายของกลุ่มผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700

ตารางที่ 10 เปอร์เซนต์จีโนมของมะเขือเทศลูกผสมกลับในรุ่นต่างๆ ในลูกผสมกลับรุ่น BC₁F₁ ของกลุ่มผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700

Generations	Expected		Observed	
	% Recurrent parent	% Donor parent	% Recurrent parent	% Donor parent
F ₁	50	50	50	50
BC ₁	75	25	65-80	20-35
BC ₂	87.5	12.5	80-90	10-20
BC ₃	93.75	6.25	90-95	5-10
BC ₄	96.88	3.12	95-100	0-5
BC ₅	98.44	1.56	ND	ND
BC ₆	99.22	0.78	ND	ND

หมายเหตุ ND = no data

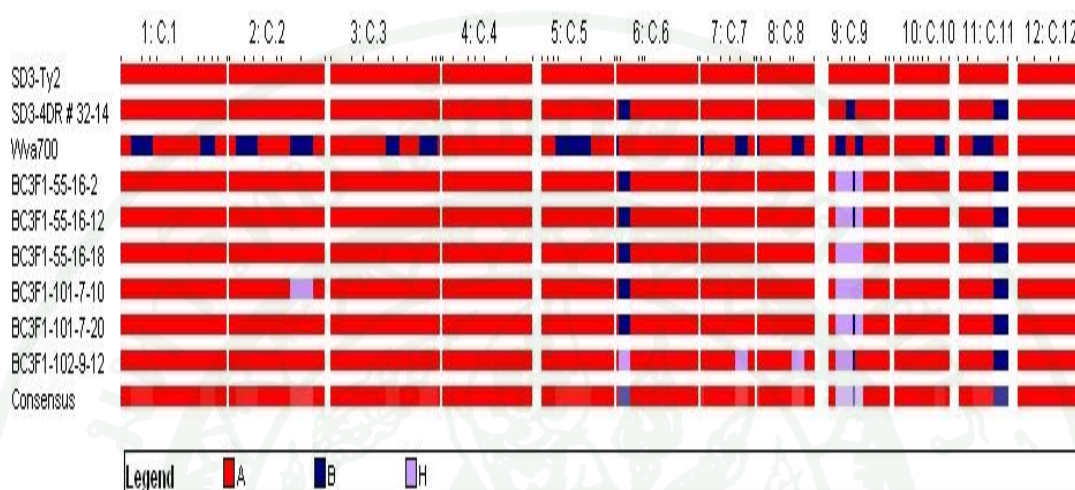
จากการสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนที่ต้องการ โดยใช้การผสมกลับเข้ากับสายพันธุ์รับ 6 ช่วงรุ่น และใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนที่ช่วยคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ 3 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสม NIL P502-*Mi* x IL9-1-3, NIL SD2-*Mi* x IL9-1-3 และ NIL P502-*Ty*-2 x WVa700 โดยในคู่ผสม NIL P502-*Mi* x IL9-1-3 และ NIL SD2-*Mi* x IL9-1-3 ที่ปรับปรุงพันธุ์ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 4 รุ่นที่ 1 (BC_4F_1) พบว่า ลูกผสมกลับที่คัดเลือกได้มีเปอร์เซ็นต์จีโนมที่เหมือนกับสายพันธุ์รับ (% Recurrent parent) ที่เป็นค่าทางทฤษฎี เท่ากับ 96.88 เปอร์เซ็นต์ เหลือเปอร์เซ็นต์จีโนมที่เหมือนกับสายพันธุ์ให้ (% Donor parent) เท่ากับ 3.12 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในคู่ผสม NIL P502-*Ty*-2 x WVa700 ที่ปรับปรุงพันธุ์ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 3 รุ่นที่ 1 (BC_3F_1) พบว่า ลูกผสมกลับที่ได้มีเปอร์เซ็นต์จีโนมที่เหมือนกับสายพันธุ์รับ (% Recurrent parent) ที่เป็นค่าทางทฤษฎี เท่ากับ 93.75 เปอร์เซ็นต์ และเหลือเปอร์เซ็นต์จีโนมที่เหมือนกับสายพันธุ์ให้ (% Donor parent) เท่ากับ 6.25 เปอร์เซ็นต์

คู่ผสม NILSD3-*Ty*-2 x WVa700 ที่ใช้การผสมกลับเข้ากับสายพันธุ์รับร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนที่ต้องการ และใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (simple sequence repeat: SSR) มาช่วยตรวจสอบจีโนมของต้นลูกผสมกลับเพื่อคัดเลือกลูกผสมที่มีพันธุกรรมพื้นฐานทั่วไปเหมือนกับสายพันธุ์รับพบว่า สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับชั่วที่ 4 รุ่นที่ 1 (BC_4F_1) ที่มีเปอร์เซ็นต์ของจีโนมที่เหมือนกับสายพันธุ์รับ (% Recurrent parent) อยู่ระหว่าง 95-100 เปอร์เซ็นต์ และเหลือสัดส่วนของจีโนมที่เหมือนกับสายพันธุ์ให้ (% Donor parent) อยู่ระหว่าง 0-5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

การศึกษา Graphical genotype

การใช้โปรแกรม GGT 2.0 ช่วยศึกษาจีโนมของลูกผสมกลับชั่วที่ 3 รุ่นที่ 1 (BC_3F_1) ของคู่ผสม NIL SD3-*Ty*-2 x WVa700 หลังจากทำ negative selection หรือ background selection เนื่องจากโปรแกรม GGT สามารถช่วยแสดงภาพรวมของโครโมโซมทั้ง 12 โครโมโซมมะเขือเทศ โดยโปรแกรมจะแสดงเป็นแท่งโครโมโซมจำลอง หรือ graphical genotype จากการศึกษา graphical genotype ของลูกผสมกลับชั่วที่ 3 รุ่นที่ 1 (BC_3F_1) ในคู่ผสม NIL SD3-*Ty*-2 x WVa700 พบว่า ลูกผสมกลับที่ได้จากการคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ BC_3F_1 # 55-16-2, BC_3F_1 # 55-16-12, BC_3F_1 # 55-16-18, BC_3F_1 # 101-7-10, BC_3F_1 # 101-7-20 และ BC_3F_1 # 102-9-12 มีสัดส่วนของจีโนมเกือบทุกตำแหน่งบนโครโมโซมเป็นแถบสีแดงที่ใช้แทนบริเวณจีโนมที่มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์รับ (recurrent parent) ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ NIL SD3-*Ty*-2

และ NIL SD3-4DR # 32-14 ยกเว้นในบริเวณที่มียีนต้านทานโรค ได้แก่ ยีน *Mi* (โครโมโซม 6) *Tm-2^a* (โครโมโซม 9), *Ph-3* (โครโมโซม 9), *I2* (โครโมโซม 11) และ *T-y2* (โครโมโซม 11) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ SSC ได้แก่ ยีน *Lin5* และ *Lin7* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 (ภาพที่ 16) ที่มีแถบสีเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน



ภาพที่ 16 graphical genotype ของมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดำทิพย์ 3 ในการผสมกลับรุ่น BC_3F_1 ของคู่ผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700

C 1- C 12 = Chromosome 1 - Chromosome 12 ของมะเขือเทศ

■ A = ลักษณะจีโนมของพันธุ์รับ (Recurrent parent)

