

# การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวในมะเขือเทศ พันธุ์ปลูกด้วยวิธี Association Mapping Association Analysis against Bacterial Wilt Resistance in Tomato Cultivars by Association Mapping Method

ณัฐยา ศรีสวัสดิ์<sup>5</sup> กมลสิริ เพชรบูรณ์<sup>1,2</sup> นักรบ วงศ์บุญมา<sup>1,2</sup> ชัญญา นุช กอรั้งงาม<sup>1,2</sup>

มธุรดา เรืองศิริ<sup>6</sup> ชลิดา เล็กสมบูรณ์<sup>3</sup> และ จุลภาค ชุ้นวงศ์<sup>1,2,4,\*</sup>

Nattaya Srisawad<sup>5</sup>, Kamonsiri Petchaboon<sup>1,2</sup>, Nakrob Wongboonma<sup>1,2</sup>, Chanyanuch Korakngam<sup>1,2</sup>,

Maturada Ruangsiri<sup>6</sup>, Chalida Leksomboon<sup>3</sup> and Julapark Chunwongse<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

<sup>3</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>4</sup> ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>5</sup> สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

<sup>6</sup> ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>1</sup> Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

<sup>2</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900

<sup>3</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

<sup>4</sup> Tropical Vegetable Research Center, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

<sup>5</sup> Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170

<sup>6</sup> Rice Science Center, Rice Gene Discovery Unit, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

รับเรื่อง: 17 กุมภาพันธ์ 2564 Received: 17 February 2021

ปรับแก้ไข: 21 พฤษภาคม 2564 Revised: 21 May 2021

รับตีพิมพ์: 31 พฤษภาคม 2564 Accepted: 31 May 2021

\* Corresponding author: julapark.c@ku.th

**ABSTRACT:** Association mapping based on linkage disequilibrium in diverse population could significantly improve the resolution and accuracy of marker-trait associations compared with linkage analysis. Therefore, this study aimed to identify quantitative trait loci (QTL) for bacterial wilt resistance through positional candidate loci and functional candidate genes using association mapping method. A total of 92 tomato cultivars consisting of 51 international resistance, 2 Thai commercial resistance cultivars and 39 susceptible lines were used for analysis with general linear model using TASSEL program. The association between markers and bacterial wilt resistance was determined by probability at  $P < 0.05$ . The results revealed that most of significant associated markers were correlated to previously QTL reports i.e., TG48 (Chromosome 2), TG118, CP18 (Chromosome 6) and T0989 (Chromosome 12). Furthermore, moderate significant level of new QTL on chromosome 1 was identified for SSR134, SSR572, SSR117 and SSR65 markers. For the association analysis by functional candidate gene, four disease resistance genes, LRR, ascorbate

peroxidase, jasmonate and ethylene, were related to bacterial wilt resistance. Therefore, this study confirmed that association mapping is a method that could be used to detect QTL as same as the linkage analysis in bi-parental population.

**Keywords:** SSR marker, COS marker, TASSEL program, quantitative trait, bacterial wilt

## บทคัดย่อ

Association mapping ที่อาศัยความสัมพันธ์ทาง linkage disequilibrium ในประชากรที่มีความหลากหลายสามารถให้ความละเอียดและความแม่นยำที่ดีขึ้นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ต้องการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบลิงค์เกจ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุตำแหน่ง (Quantitative trait loci; QTL) ด้านทานโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศด้วยวิธี association mapping โดยใช้ positional candidate loci และ functional candidate gene มะเขือเทศทั้งหมด 92 สายพันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์ต้านทานจากนานาชาติ 51 สายพันธุ์ พันธุ์การค้าของไทย 2 สายพันธุ์ และมะเขือเทศอ่อนแอ 39 สายพันธุ์ ถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะที่ศึกษาด้วยวิธี general linear mode โดยโปรแกรม TASSEL ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อลักษณะที่ศึกษาถูกพิจารณาจากค่า probability (P) ที่  $P < 0.05$  ผลการวิเคราะห์ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาส่วนใหญ่เป็นตำแหน่ง (QTL) ที่เคยมีรายงานไว้แล้ว ได้แก่ TG48 (โครโมโซม 2), TG118 และ CP18 (โครโมโซม 6) และ T0989 (โครโมโซม 12) นอกจากนี้ ตำแหน่งใหม่บนโครโมโซม 1 ที่มีความสัมพันธ์ระดับปานกลางกับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาถูกตรวจพบสำหรับเครื่องหมายพันธุกรรม SSR134, SSR572,

