

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเชอร์รี่เพื่อเพิ่มความหวานด้วยวิธีการ
Whole Genome Marker Assisted Selection
Cherry Tomato Breeding to Increase Sweetness by Using
Whole Genome Marker Assisted Selection

ต้นสัก โรจน์คำลือ¹ จุฬาลักษณ์ น้อยแสง^{2,3} ภูมิพัฒน์ ทองอญ^{2,3} อรุณบอล ชมเดช^{2,3} และ จุลภาค คุ้มวงศ์^{1,2,3}
Tonsak Rojkhalmue¹, Juraluck Noisang^{2,3}, Pumipat Tongyoo^{2,3}, Ornubol Chomdej^{2,3}
and Julapark Chunwongse^{1,2,3}

¹ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,
Nakhon Pathom 73140, Thailand

บทคัดย่อ: การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศโดยวิธีการผสมกลับเพื่อเพิ่มลักษณะดีเด่น อาศัยการผสมกลับอย่างน้อย 6-7ชั่วรุ่น ปัจจุบันเทคโนโลยีการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลทั้งจีโนมมีความก้าวหน้าอย่างมากและมีต้นทุนต่ำลง คณะผู้วิจัยได้ศึกษายีน *Lin-5* ที่เกี่ยวข้องกับความหวานในผลมะเขือเทศ พบว่ามีลักษณะของอัลลีลอย่างน้อย 3 รูปแบบ จึงได้ดำเนินการวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเชอร์รี่ 154 ให้มีอัลลีลจาก *S. lycopersicum* var. *cerasiform* สายพันธุ์ 'WVa700' โดยการคัดเลือก background genome (% Recurrent Parent, RPP) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ประกอบกับการคัดเลือกลักษณะภายนอก ผลการคัดเลือกในรุ่น BC₁F₁ จากต้นที่มี RPP สูงสุด 93% และต่ำสุด 64% โดยมี background เฉลี่ยตามทฤษฎีอยู่ที่ 75% สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับที่มีความหวานเพิ่มขึ้นจาก 6-7 เป็น 8.3°Brix และมี background ของมะเขือเทศเชอร์รี่ 154 เท่ากับ 88.1% ส่วนในรุ่น BC₂F₁ พบต้นที่มี RPP สูงสุด 91% และต่ำสุด 81% โดยมี background เฉลี่ยตามทฤษฎีอยู่ที่ 87.5% จึงคัดเลือก 2 ต้นที่มีความหวาน 9.5 และ 9.8°Brix และมี RPP เท่ากับ 89.8% และ 88.4% ตามลำดับ การคัดเลือกด้วยวิธีการ whole genome marker assisted selection นี้สามารถคัดต้นที่ต้องการได้ใน 2-3 ชั่วรุ่น ทำให้ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย

คำสำคัญ: การผสมกลับ ยีน *Lin5* การคัดเลือกแบ็คกราวนด์

Abstract: The backcross breeding approach for traits of interest can take 6-7 generations. Presently a whole genome marker assisted selection becomes more advance and affordable. We are interested in a sucrose invertase controlled by *Lin-5* gene which is related to a sweet flavor in cherry tomatoes and at least 3 forms of alleles were found. This study focused on allele introgression from *S. lycopersicum* var. *cerasiform* ("WVa700") to Cherry154 using molecular markers. Plants were selected using a background selection (% Recurrent Parent, RPP) and incorporated with phenotypic appearance. The result from BC₁F₁ generation showed various RPP values from 93-64% which in theory would be 75% identical to the recurrent parent. Based on high RPP, degree Brix and phenotypes, plant with 88.1% RPP and 8.3°Brix was selected. Likewise, plants in BC₂F₁ had the RPP values varied from 91-81% which, in theory, would be 87.5% identical to the recurrent parent. Two cherry tomato lines; 9.5°Brix with 89.8% RPP and 9.8 °Brix with 88.4% RPP were selected from BC₂F₁ for a future breeding program. With a whole genome marker assisted selection technology along with a known target gene and phenotypic appearance allows a breeding process to be faster within 2-3 generations.