■ B = ลักษณะจีโนมของพันธุ์ให้ (Donor parent)

■ H = ลักษณะจีโนมที่มีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซโกต

วิจารณ์

การทดลองที่ 1 สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์รับ (recurrent parent) ที่มียีนควบคุมความต้านทานโรค 4 ยีน โดยการรวมยีนต้านทานโรคพืชในแต่ละตำแหน่ง (gene pyramiding)

จากการผสมพันธุ์มะเขือเทศเพื่อรวมยีนต้านทานโรคลักษณะต่างๆ ทั้ง 4 ยีน ในมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 เพื่อสร้างมะเขือเทศที่สามารถต้านทานโรคได้หลายชนิดโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือกลูกผสมให้มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน ในแต่ละรุ่น พบว่า ในรุ่นที่ 3 และ 4 ของการคัดเลือกสามารถคัดเลือกมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม โรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* โรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) และโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* ในลักษณะโฮโมไซโกตได้ทั้ง 4 ยีน การคัดเลือกของมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ในรุ่นที่ 3 ที่ยังไม่พบลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีน สามารถนำต้นที่มีลักษณะโฮโมไซโกต 3 ยีน เฮเทอโรไซโกต 1 ยีน มาผสมและคัดเลือกในรุ่นที่ 4 เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะตามต้องการได้ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Servin *et al.* (2004) ที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนเข้ามาช่วยในการรวมยีน (gene pyramiding) พบว่า สามารถรวมยีนที่มีลักษณะเป็นยีนเดี่ยวจำนวน 4 ยีนให้มาอยู่ในต้นเดียวกันในลักษณะโฮโมไซโกตได้ในรุ่นที่ 4 ของการคัดเลือก

จากการศึกษาจำนวนต้นที่ใช้คัดเลือกจริงในแต่ละรุ่นของการรวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน ในมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า จำนวนต้นที่ใช้คัดเลือกจริงในรุ่นที่ 2 ของพันธุ์ P502 ใช้จำนวนต้นในการคัดเลือกประมาณ 62 ต้น พันธุ์สิดาทิพย์ 3 ใช้จำนวนต้นในการคัดเลือกประมาณ 54 ต้น และการคัดเลือกในรุ่นที่ 3 ได้คัดเลือกในพันธุ์ P502 จำนวน 244 ต้น พันธุ์สิดาทิพย์ 3 จำนวน 254 ต้น จากผลที่ได้พบว่าจำนวนต้นที่ใช้คัดเลือกจริงมีมากกว่าค่าทางทฤษฎีที่คำนวณได้จากสูตรที่คำนวณได้จำนวนต้นที่ใช้คัดเลือกทางทฤษฎีในรุ่นที่ 2 เท่ากับ 41 ต้น ในรุ่นที่ 3 เท่ากับ 241 ต้นนั้น ทั้งนี้อาจเกิดจากการรวมยีนต้านทานโรคให้มียีนต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ TMV และโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* ที่มีตำแหน่งยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซม 9 ในบริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมเหมือนกัน และมีตำแหน่งใกล้เคียงกัน (Zhang *et al.*, 2002) ทำให้โอกาสที่จะเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีน (crossing over) ให้มาอยู่บนโครโมโซมเดียวกันเกิดขึ้นได้ยาก ดังนั้นการคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นลูกผสมที่มียีนทั้งสองอยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกันจำเป็นต้องคัดเลือกจำนวนต้นมากกว่าตามที่คำนวณได้จากสูตร ซึ่งตรงกับรายงานการศึกษาของ Servin *et al.* (2004) ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของการรวมยีน 4 ยีนใน

แบบต่างๆ ได้แก่ การรวมยีนแบบพันธุ์ประวัติ (pedigree) การรวมยีนแบบ pyramiding ที่แต่ละคู่ของยีนที่นำมาผสมกันมีตำแหน่งยีนห่างกัน และการรวมยีนแบบ pyramiding ที่แต่ละคู่ของยีนที่นำมาผสมกันมีตำแหน่งยีนใกล้กัน โดยการรวมยีนแบบพันธุ์ประวัติ (pedigree) สามารถรวมยีนให้มีลักษณะโฮโมไซโกต 4 ยีนในการคัดเลือกรุ่นที่ 5 ใช้จำนวนต้นที่นำมาคัดเลือกทั้งหมด 325 ต้น ส่วนการรวมยีนแบบ pyramiding ทั้งสองแบบสามารถรวมยีนทั้ง 4 ยีน ให้มีลักษณะโฮโมไซโกตได้ในรุ่นที่ 4 ของการคัดเลือก โดยใช้จำนวนต้นที่นำมาคัดเลือกทั้งหมด 961 ต้น และ 1001 ต้น ตามลำดับ ผลที่ได้จากการศึกษา พบว่า การรวมยีนแบบ pyramiding ใช้จำนวนรุ่นในการคัดเลือกให้ได้ต้นที่มีลักษณะที่ต้องการน้อยกว่าการรวมยีนแบบพันธุ์ประวัติแต่ใช้จำนวนต้นที่นำมาคัดเลือกมากกว่า และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการรวมยีนแบบ pyramiding ทั้งสองแบบ พบว่า คู่ของยีนที่นำมาผสมกันมีตำแหน่งของยีนห่างกันจะใช้จำนวนต้นในการคัดเลือกลดกว่าคู่ของยีนที่มีตำแหน่งใกล้กัน

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศโดยการรวมยีนต้านทานโรคเพื่อให้ต้านทานโรคหลายๆ ลักษณะนั้นต้องคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมจำนวนมากเพื่อให้ได้ต้นมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน การใช้การคัดเลือกต้นลูกผสมโดยวิธีปลูกเชื้อเพื่อทดสอบความต้านทานโรคทั้ง 4 โรค นั้นจะต้องใช้เวลาและพื้นที่มากในขณะคัดเลือก อีกทั้งผู้ที่ศึกษาจะต้องมีความรู้ความชำนาญในการทดสอบโรคทั้ง 4 โรค เพื่อที่จะคัดเลือกให้ได้ต้นมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งการคัดเลือกที่ใช้การปลูกเชื้อทดสอบโรคไม่สามารถทดสอบโรคทั้ง 4 โรค ได้พร้อมกันในด้านเดียวกันเพราะจะส่งผลให้การแสดงออกของลักษณะต้านทานโรคไม่ถูกต้อง จึงควรชำต้นมะเขือเทศออกเป็น 4 ชุด เพื่อใช้ทดสอบความต้านทานโรคแต่ละลักษณะทำให้เกิดความยุ่งยากในการคัดเลือก และการชำต้นมะเขือเทศเพื่อนำมาทดสอบโรคต้นชำที่ได้ต้องมีความสม่ำเสมอ เพราะถ้าต้นมะเขือเทศที่ชำไม่มีความสม่ำเสมอเมื่อนำมาทดสอบโรคอาจส่งผลให้การคัดเลือกต้นที่มียีนทั้ง 4 ยีนไม่ถูกต้อง (Barone and Frusciante, 2007)