SSR117 และ SSR65 สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย functional candidate gene พบว่า ยีนต้านทานโรค 4 ยีน คือ LRR, ascorbate peroxidase, jasmonate และ ethylene มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉา ดังนั้น การศึกษานี้ยืนยันได้ว่าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะโดยวิธี association mapping เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจหาตำแหน่งที่สัมพันธ์ต่อลักษณะที่ต้องการศึกษาได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์แบบลิงค์เกจในประชากรที่เป็น bi-parental

**คำสำคัญ:** เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์, เครื่องหมายดีเอ็นเอ COS, โปรแกรม TASSEL, ลักษณะเชิงปริมาณ, โรคเหี่ยวเฉา

## บทนำ

โรคเหี่ยวเฉา (Bacterial wilt) เป็นปัญหาที่รุนแรงสำหรับการเพาะปลูกมะเขือเทศในเขตร้อน กึ่งร้อน และอบอุ่น โดยเชื้อสาเหตุของโรคมียากหลายทางพันธุกรรมสูง มีพืชอาศัยหลายชนิด ทำให้เชื้อแพร่กระจายได้ดีและมีชีวิตอยู่ได้นาน ส่งผลให้การควบคุมโรคนี้ดำเนินการได้ยาก (Hayward, 1991) โรคเหี่ยวเฉาทำความเสียหายต่อการผลิตมะเขือเทศในประเทศไทย 20–90 เปอร์เซ็นต์ (Thaveechai *et al.*, 1992) ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีที่ควบคุมโรคนี้นี้ได้ ดังนั้น การใช้พันธุ์ต้านทานจึงเป็นวิธีการควบคุมโรคที่ดีและมีประสิทธิภาพวิธีการหนึ่ง

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศด้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวเริ่มขึ้นในช่วงต้นศตวรรษที่ 20 โดยการค้นหาพันธุ์ต้านทานจากมะเขือเทศประมาณ 100 สายพันธุ์ (Kelman, 1953; Acosta, 1963) ต่อมาได้มีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีมาตรฐาน (Conventional breeding) ในอีกหลายสถาบัน ได้แก่ มหาวิทยาลัยเปอร์โตริโก มหาวิทยาลัยนอร์ทคาโรไลนา มหาวิทยาลัยฮาวาย มหาวิทยาลัยฟลอริดา และศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักโลก (World Vegetable Center) แต่เนื่องจากลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (Acosta *et al.*, 1964; Anand *et al.*, 1993) ที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง โดยยีนต้านทานแต่ละตำแหน่งตอบสนองต่อสายพันธุ์ของเชื้ออย่างเฉพาะเจาะจง (Strain-specific หรือ phylotype-specific) (Wang *et al.*, 2000; Carmeille *et al.*, 2006) ทำให้พันธุ์ต้านทานที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐานยังไม่เสถียรมากนัก พันธุ์ที่แสดงความต้านทานได้ในพื้นที่หนึ่งแต่กลับอ่อนแอในอีกสถานที่หนึ่ง (Hanson *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998)

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือก (Marker assisted selection; MAS) เป็นการปรับปรุงพันธุ์แนวใหม่ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาหาตำแหน่งของยีนหรือเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic markers) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจก่อน โดยลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวในมะเขือเทศนั้น ได้มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวโดยอาศัยแผนที่โครโมโซม ด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้านลิงค์เกจในมะเขือเทศพันธุ์ต้านทาน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ L285 และ Hawaii7996 พบความต้านทานในหลายตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งบนโครโมโซม 2, 3, 4, 6, 8, 10 และ 12 (Danesh *et al.*, 1994; Thoquet *et al.*, 1996a; 1996b; Dara-Carlos, 1998; Wang *et al.*, 2000; Carmeille *et al.*, 2006) โดยพบทั้งตำแหน่งหลัก (Major QTL) ได้แก่ TG48 บนโครโมโซม 2 (Dara-Carlos, 1998), TG118 และ CP18 บน