Keywords: Backcross, *Lin-5* gene, background selection

คำนำ

มะเขือเทศเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae เช่นเดียวกับ พริก มะเขือ และยาสูบ เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ ตามการบริโภคนได้แก่ มะเขือเทศอุตสาหกรรมสำหรับทำซอสมะเขือเทศและมะเขือเทศทานผลสด มะเขือเทศเชอร์รี่ 154 เป็นมะเขือเทศในกลุ่มมะเขือเทศทานผลสด ถูกคัดเลือกสายพันธุ์โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในปี 2538 เป็นพันธุ์ผสมเปิด มีลักษณะเด่น คือ ทนร้อน แต่ทั้งนี้ก็ยังขาดบางลักษณะ เช่น ความต้านทานโรค หรือลักษณะคุณภาพอื่น ๆ อาทิ ความหวาน ที่มีความจำเป็นต่อรสชาติในการบริโภคผลสดการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือก เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการทั้งในลักษณะเด่นหรือลักษณะด้อย และในกรณีที่พืชนั้นมีเครื่องหมายโมเลกุลที่ครอบคลุมทั้งจีโนมก็สามารถคัดเลือกลูกผสมที่มีชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์รับให้ได้มากที่สุด พร้อมกับการคัดเลือกยีนเป้าหมายที่ต้องการ (จุลภาค, 2548)

Eshed and Zamir (1995) รายงานว่าพบยีนหลักที่ควบคุมลักษณะ Soluble Solid Content (SSC) ของมะเขือเทศอยู่บนโครโมโซม 9 ที่ตำแหน่ง Brix 9-2-5 เรียกตำแหน่งนี้ว่า apoplatic invertase (*Lin-5*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ไฮโดรเลสที่สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส งานวิจัยนี้จึงนำมะเขือเทศสายพันธุ์ WVa700 ที่มี SSC สูงถึง 8-11°Brix มาผสมกับมะเขือเทศสายพันธุ์เชอร์รี่ 154 ที่มี SSC 6-7°Brix ด้วยวิธีผสมกลับ คัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด dCAP ที่ตำแหน่งยีน *Lin-5* ร่วมกับการใช้เทคนิค Marker assisted backcrossing (MAB) ในการคัดเลือก background genome ประกอบการคัดเลือกลักษณะการผลิตที่ดีทั่วไปในโรงเรือนและแปลงทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

สายพันธุ์มะเขือเทศ มะเขือเทศสายพันธุ์เชอร์รี่ 154 เป็นพันธุ์รับ และมะเขือเทศสายพันธุ์ WVa700 เป็นพันธุ์ให้ผสมให้ได้ลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 (F_1) ใช้ใบอ่อน 4-5 ใบจากต้นกล้าอายุประมาณ 2 สัปดาห์ สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Fulton *et al.* (1995) คัดเลือกต้นที่ต้องการโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด dCAPS ที่ตำแหน่งยีน *Lin-5* ในแต่ละชั่วรุ่นโดยเลือกต้นที่มีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซโกต (Heterozygote) ของอัลลีล *Lin-5-pimp* (เชอร์รี่ 154) และ *Lin-5-cera* (WVa700) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ *EcoR V*

Forward primer: 5'-ACAACCCGTTGATCGTCCCTGATAT-3'

Reverse primer: 5' GTCGATTCTCAATCCCTTCC-3'

การคัดเลือก *background genome* ทำการคัดเลือกใน 2 ชั่วรุ่น ได้แก่ ประชากรลูกผสมกลับที่ 1 ชั่วรุ่นที่ 1 (BC_1F_1) จำนวน 76 ต้น และประชากรลูกผสมกลับที่ 2 ชั่วรุ่นที่ 1 (BC_2F_1) จำนวน 92 ต้น ตรวจสอบ *background genome* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จำนวน 200 ตำแหน่งที่กระจายทั่วทั้งจีโนมมะเขือเทศทุก ๆ 5 cM ด้วยเทคนิค KASPar (Smith and Maughan, 2015)