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีน เข้ามาช่วยในการคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มียีนต้านทานโรคตามที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ต้องทดสอบโรคในขณะคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มีลักษณะตรงตามที่ต้องการได้ทั้งที่เป็นลักษณะเด่นและลักษณะด้อย อีกทั้งยังสามารถคัดเลือกยีนที่ต้องการได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ หรือแม้แต่การใช้เมล็ดในการคัดเลือก นอกจากนั้นยังสามารถคัดเลือกลักษณะหลายลักษณะได้พร้อมๆ กัน (จุลภาค, 2543, 2548; Tanksley *et al.*, 1989; Chunwongse *et al.*, 1993)

Yang and Francis (2005) ศึกษาการใช้ (marker assisted selection: MAS) ช่วยในการคัดเลือกเพื่อรวมยีนต้านทานโรค bacterial spot และ bacterial speck ในมะเขือเทศ พบว่า สามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนในการรวมยีนต้านทานโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีนต้านทานทั้งสองในลักษณะโฮโมไซโกตได้ โดยคัดเลือกต้นลูกผสมในรุ่น F_2 ทั้งหมด 419 ต้น พบต้นที่มียีนทั้งสองในลักษณะโฮโมไซโกตได้ 13 ต้น และจากการคัดเลือกลูกผสมรุ่น F_3 ทั้งหมด 3716 ต้น พบต้นลูกผสมที่ต้องการ 20 ต้น เมื่อนำต้นลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกทั้ง 33 ต้น ไปทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคในโรงเรือนและแปลงปลูก พบว่า ต้นลูกผสมที่ได้จากการรวมยีนสามารถต้านทานโรค bacterial spot และ bacterial speck ได้ดีทั้งที่ปลูกทดสอบในโรงเรือนและแปลงปลูก

Barone and Frusciante (2007) ใช้ MAS สำหรับการทำให้ gene pyramiding เพื่อรวมยีนต้านทานโรคในมะเขือเทศบริโภคผลสดและมะเขือเทศโรงงาน โดยการสร้างเป็นลูกผสมรุ่น F_1 ของแต่ละคู่ยีนก่อนที่จะนำมาผสมรวมกันในรุ่นต่อไป ซึ่งแต่ละรุ่นของการผสมจะตรวจสอบและคัดเลือกต้นลูกผสมที่มีจีโนไทป์ในลักษณะต้านทานโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคช่วยคัดเลือก ตัวอย่างเช่น การรวมยีนต้านทานโรคระหว่างยีน $Tm-2^a$ Frl Ve และ Pto หรือ การรวมยีนระหว่างยีน $Tm-2^a$ Frl และ $Sw-5$ เป็นต้น

Vidavski *et al.* (2008) ศึกษาการรวมยีนต้านทานโรค TYLCV จากมะเขือเทศป่าต่างชนิด (species) กัน โดยการสร้างเป็นลูกผสมรุ่น F_1 ที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่และพ่อที่มียีนต้านทานโรคในตำแหน่งที่แตกต่างกัน พบว่า ลูกผสมที่ได้มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ TYLCV ได้มากกว่าต้นแม่หรือพ่อที่นำมาผสม

การศึกษารูปทรงผลและลักษณะทั่วไปของมะเขือเทศลูกผสมหลังจากรวมยีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีนแล้ว พบว่า มะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 นั้นมีลักษณะของผลเป็นทรงกลม สีผลส้ม-แดงในทุกๆ สายพันธุ์ที่คัดเลือก โดยมีลักษณะใกล้เคียงกับสายพันธุ์รับ ส่วนมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สิดาทิพย์ 3 พบต้นที่ผลมีลักษณะกลม-รี และสีผลแตกต่างกันไป ซึ่งลักษณะที่แตกต่างกันนั้นอาจเกิดจากในต้นสายพันธุ์คู่แฝดที่ใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการปรับปรุงพันธุ์ของพันธุ์สิดาทิพย์ 3 อาจจะมีบางสายพันธุ์ที่มียีนควบคุมลักษณะผลเป็น-กลมหรือผลมีสีส้ม-แดงติดมา ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้เกิดจากการลากติดยีนที่เป็นยีนอื่นซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการหรือที่เรียกว่า Linkage drag ดังนั้นในการคัดเลือกต้นลูกผสมให้มีลักษณะทั่วไปตรงตามที่ต้องการควรคัดเลือกต้นลูกผสมให้มีจำนวนมากขึ้นเพื่อหาต้นที่เกิดรีคอมบิเนชัน (recombination) เอาส่วนของ

ยื่นที่ไม่ต้องการออกไป (จุลภาค, 2548) นอกจากนี้ควรคัดเลือกลักษณะทางการค้าลักษณะต่างๆ ของมะเขือเทศในแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายด้วยเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานโรค และลักษณะทางการค้าอื่นๆ ตรงตามที่ต้องการ



การทดลองที่ 2 สร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 (SD3) ให้มียีน *Brix9-2-5* ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ soluble solid content และยีนต้านทานโรคหลายชนิด

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ soluble solid content (SSC) และลักษณะต้านทานโรคหลายชนิดในมะเขือเทศปลูกโดยผสมพันธุ์เพื่อถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการเพิ่มของปริมาณ SSC และยีนต้านทานโรคเข้าสู่มะเขือเทศปลูกที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยคัดเลือกต้นลูกผสมที่ได้จากการผสมกลับในแต่ละรุ่นเพื่อสร้างเป็นมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสีดาทิพย์ 3 พบว่า สามารถสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์ให้มีลักษณะที่ต้องการได้

การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์

จากการศึกษาความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศทั้ง 4 คู่ผสม ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อศึกษาค่าความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ (% DNA polymorphism) ของจีโนมมะเขือเทศแต่ละคู่ผสม โดยในกลุ่มสมระหว่างมะเขือเทศปลูก (*S. lycopersicum*) สายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 หรือ สีดาทิพย์ 3 กับมะเขือเทศปลูก IL9-1-3 ที่พบว่า มีค่าความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอระหว่างคู่ผสมต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมะเขือเทศเป็นพืชผสมตัวเองที่มีเปอร์เซ็นต์การผสมตัวเองตามธรรมชาติสูง โดยมีอัตราการผสมข้ามตามธรรมชาติน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (สุทัศน์, 2528) จึงทำให้ค่าความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของจีโนมระหว่างสองคู่ผสมที่เป็นมะเขือเทศปลูกเช่นเดียวกันมีความแตกต่างกันน้อยกว่าคู่ผสมที่ผสมกันระหว่างมะเขือเทศปลูกสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 หรือ สีดาทิพย์ 3 กับมะเขือเทศ *S. pimpinellifolium* WVa700 ที่เป็นการผสมข้ามชนิด

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือกลักษณะที่ต้องการสามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมกลับที่มียีนที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพตั้งแต่ต้นพืชอยู่ในระยะต้นกล้า อีกทั้งการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายยังสามารถช่วยคัดเลือกลักษณะที่ต้องการหลายๆ ลักษณะได้พร้อมๆ กันไม่ว่าลักษณะดังกล่าวจะเป็นลักษณะทางปริมาณที่มียีนควบคุมหลายตำแหน่ง (quantitative trait loci) เสมือนเป็นยีนเดี่ยว หรือ ลักษณะต้านทานโรคพืชหลายๆ ลักษณะโดยไม่ต้องใช้การปลูกเชื้อเพื่อทดสอบความต้านทานโรคในขณะคัดเลือก (Tanksley *et al.*, 1989)

ผลที่ได้จากการใช้เอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีน *Lin5* และ *Lin7* เข้ามาช่วยในการคัดเลือกลักษณะทางจีโนไทป์ของมะเขือเทศ พบว่า ขนาดแถบดีเอ็นเอของยีน *Lin5* และ *Lin7* ที่ได้จากมะเขือเทศสองสายพันธุ์ ได้แก่ IL9-1-3 และ WVa700 มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 10 แสดงว่ายีน *Lin5* และ *Lin7* ที่ได้จากมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์เป็นคนละอัลลีลกัน ดังนั้นจึงส่งผลให้ปริมาณ SSC ที่ตรวจวัดได้ในสายพันธุ์ให้ทั้งสองมีค่าแตกต่างกัน

Negative selection หรือ Background selection

ในกลุ่มผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700 ที่ใช้วิธีการผสมกลับเพื่อถ่ายทอดยีนควบคุมการเพิ่มขึ้นของปริมาณ soluble solid content (SSC) ที่มีอยู่ในมะเขือเทศพันธุ์ WVa700 ซึ่งเป็นมะเขือเทศป่าเข้าสู่มะเขือเทศปลูกที่เป็นพันธุ์การค้า เพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนที่ต้องการและมีลักษณะทั่วไปเหมือนพันธุ์รับ โดยส่วนใหญ่จะใช้การผสมกลับเข้ากับสายพันธุ์รับประมาณ 6 ชั่วโมง เพื่อให้สัดส่วนจีโนมของลูกผสมกลับเหมือนกับสายพันธุ์รับมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่า จะใช้เวลาในการปรับปรุงพันธุ์ค่อนข้างมาก ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอเครื่องหมายในมะเขือเทศที่ครอบคลุมทั้งจีโนมทำให้สามารถใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเข้ามาช่วยคัดเลือกลูกผสมที่มีสัดส่วนจีโนมเหมือนพันธุ์รับมากที่สุดไปใช้ผสมกลับในรุ่นต่อไปได้ (Hospital *et al.*, 1992; Barone, 2004) อย่างเช่นการคัดเลือกลูกผสมกลับโดยใช้ negative selection หรือ background selection ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์สามารถช่วยคัดเลือกลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนของจีโนมเหมือนกับพันธุ์รับมากที่สุดเพื่อนำมาใช้เป็นต้นพ่อแม่ในการผสมกลับรุ่นต่อไป ทำให้สามารถช่วยลดจำนวนรุ่นของการปรับปรุงพันธุ์ลงได้ โดยจากการศึกษาจีโนมของลูกผสมกลับช่วงที่ 4 รุ่นที่ 1 (BC₄F₁) ของกลุ่มผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700 พบว่า สำหรับลูกผสมกลับรุ่น BC₄F₁ พบต้นลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนจีโนมเหมือนพันธุ์รับ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ใช้จำนวนรุ่นของการผสมกลับลดลง และช่วยให้ปรับปรุงพันธุ์พืชได้เร็วขึ้น (Young and Tanksley, 1989)

การผสมกลับแต่ละครั้งลูกผสมกลับที่ได้จะมีสัดส่วนจีโนมของพันธุ์รับ (recurrent parent) เพิ่มขึ้นรุ่นละ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยลูกผสมกลับที่ได้ในแต่ละรุ่นจะมีสัดส่วนจีโนมของพันธุ์รับเท่ากับ $1 - (1/2)^{t+1}$ เมื่อ t เป็นจำนวนครั้งของการผสมกลับ (Babu *et al.*, 2004) จากการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เทคนิค negative selection ช่วยคัดเลือกในกลุ่มผสม NIL SD3-Ty-2 x WVa700 ที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR ทั้งหมด 80 ตำแหน่ง ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซม มะเขือเทศเข้ามาช่วยคัดเลือกในระดับจีโนไทป์ พบว่า เปอร์เซ็นต์สัดส่วนจีโนมที่ได้จากการผสมกลับในแต่ละรุ่นมีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนจีโนมทั้งที่น้อยกว่าและมากกว่าค่าทางทฤษฎีที่คำนวณได้

จากการศึกษาระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดำทิพย์ 3 กับ WVa700 (NIL SD3-Ty-2 x WVa700) พบว่า ลูกผสมกลับในรุ่น BC_1F_1 ที่ได้จากการศึกษาด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายมีเปอร์เซ็นต์ของจีโนมที่เหมือนกับพันธุ์สีดำทิพย์ 3 ตั้งแต่ 30 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) ดังนั้นจึงสามารถคัดเลือกต้นลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนจีโนมเหมือนพันธุ์รับมากที่สุดไปใช้ในการผสมกลับในรุ่นที่ 2 ซึ่งมีมากกว่าค่าทางทฤษฎีที่คำนวณได้ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Babu *et al.* (2005) ที่คัดเลือก whole genome background ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายในการคัดเลือกต้นลูกผสมกลับของข้าวโพด เพื่อช่วยลดสัดส่วนจีโนมของพันธุ์ป่า พบว่า เพียงสองรุ่นของการผสมกลับสามารถคัดเลือกลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนจีโนมเหมือนกับพันธุ์รับ (recurrent parent) ได้ 93 ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความมากกว่าค่าทางทฤษฎี และการศึกษาของ Xi *et al.* (2008) ที่ปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR ช่วยลดสัดส่วนจีโนมของพันธุ์ให้ (Donor parent) ในแต่ละรุ่นของการผสมกลับ พบว่า สามารถช่วยลดสัดส่วนจีโนมของพันธุ์ป่าลงได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละรุ่นของการผสมกลับ

Zhang *et al.* (2002) ได้ศึกษาการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยตรวจสอบสัดส่วนจีโนมของต้นลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ พบว่า ต้นลูกผสมกลับในรุ่น BC_1F_1 ที่ตรวจสอบมีสัดส่วนจีโนมที่เหมือนกับพันธุ์รับ (% recurrent parent genome) อยู่ระหว่าง 64.3-99.4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 80.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ที่เป็นค่าทางทฤษฎีไปใช้ในการผสมกลับในรุ่นต่อไปได้

การใช้เทคนิค negative selection ช่วยคัดเลือกต้นลูกผสมกลับเพื่อให้ได้ต้นลูกผสมที่ต้องการอย่างรวดเร็วนั้นควรจะใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวนมากให้ครอบคลุมทั้งจีโนมของมะเขือเทศจะช่วยให้สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนจีโนมเหมือนพันธุ์รับได้มากที่สุด แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีอยู่ในแต่ละพืชและงบประมาณที่ใช้ในการศึกษา เพราะการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายหลายตำแหน่งให้ครอบคลุมตลอดทั้งจีโนมจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานที่สูง เนื่องจากเทคโนโลยีทางที่เกี่ยวกับดีเอ็นเอเครื่องหมายมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นการนำเทคนิคนี้มาใช้จึงควรคำนึงถึงความเหมาะสมและประโยชน์ที่จะได้รับเป็นสำคัญ (ณัญญา, 2547)