การตรวจสอบความหวาน วัดปริมาณ SSC ด้วย Hand reflectometer ของบริษัท ATAGO รุ่น E type series (N-1E brix 0~32%) และการชิมเพื่อให้คะแนนความหวานจากตัวแทนอย่างน้อย 10 คน

ผลการทดลอง

จากการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศสายพันธุ์เชอร์รี่ 154 (ภาพที่ 2a) ให้มีความหวานสูงขึ้นโดยการผสมกลับ (backcross) กับสายพันธุ์ WVa700 (ภาพที่ 2b) ตามแผนภาพการปรับปรุงพันธุ์ (ภาพที่ 1) ได้ประชากรในรุ่น BC₁F₁ ทั้งหมด 189 ต้น เมื่อนำมาตรวจสืบความหวาน (*Lin5*) บนโครโมโซม 9 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด dCAPS (ภาพที่ 3) พบต้นที่มียีนดังกล่าวในลักษณะเฮตเทอไรซอไทต์จำนวน 76 ต้น โดยคิดเป็นอัตราส่วนของต้นที่อัลลีล *Lin-5-cera* ต่อต้นที่มีอัลลีล *Lin-5-pimp* เท่ากับ 1:1

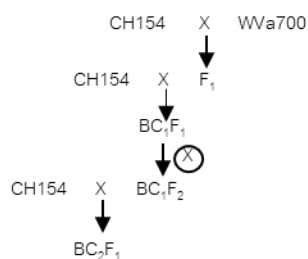


Figure 1 The crosses of tomato breeding lines between Cherry154 and WVa700

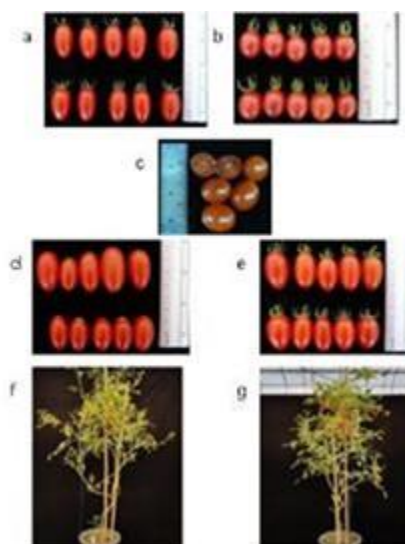


Figure 2 Tomato fruit and tree ;(2a) recurrent line, (2b) donor line, (2c) BC₁F₁ line no. 1, (2d) and (2f) BC₂F₁ line no.1-10-38, (2e) and (2g) BC₂F₁ line no.1-10-72



Figure 3 The polymorphic bands amplified by dCAPS marker to detect *Lin-5* gene in 3% Agarose gel electrophoresis at 100 voltages for 70 minutes. Lane 1 and 13: 100 bp. Marker, lane 2: Cherry154, lane 3: WVa700, lane 4, 5, 6, 7: samples from BC₁F₁, lane 8, 9, 10, 11: samples from BC₂F₁ and lane 12: dH₂O