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ soluble solid content (SSC) ในผลมะเขือเทศ ได้ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ร่วมกับการคัดเลือกในลักษณะทางจีโนไทป์ เพื่อช่วยให้สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่มีปริมาณ SSC เพิ่มขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากในการคัดเลือกด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายใช้เฉพาะดีเอ็นเอเครื่องหมายที่คัดเลือกยีน *Lin5* และ *Lin7* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 ของมะเขือเทศยังเหลือยีน *Lin6* และ *Lin8* ที่มีตำแหน่งยีนอยู่บนโครโมโซม 10 ของมะเขือเทศ (Fridman *et al.* 2003) ไม่ถูกคัดเลือก

จากการตรวจวัดปริมาณ SSC ของลูกผสมกลับทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า ต้นมะเขือเทศลูกผสมกลับที่คัดเลือกได้ของแต่ละกลุ่มมีปริมาณ SSC เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์รับ (recurrent parent) ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 ที่ใช้เป็นพันธุ์เริ่มต้นในการปรับปรุงพันธุ์ แสดงว่ายีน *Brix9-2-5* สามารถช่วยเพิ่มปริมาณ SSC ในมะเขือเทศปลูกพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 ได้ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับที่ Fridman *et al.* (2000, 2003) รายงานไว้ว่ายีน *Brix9-2-5* สามารถช่วยเพิ่มปริมาณ SSC ในผลของมะเขือเทศปลูกได้ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยส่งผลให้มะเขือเทศมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น 28 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้น 18 เปอร์เซ็นต์

ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ SSC ในผลมะเขือเทศต้องตรวจวัด pH ในลูกผสมที่คัดเลือกด้วยเนื่องจากลักษณะ SSC เป็นลักษณะที่สัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดทั้งหมด การเพิ่มขึ้นของปริมาณ SSC อาจส่งผลให้ปริมาณกรดในผลของมะเขือเทศเพิ่มขึ้นด้วยทำให้มะเขือเทศที่จะนำไปบริโภคสดมีรสเปรี้ยว อีกทั้งค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มะเขือเทศโรงงานที่ต้องนำไปบรรจุกระป๋องเป็นมะเขือเทศแปรรูปเกิดอาการกระป๋องบวมได้ เพราะเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดี ทำให้ต้องใช้เวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อนานขึ้น โดยค่า pH ที่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปมะเขือเทศอยู่ที่ประมาณ 3.5-4 และไม่ควรเกิน 4.5 (ถาวร, 2543; Davies and Hobson, 1981; Jones and Scott, 1993) โดยผลที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ พบว่าลูกผสมกลับที่ได้จากการคัดเลือกของทุกกลุ่มมีค่า pH เท่ากับ 4 และไม่แตกต่างจากสายพันธุ์รับที่นำมาปรับปรุงพันธุ์และไม่มากกว่า 4.5 ผลที่ได้จากการตรวจวัด pH ของมะเขือเทศลูกผสมกลับที่คัดเลือกสอดคล้องกับที่ Fridman *et al.* (2000) ได้รายงานไว้ว่ายีน *Brix9-2-5* สามารถช่วยเพิ่มปริมาณ SSC ในผลของมะเขือเทศปลูก แต่ไม่ส่งผลให้ปริมาณกรดในผลมะเขือเทศเปลี่ยนแปลง

จากการศึกษารูปร่างผลของมะเขือเทศ พบว่า ในลูกผสมกลับที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์สีดำทิพย์ 3 กับ IL9-1-3 และ WVa700 นั้นมีบางสายพันธุ์ที่ผลมีลักษณะเป็นร่อง ผิวไม่เรียบ อาจเกิดจากการลากติคมาของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดร่อง เช่น ยีน *Inc* ที่เกี่ยวข้องกับจำนวน locule ที่อยู่บนโครโมโซม 1 2 และ 11 (Lippman and Tanksley, 2001) หรือ ยีน *f* ที่เกี่ยวข้องกับ fascinated locus ที่อยู่บนโครโมโซม 9 และที่ปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม 11 (Barrero and Tanksley, 2004) ซึ่งยีนต่างๆ เหล่านี้มีตำแหน่งยีนอยู่ในบริเวณเดียวกับ ยีน *Lin5* และ *Lin7* ที่อยู่บนโครโมโซม 9 และยีน *I2* และ *Ty-2* ที่อยู่บนโครโมโซม 11 ดังนั้นในการคัดเลือกต้นลูกผสมที่มียีนที่ต้องการควรคัดเลือกจำนวนต้นลูกผสมกลับให้มากขึ้นเพื่อหาต้นที่เกิดรีคอมบิเนชันเอาส่วนของยีนที่ไม่ต้องการออกไป (จุลภาค, 2548)

สรุปผลการทดลอง

การรวมยีนต้านทานโรคในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 และสิดาทิพย์ 3 เพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคลักษณะต่างๆ ได้แก่ ยีน *Mi* ควบคุมลักษณะต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม ยีน *Ph-3* ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* ยีน *Tm-2^a* ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Tobacco mosaic virus* และยีน *I2* ควบคุมลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมให้มียีนต้านทานโรคทั้ง 4 ยีนที่ต้องการในสภาพโฮโมไซโกต พบว่า สามารถคัดเลือกต้นมะเขือเทศลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคในสภาพโฮโมไซโกตทั้ง 4 ยีน ได้ในรุ่นที่ 3 และ 4 ของการคัดเลือก สามารถคัดเลือกได้ในมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดพันธุ์ P502 จำนวน 4 สายพันธุ์ และสิดาทิพย์ 3 จำนวน 12 สายพันธุ์ และจากการศึกษาได้คัดเลือกมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดสายพันธุ์ที่ 96 -10 (NIL P502- 4DR # 96 -10) ของมะเขือเทศพันธุ์ P502 และสายพันธุ์ที่ 32-14 (NIL SD3- 4DR # 32-14) ของมะเขือเทศพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ไปใช้เป็นสายพันธุ์รับ (recurrent parents) ในการทดลองที่ 2 ที่ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ soluble solid content (SSC) และมียีนต้านทานโรคหลายชนิด เนื่องจากมะเขือเทศทั้งสองสายพันธุ์ที่คัดเลือกมีลักษณะทั่วไปเหมือนกับสายพันธุ์รับ (recurrent parent) มากที่สุด

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มีปริมาณ SSC เพิ่มขึ้นร่วมกับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคหลายชนิดที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับปริมาณ SSC และยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคลักษณะต่างๆ พบว่า การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกสามารถคัดเลือกลูกผสมกลับของทั้ง 4 กลุ่มผสม ให้มียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคที่ต้องการและมีปริมาณ SSC เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งสามารถสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 ที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน ได้แก่ *Mi Tm-2^a Ph-3* และ *I2* และมียีน *Lin5* และ *Lin7* จาก IL 9-1-3 ทำให้มีปริมาณ SSC เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.1-5.7 โดยเพิ่มขึ้นจากพันธุ์ P502 ประมาณ 20.5-34.4 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ที่มียีนต้านทานโรค 4 ยีน ได้แก่ *Mi Tm-2^a Ph-3* และ *I2* และมียีน *Lin5* และ *Lin7* จาก IL 9-1-3 ทำให้มีปริมาณ SSC อยู่ระหว่าง 5.1-6.3 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ประมาณ 19.3-46.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์ P502 ที่มียีนต้านทานโรค 5 ยีน ได้แก่ *Mi Ph-3 Tm-2^a I2* และ *Ty-2* และมียีน *Lin5* และ *Lin7* จาก WVa700 ทำให้มีปริมาณ SSC อยู่ระหว่าง 5.3-5.9 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากพันธุ์ P502 ประมาณ 26.4-41.4 เปอร์เซ็นต์ และสามารถสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดของพันธุ์สิดาทิพย์ 3 ที่มียีนต้านทานโรค 5 ยีน ได้แก่ *Mi Ph-3 Tm-2^a I2* และ *Ty-2* และมียีน

Lin5 และ *Lin7* จาก WVa700 ทำให้มีปริมาณ SSC อยู่ระหว่าง 5-6 โดยเพิ่มขึ้นจากพันธุ์สัดาทิพย์ 3 ประมาณ 16.3-39.5 เปอร์เซ็นต์



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2553. **ปลูกมะเขือเทศบริโภคสดอย่างไรให้ได้ราคาดี**. แหล่งที่มา:

<http://it.doa.go.th/pibai/pibai/kayaipon.html>, 23 มีนาคม 2554.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2550. **พื้นที่ปลูกมะเขือเทศ ปี 2550**. แหล่งที่มา

<http://www.doae.or.th/plant/tomato.htm>, 4 ธันวาคม 2551.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2554. **การปลูกมะเขือเทศ**. แหล่งที่มา

<http://www.doae.go.th/library/html/detail/tomato/detail.htm>, 23 มีนาคม 2554.

จานุลักษณ์ ขนบดี. 2535. **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก**. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท โอ. เอส. พรินติ้ง เฮาส์.

กรุงเทพฯ. น. 72.

จุลภาค คูนวงศ์. 2543. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือกในมะเขือเทศ, น. 80-88. ใน **เอกสารประกอบสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช ครั้งที่ 13**. สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

จุลภาค คูนวงศ์. 2548. การปรับปรุงพันธุ์พืช เทคโนโลยีชีวภาพ และความหลากหลายทางพันธุกรรม, น. 79-88. ใน **ยอดหทัย เทพธรรานนท์ และ ภัณฑวิมว์ กิรติกร, บรรณาธิการ. ข้าว-มัน-กุ้ง; ผลผลิตคู่ชีวิตคนไทย**. สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ณัฏยา ศรีสวัสดิ์. 2547. **การสร้างมะเขือเทศสายพันธุ์คู่แฝดที่มียืนควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ถาวร โกวิทยากร, สุนันทา สมพงษ์ และ อรสา ดิษฐาพร. 2543. การผลิตมะเขือเทศเพื่ออุตสาหกรรม, น. 61-81. ใน **เอกสารประกอบการประชุมโต๊ะกลม เรื่องการวิจัยและพัฒนามะเขือเทศเพื่ออุตสาหกรรม**. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, สกจนคร.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สถาบันอาหาร. 2549. การนำเข้า-ส่งออกมะเขือเทศแปรรูปในประเทศไทย ปี 2549. แหล่งที่มา <http://www.nfi.or.th/stat/condition-report.aso>, 21 ธันวาคม 2551.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2528. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับ, น. 98 ใน การปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

สมชาย สุขะกุล. 2549. ไล่เดือนฝอยศัตรูมะเขือเทศ: ตัวอย่างพันธุ์ต้านทานของพืชเศรษฐกิจ, น. 158-171. ใน ไล่เดือนฝอยศัตรูพืชและการควบคุม. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

อนงค์ จันทศรีกุล. 2536. ตระกูลมะเขือ: มะเขือเทศ, น. 6-14. ใน โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 6. ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.

Abinder, I., M. Reuveni, R. Azari, I. Paran, S. Nahon, H. Shlomo, L. Chen, M. Lapidot and I. Levin. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. **Theor. Appl. Genet.** 119: 519-530.

Al-Kherb, S.M., C. Fininsa, R.C. Shattock and D.S. Shaw. 1995. The inheritance of virulence of *Phytophthora infestans* to potato. **Plant Pathol.** 44: 552.

Babu, R., S.K. Nair, B.M. Prasanna, and H.S. Gupta. 2004. Integrating marker assisted selection in crop breeding – Prospects and challenges. **Curr. Sci.** 87: 607-619

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

Barone, A. and L. Frusciante. 2007. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. 151-164. In E.P. Guimaraes, J. Ruane, B.D. Scherf, A. Sonnino

- and J.D. Dargie., eds. **Marker assisted selection**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Barrero, L.S. and S.D. Tanksley. 2004. Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 109: 669-679.
- Berloo, R.van. 2008. GGT 2.0: Versatile software for visualization and analysis of genetic data. **J. of Heredity.** 99(2): 232-236.
- Bournival, B.L., C.E. Vallejos and J.W. Scott. 1989. Genetic analysis of resistance to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* from the wild tomato *Lycopersicon pennellii*. **Theor. Appl. Genet.** 79: 641-645.
- Chen, F.Q., M.R. Foolad, J. Hyman, D.A.St. Clair and R.B. Beelaman. 1999. Mapping of QTLs for lycopene and other fruit traits in a *Lycopersicon esculentum* x *L. pimpinellifolium* cross and comparison of QTLs across tomato species. **Mol. Breeding** 5: 283-299.
- Chunwongse, J., C. Chunwongse, L. Black and P. Hanson. 1998. Mapping of the *Ph-3* gene for late blight from *L. pimpinellifolium* L3708. **Tomato Genet. Coop.** 48: 13-14.
- Chunwongse, J., C. Chunwongse, L. Black and P. Hanson. 2002. Molecular mapping of *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato. **J. Hort. Sci. Biotechnol.** 77: 281-286.
- Chunwongse, J., G.B. Martin and S.D. Tanksley. 1993. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. **Theor. Appl. Genet.** 86: 694-698.
- Davies J.N. and G.E. Hobson. 1981. The constituents of tomato fruit the influence of environment, nutrition, and genotype. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 15: 205-280.

- Edward, M. and L. Johnson. 1994. RFLPs for rapid recurrent selection. pp. 33-40. *In* **Proc. of Symposium on Analysis of Molecular Marker Data**. Am. Soc. Hort. Sci. and CSSA, Corvallis, OR.
- Eshed, Y. and D. Zamir. 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTLs. **Genetics** 141: 1147-1162.
- Foolad, M.R. and A. Sharma. 2005. Molecular markers as selection tools in tomato breeding. **Acta Hort.** 695: 225-240.
- Fridman, E., T. Pleban and D. Zamir. 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97(2): 4718-4723.
- Fridman, E. and D. Zamir. 2003. Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato and arabidopsis. **Plant Phy.** 133: 603-609.
- Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plants Mol. Biol. Reporter** 13(3): 207-209.
- Giovannucci, E. 2005. Tomato products lycopene and prostate cancer: a review of the epidemiological literature. **J. Nutr.** 135: 2030-2031.
- Hanson, P.M., D. Bernacchi, S. Green, S.D. Tanksley, V. Muniyappa, S. Padmaja, H.M. Chen, G. Kuo, D. Fang and J.T. Chen. 2000. Mapping wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 125(1): 141-146.