ผลจากการวิเคราะห์ background genome โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จำนวน 200 ตำแหน่งที่กระจายทั่วทั้งจีโนมมะเขือเทศทุก ๆ 5 cM ด้วยเทคนิค KASPar จากประชากรในรุ่น BC₁F₁ ทั้ง 76 ต้น พบว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้เพียง 20 ตำแหน่งจึงได้เลือกต้นที่มีลักษณะตรงตามเป้าหมายได้ 1 ต้น ได้แก่ line ที่ 1 ที่มีค่าความหวานอยู่ที่ 8.3°Brix และมีค่า RPP 88.1% (ภาพที่ 2c) เมื่อนำไปผสมตัวเอง (BC₁F₂) เลือกต้นที่ต้องการเพื่อผสมกลับเข้าหาพันธุ์รับ ได้ประชากรรุ่น BC₂F₁ ที่ผ่านการคัดเลือกยีนเป้าหมาย (*Lin-5*) 92 ต้น ส่งวิเคราะห์ background genome อีกครั้ง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จำนวน 200 ตำแหน่ง (20ตำแหน่งเดิม + 180 ตำแหน่งใหม่) พบว่ามี 88 ตำแหน่งที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้จากนั้นย้ายปลูกเพื่อทดสอบลักษณะการเจริญเติบโตในสภาพโรงเรือนเพื่อคัดเลือกลักษณะการผลิตที่ดีทั่วไป สามารถเลือกได้ 2 lines ที่มีความหวาน 9.5 และ 9.8°Brix และมี RPP เท่ากับ 89.8% และ 88.4% ตามลำดับ (ภาพที่ 2d, 2f, 2e, 2g และ ตารางที่ 1)

Table 1 Characteristics of selected lines in BC₁F₁ and BC₂F₁

Lines	type	RPP	SSC(°Brix)	Weight (g)	Width:Length ratio (cm)
BC ₁ F ₁					
No.1	Semi-determinate type	88.1%	8.3	7.95	0.83
BC ₂ F ₁					
No.1-10-38	Semi-determinate type	88.4%	9.8	6.74	0.73
No.1-10-72	Semi-determinate type	89.8%	9.5	7.73	0.73
CH154	Semi-determinate type	100%	6-7	12	0.73
WVa700	Indeterminate type	0%	8-11	3	0.98

วิจารณ์

จากการผสมมะเขือเทศ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ มะเขือเทศสายพันธุ์ WVa700 ที่มีลักษณะเฉพาะคือ ผลกลมขนาดเล็ก ผลสุกจะนิ่ม และเปลือกบาง แต่มีข้อดีคือมี SSC สูงถึง 8-11°Brix มาผสมกับมะเขือเทศสายพันธุ์ เซอร์รี่ 154 ที่มีค่า SSC อยู่ที่ 6-7°Brix โดยใช้วิธีผสมกลับเพื่อให้เซอร์รี่ 154 มีความหวานที่สูงขึ้น

ผลจากการตรวจสอบ background genome ด้วย SNP markers 200 ตำแหน่ง ทุก ๆ 5cM ที่กระจายทั่วทั้งจีโนมมะเขือเทศในรุ่น BC₁F₁ จำนวน 76 ต้น พบมะเขือเทศที่มี background genome เหมือนมะเขือเทศเซอร์รี่ 154 มีการกระจายตัวตั้งแต่ 64-92% เมื่อเทียบกับสัดส่วนของรุ่น BC₁F₁ ทั้งหมดที่ 75%

ผลจากการตรวจสอบ background genome ด้วย SNP markers 200 ตำแหน่งในมะเขือเทศรุ่น BC₂F₁ พบมะเขือเทศที่มี background genome เหมือนมะเขือเทศเซอร์รี่ 154 มีการกระจายตัวตั้งแต่ 81-91%เมื่อเทียบกับสัดส่วนของรุ่น BC₂F₁ ทั้งหมดที่ 87.5% (ภาพที่ 4) จะเห็นได้ว่าสามารถคัดเลือกต้นลูกผสมกลับที่มีสัดส่วนของ RPP ที่สูงได้ใน 2-3 ชั่วโมง ประกอบกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกยีนเป้าหมาย ร่วมกับการคัดเลือกลักษณะการผลิตที่ดีทั่วไป เช่น ทรงต้น ทรงผล สีผล และรสชาติ จะทำให้สามารถลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่รวดเร็วและตรงตามความต้องการของผู้บริโภค ประกอบกับผลการศึกษาของ รัตนา (2554) ที่ใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอชนิด SSR 80 ตำแหน่ง ในการทำ background selection ระหว่างคู่ผสมมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 กับ WVa700 พบว่าในรุ่น BC₁F₁ มีสัดส่วนของ RPP ตั้งแต่ 30-80% รุ่น BC₂F₁ มี RPP อยู่ระหว่าง 65-80% และในรุ่น BC₄F₁ สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับที่มี RPP ได้ตั้งแต่ 95-100 เปอร์เซ็นต์