- Hemming, M.N., S. Basuki, D.J. McGrath, B.J. Carroll and D.A. Jones. 2004. Fine mapping of the tomato *I-3* gene for fusarium wilt resistance and elimination of a co-segregating resistance gene analogue as a candidate for *I-3*. **Theor. Appl. Genet.** 109(2): 409-418.
- Hospital, F., C. Chevalet and P. Mulsant. 1992. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genet.** 132: 1199-1210.
- Ji, Y., D. J. Schuster and J. W. Scott. 2007. *Ty3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. **Mol. Breeding** 20: 271-284.
- Ji, Y., J. W. Scott, D. P. Maxwell and D.J. Schuster. 2009. *Ty-4*, a *Tomato yellow leaf curl virus* resistance gene on chromosome 3 of tomato. **Tomato Genet. Coop. Rep.** 58: 29-31.
- Jones, R.A. and S.J.S. Scott. 1993. Improvement of tomato flavor by genetically increasing sugar and acid content. **Euphytica** 32: 845-855.
- Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutation co-dominant ecotype specific PCR-based markers. **Plant J.** 4: 403-410.
- Lande, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics** 124: 743-756.
- Levesque, H., F. Vedel, C. Mathieu and A.G.L. de Courcel. 1990. Identification of a short rDNA spacer sequence highly specific of a tomato line containing *Tm-1* gene introgressed from *Lycopersicon hirsutum*. **Theor. Appl. Genet.** 80: 602-608.
- Lippman, Z. and S.D. Tanksley. 2001. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. **Genetics** 158: 431-422.

- Messeguer, R., M. Ganai, M. C. Devicente, N. D. Young, H. Bolkan and S. D. Tanksley. 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. **Theor. Appl. Genet.** 82, 529–536
- Miller, P. 1754. **The gardeners dictionary**. Abridged 4th ed. John and James Rivington, London.
- Moreau, P., P. Thoquet, J. Olivier, H. Laterrot and N. Grimsley. 1998. Genetic mapping of *Ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato. **Mol. Plant-Micro. Interact.** 11(4): 259-269.
- Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya and K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genome** 5: 874-879.
- Rao, A.V. and S. Agarwal. 2000. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **J. Amer. Coll. Nutr.** 19: 563-569.
- Razdan, M.K. and A.K. Mottoo. 2007. **Genetic Improvement of Solanaceous Crops**. Science Publishers, New Hampshire.
- Roitsch, T. and M.C. Gonzalez. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Sci.** 9(12): 606 613.
- Roumen, E., L. Dara-Carlos, C. Chunwongse, C. Leksomboon, N. Thaveechai, N. Srisawat, N. Rattanamahavichai and J. Chunwongse. 1998. Marker assisted breeding for enhanced resistance to bacterial wilt in tomato; **In the project report National Center of Genetic Engineering and Biotechnology**. Bangkok, Thailand.
- Sarfatti, M., J. Katan, R. Fluhr and D. Zamir. 1989. An RFLP marker in tomato linked to the *Fusarium oxysporum* resistance Gene *I2*. **Theor. Appl. Genet.** 78(5): 755-759.

- Semagn, K., A. Bjørnstad and M. N. Ndjiondjop. 2006. Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programs. **African J. of Biotechnol.** 5(25): 2588-2603.
- Servin, B., O.C. Martin, M. Mezard and F. Hospital. 2004. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. **Genetics** 168: 513-523.
- Sobir, T., M. Ohmori, Murata and F. Motoyoshi. 2000. Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the *Tm-2* locus of the genus *Lycopersicon*. **Theor. Appl. Genet.** 101: 64-69.
- Spooner, D. M., I. E. Peralta and S. Knaap. 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum L.* section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.] **Taxon.** 54: 43-61.
- Stuber, C.W. and M.D. Edwards. 1986. Genotypic selection for improvement of quantitative traits in corn using molecular marker loci. pp. 70-83. In **Proc. 41st Annual Corn and Sorghum Industry Research.** Conf, American.
- Tanksley, S.D. and J. Hewitt. 1988. Use of molecular markers in breeding for soluble solid content in tomato a re-examination. **Theor. Appl. Genet.** 75: 811-7823.
- Tanksley, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding new tools for an old science. **Bio. Tech.** 7: 257-264.
- Tanksley, S.D., M.W. Ganai, J.P. Prince, M.C. de Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandillo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A.H. Paterson, O. Pineda, M.S. Roder, R.A. Wing, W. Wu and N.D. Young. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics** 132: 1141-1160.

- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** 17: 6463-6471.
- Thakur, B.R., R.K. Singh and P.E. Nelson. 1997. Effect of pH and soluble solids on the serum viscosity and serum color of tomato juice at elevated temperatures. **J. Food Quality** 20: 495-500.
- Vidavski, F. H. Czosnek. S. Gazit. D. Levy and M. Lapidot. 2008. Pyramiding of genes conferring resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from different wild tomato species. **Plant Breeding** 127: 625-631.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23(21): 4407-4414.
- Witcombe, J.R. and D.S. Virk. 2001. Number of crosses and population size for participatory and classical plant breeding. **Euphytica** 122: 451-462.
- Xi, Z.Y., F.H. He, R.Z. Zeng, Z.M. Zhang, X.H. Ding, W.T. Li and G.Q. Zhang. 2008. Characterization of donor genome contents of backcross progenies detected by SSR markers in rice. **Euphytica** 160: 369-377.
- Yaghoobi, J., I. Kaloshian, Y. Wen and V.M. Williamson. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. **Theor. Appl. Genet.** 91: 457-464.
- Yang, W. and D.M. Francis. 2005. Marker-assisted selection for combining resistance to bacterial spot and bacterial speck in tomato. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 130(5): 716-721.
- Young, N.D. and S.D. Tanksley. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. **Theor. Appl. Genet.** 77(3): 353-359.

Yousef, G.G. and J.A. Juvik. 2001. Evaluation of breeding utility of a chromosomeal segment from *Lycopersicon chmielewskii* that enhances cultivated tomato soluble solids. **Theor. Appl. Genet.** 103: 1022-1027.

Zamir, D., I. Eksteinmichelson, Y. Zakay, N. Navot, M. Zeidan, M. Sarfatti, Y. Eshed, E. Harel, T. Pleban, H. Vanoss, N. Kedar, H.D. Rabinowitch and H. Czosnek. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-S*. **Theor. Appl. Genet.** 88(2): 141-146.

Zhang, L.P., A. Khan, D. Nino-Liu and M.R. Foolad. 2002. A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. **Genome** 45: 133-146.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซตเทลไลท์ (SSR) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศ

No.	primer	Chro.	Position	PCR		PCR			
				Annelling	NILP502 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILP502 <i>Ty</i> -2xWva700	NILSD3 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILSD3 <i>Ty</i> -2xWva700	
1	SSR478	1	0	50	M	M	M	M	
2	SSR48	1	31.2	50	M	P	M	P	
3	SSR134	1	43.3	50	-	-	P	P	
4	SSR75	1	53.5	50	M	M	M	M	
5	SSR29	1	91	50	M	M	M	M	
6	SSR150	1	115.5	50	M	M	M	M	
7	SSR346	1	125	50	M	P	M	P	
8	SSR572	1	136.5	50	M	M	P	P	
9	SSR156	1	146	50	M	M	M	M	
10	SSR65	1	159	50	M	M	M	M	
% polymorphism					0	22.2	20	40	
1	SSR448	2	0	50	M	M	M	M	
2	SSR40	2	22	50	M	P	M	P	
3	SSR104	2	36.5	50	P	P	P	P	
4	SSR103	2	51	50	M	M	M	M	
5	SSR50	2	70.5	50	M	M	M	M	
6	SSR331	2	78	50	M	M	M	M	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซตเทลไลต์ (SSR) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศ

No.	primer	Chro.	Position	PCR		PCR			
				Annelling	NILP502 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILP502 <i>Ty</i> -2xWva700	NILSD3 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILSD3 <i>Ty</i> -2xWva700	
7	SSR287	2	107	50	M	P	M	P	
8	SSR332	2	144	50	M	M	M	M	
% polymorphism					12.5	37.5	12.5	37.5	
1	SSR57	3	6	50	M	M	M	M	
2	SSR96	3	36.5	50	M	P	P	M	
3	SSR86	3	54	50	P	M	M	M	
4	SSR111	3	75.8	50	M	P	P	M	
5	SSR22	3	99	50	M	P	M	P	
6	T0794	3	120	50	M	M	M	M	
7	SSR320	3	158	50	M	P	M	P	
8	SSR601	3	162	50	M	P	M	P	
9	SSR27	3	169	50	M	M	M	M	
% polymorphism					11.1	55.6	22.2	33.3	
1	SSR296	4	0	50	M	M	M	M	
2	SSR593	4	15	50	M	M	M	M	
3	TSSR603	4	38	50	M	M	M	M	
4	SSR306	4	48	50	M	M	M	M	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซตเทลไลต์ (SSR) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศ

No.	primer	Chro.	Position	PCR		PCR			
				Annelling	NILP502 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILP502 <i>Ty</i> -2xWva700	NILSD3 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILSD3 <i>Ty</i> -2xWva700	
5	SSR555	4	61.5	50	M	M	M	M	
6	SSR214	4	95	50	M	M	M	M	
7	TSSR188	4	135.5	50	M	M	M	M	
% polymorphism					0	0	0	0	
1	TSSR62	5	10.5	50	M	M	M	M	
2	SSR325	5	18.5	50	M	M	M	M	
3	SSR13	5	28	50	M	M	M	M	
4	SSR115	5	35	50	M	P	M	P	
5	T1601	5	69	55	M	P	M	P	
6	SSR162	5	99	50	M	M	M	M	
7	SSRB18031	5	119	50	M	M	M	M	
% polymorphism					0	28.6	0	28.6	
1	SSR47	6	0	50	M	P	M	P	
2	TSSR128	6	35	50	M	M	M	M	
3	SSR326	6	39	50	M	M	M	M	
4	TSSR578	6	44	50	M	M	M	M	
5	SSR122	6	101	50	M	M	M	M	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซตเทลไลต์ (SSR) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศ

No.	primer	Chro.	Position	PCR		PCR			
				Annelling	NILP502 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILP502 <i>Ty</i> -2xWva700	NILSD3 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILSD3 <i>Ty</i> -2xWva700	
% polymorphism					0	20	0	20	
1	SSR241	7	0	55	M	M	M	P	
2	SSR286	7	12	50	M	M	M	M	
3	SSR304	7	30.5	50	M	M	M	M	
4	SSR565	7	44.2	50	M	M	M	M	
5	TSSR45	7	60	50	M	P	M	P	
6	T1255	7	82	55	M	M	M	M	
% polymorphism					0	16.7	0	33.3	
1	SSR344	8	0	50	M	P	M	P	
2	TSSR244	8	7	50	M	M	M	M	
3	SSR327	8	20	50	M	M	M	M	
4	SSR335	8	49.7	50	M	M	M	M	
5	SSR954	8	55	50	M	P	M	P	
6	SSRB105694	8	87	50	M	M	M	M	
% polymorphism					0	33.3	0	33.3	
1	TSSR340	9	18	50	P	P	P	M	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซตเทลไลต์ (SSR) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศ

No.	primer	Chro.	Position	PCR		PCR		
				Annelling	NILP502 <i>Mix</i> IL9-1-3	NIL502 <i>Ty</i> -2xWva700	NILSD3 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILSD3 <i>Ty</i> -2xWva700
2	SSR383	9	57.3	50	M	P	M	P
3	SSR112	9	80	50	M	M	M	M
4	SSR599	9	103	50	M	M	M	M
5	SSR333	9	109	50	M	M	M	M
% polymorphism					20	40	20	20
1	SSR606	10	3	50	M	M	M	M
2	SSR596	10	13	50	M	M	M	M
3	SSR34	10	25.3	50	M	M	M	M
4	SSR218	10	33.7	50	M	M	M	M
5	SSR360	10	39	50	M	P	P	M
6	SSR159	10	46	50	M	M	M	M
7	TSSR85	10	55	50	M	M	M	M
8	TSSR74	10	74	50	M	P	M	P
9	SSR479	10	86	50	M	P	M	M
% polymorphism					0	33.3	11.1	11.1
1	TSSR136	11	11	50	M	M	P	M
2	TSSR67	11	24	50	M	M	M	M

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซตเทลไลต์ (SSR) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมมะเขือเทศ

No.	primer	Chro.	Position	PCR		PCR	
				Annelling	NILP502 <i>Mix</i> IL9-1-3	NILP502 <i>Ty</i> -2xWva700	NILSD3 <i>Mix</i> IL9-1-3
3	TSSR46	11	40	50	M	P	M
% polymorphism					0	33.3	33.3
1	T659	12	11	55	M	M	M
2	SSR44	12	60	50	M	M	M
3	SSR345	12	72.5	50	M	M	M
4	T0989	12	36	50	M	M	M
5	T0800	12	115	50	M	M	M
% polymorphism					0	0	0
Total SSR markers					79	79	80
Total % polymorphism					3.8	27.8	10

หมายเหตุ Chro. = Chromosome

M = monomorphic

P = polymorphic

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณ SSC เฉลี่ย และค่า pH ในสายพันธุ์เริ่มต้นที่ใช้การปรับปรุงพันธุ์

TOMAC	สายพันธุ์	ปริมาณ SSC เฉลี่ย	pH
TOMAC378	IL 9-1-3	4.2	4
TOMAC 37	WVa700	7.7	4
TOMAC460	NIL SD3-Mi	4.6	4
TOMAC462	NIL SD3-I2	4.2	4
TOMAC463	NIL SD3-Tm-2 ^a	4.4	4
TOMAC476	NIL SD3-Ph-3	3.7	4
TOMAC461	NIL P502-Mi	4.3	4
TOMAC464	NIL P502-Tm-2 ^a	4.8	4
TOMAC479	NIL P502-I2	5	4
TOMAC482	NIL P502-Ph-3	5.1	4
TOMAC583	NIL SD3-Ty-2	3.3	4
TOMAC584	NIL P502-Ty-2	4.8	4.3
TOMAC643	NIL SD3-4DR # 32-14	4.2	4
TOMAC642	NIL P502-4DR # 96-10	4.24	4

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวรตนา ลาสุข

วัน เดือน ปี ที่เกิด

22 มีนาคม พ.ศ. 2526

สถานที่เกิด จ. เพชรบูรณ์

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน

-

สถานที่ทำการปัจจุบัน

-

ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ

-

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ

เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กระทรวงศึกษาธิการ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