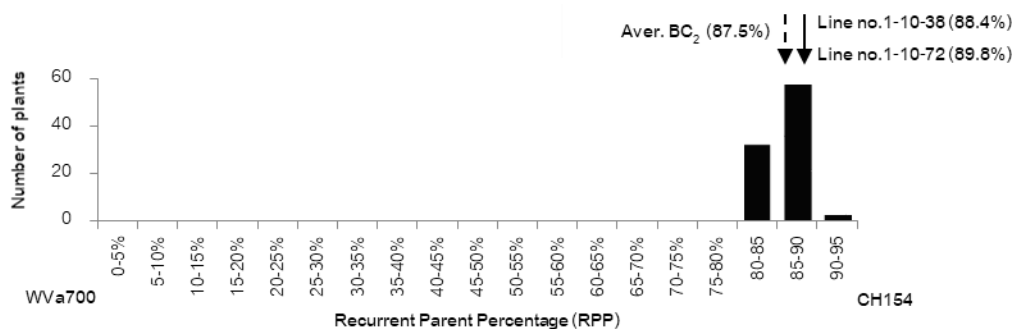


Figure 4 Distribution of 92 tomato lines in BC₂F₁ in % Recurrent Parent; RPP. Dark arrow indicated selected line from the population. Dot arrow indicated the theoretically average RPP value in BC₂F₁

สรุป

จากผลการคัดเลือกยีนเป้าหมายร่วมกับการคัดเลือก background genome, ลักษณะการผลิตที่ดี, ปริมาณ SSC และชิมเพื่อทดสอบรสชาติ พบว่า ลูกผสมกลับในรุ่น BC₁F₁ มีความหวานเพิ่มขึ้นจากเดิม คือพันธุ์ที่มีความหวานเฉลี่ยที่ 6-7°Brix เพิ่มขึ้นเป็น 8.3°Brix และในรุ่น BC₂F₁ ความหวานจากต้นที่คัดเลือกก็เพิ่มขึ้นเป็น 9.5 และ 9.8°Brix ตามลำดับ ในส่วนของ RPP ที่ได้ในรุ่น BC₁F₁ เท่ากับ 88.1% ซึ่งเป็นสัดส่วนที่มากกว่าค่าทางทฤษฎีคือ 75% และรุ่น BC₂F₁ RPP ที่ได้เท่ากับ 89.8% และ 88.4% โดยสัดส่วนทั่วไปของรุ่น BC₂F₁ อยู่ที่ 87.5% จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่า การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ MAS สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกยีนเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพและการใช้ background genome หรือ MAB ในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ จะยิ่งช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย ทำให้สามารถได้สายพันธุ์ใหม่ที่รวดเร็วและตรงตามความต้องการของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

- จุลภาค คูนวงศ์. 2548. การปรับปรุงพันธุ์พืชเทคโนโลยีชีวภาพและความหลากหลายทางพันธุกรรม, น. 79-88. ใน: ยอดหทัยเพชรานนท์และกัญญวิมวีกรัตติก (บก.). ข้าว-มัน-กุ้ง:ผลผลิตคู่ชีวิตคนไทย. สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- รัตนา ลาลูช. 2554. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อเพิ่มปริมาณ Soluble Solid Content และลักษณะต้านทานโรคพืชหลายชนิด. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม. 87 หน้า.
- 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(3): 1147-1162.
- Fulton, T. M., T. M. Fulton, J. Chunwongse and S. D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13(3): 207-209.
- Smith, S. M., and P. J. Maughan. 2015. SNP genotyping using KASPar assays. *Plant Genotyping: Methods and Protocols*: 243-256.