โครโมโซม 6, TG268 และ GP165 บนโครโมโซม 4 (Thoquet *et al.*, 1996a) และตำแหน่งรอง (Minor QTL) ได้แก่ CP105 บนโครโมโซม 10 และ GP165 บนโครโมโซม 11 (Thoquet *et al.*, 1996a)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อลักษณะที่สนใจ (Marker-trait association) โดยใช้ประชากรที่มีอยู่ในธรรมชาติ หรือจากการคัดเลือกโดยมนุษย์ เช่น สายพันธุ์แท้ที่ใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ เชื้อพันธุกรรมที่เก็บรวบรวมไว้ รวมทั้งพันธุ์พื้นเมืองต่าง ๆ โดยอาศัยการค้นหาอัลลีล หรือฮาโพลีไทป์ที่ตำแหน่ง 2 ตำแหน่ง มีการถ่ายทอดไปด้วยกันเสมอ (Linkage disequilibrium) ซึ่งเรียกว่า association mapping, LD mapping หรือ association analysis เป็นวิธีการหาถิ่นของลักษณะเชิงปริมาณ ที่สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของหลายอัลลีลพร้อมกันได้ โดยไม่ต้องสร้างประชากรแยก และมีความละเอียดสูง (Buckler IV and Thornsberry, 2002; Flint-Garcia *et al.*, 2003) และได้มีการนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะสำคัญในพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด (Remington *et al.*, 2001; Thornsberry *et al.*, 2001; Palaisa *et al.*, 2003; 2004) ข้าว (Garris *et al.*, 2003) ข้าวสาลี (Kruger *et al.*, 2004) ข้าวบาร์เลย์ (Ivancic *et al.*, 2002) ต้นอะราบิดอปซิส (*Arabidopsis*) (Nordborg *et al.*, 2002) และมันฝรั่ง (Gebhardt *et al.*, 2004) สำหรับมะเขือเทศได้มีการใช้ genome-wide association study (GWAS) ในการวิเคราะห์ตำแหน่งที่ควบคุมคุณภาพของผลมะเขือเทศ (Mazzucato *et al.*, 2008; Ranc *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Ruggieri *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a) และสารระเหยที่มีผลต่อรสชาติของมะเขือเทศ (Zhang *et al.*, 2015b)

มะเขือเทศพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวถูกรวบรวม โดยความร่วมมือของนักปรับปรุงพันธุ์ด้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวในมะเขือเทศจากทั่วโลก และมีการทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานต่อโรคนี้นในพื้นที่

ต่าง ๆ ของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบว่า มะเขือเทศด้านทานพันธุ์ Hawaii7996 แสดงความต้านทานในระดับสูงในหลายพื้นที่ และพบความสัมพันธ์ของความต้านทานโรคนี้อันจำเพาะกับพื้นที่ด้วย (Wang *et al.*, 1998) ส่วนพันธุ์ L285 แสดงความต้านทานดี และมีสมรรถนะการผสมทั่วไป (General combining ability) ดีด้วยเช่นกัน (Hanson *et al.*, 1998) นอกจากนี้ ยังมีการทดสอบลักษณะทางการเกษตรและผลผลิตของมะเขือเทศชุดนี้ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดย Butsarakul *et al.* (1997) มะเขือเทศพันธุ์ด้านทานชุดนี้จึงจัดว่ามีความหลากหลายของยีนต้านทานโรคเหี่ยวเฉาที่ได้จากแหล่งความต้านทานที่แตกต่างกัน ซึ่งเหมาะสำหรับนำไปใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเฉาโดยวิธี association mapping ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ต่อลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเฉาด้วยวิธี association mapping ทั้งโดย positional candidate loci ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ และเครื่องหมายดีเอ็นเอ conserved ortholog set (COS) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาจากการค้นหายีนที่มีการอนุรักษ์ โดยการเปรียบเทียบระหว่างจีโนมมะเขือเทศกับต้นอะราบิดอปซิส (Fulton *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006) เพิ่มเติมอย่างละเอียดในบริเวณที่มีรายงานมาก่อนว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเฉาจากการวิเคราะห์แบบลิงค์เกจ (Linkage analysis) รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของยีนต้านทานโรคเหี่ยวเฉาโดย functional candidate gene ที่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการด้านทานโรคอื่น ๆ ที่ได้มีรายงานไว้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็นการเพิ่มความละเอียดในการหาดำแหน่งยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนมากขึ้น รวมถึงการตรวจหาอัลลีลด้านทานในพันธุ์ด้านทานต่าง ๆ ไปพร้อมกัน

## อุปกรณ์และวิธีการ

### มะเขือเทศที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อพันธุ์กรรมมะเขือเทศที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 92 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มด้านทาน 53 พันธุ์ โดยเป็นพันธุ์ที่ได้มาจากโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ด้านทานโรคเหี่ยวเฉา ที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักโลก จำนวน 51 พันธุ์ (Hanson *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998) และพันธุ์การค้าของไทย 2 สายพันธุ์ และกลุ่มอ่อนแอ 39 พันธุ์ โดยเชื้อพันธุ์กรรมกลุ่มอ่อนแอพิจารณาจากสายพันธุ์ที่ใช้เป็น susceptible check ในงานวิจัยต่าง ๆ ได้แก่ พันธุ์ Wva700, L390 และ CLN286 (Hanson *et al.*, 1996; Dara-Carlos, 1998; Hanson *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000) รวมทั้งสอบถามข้อมูลจากอาจารย์กรุง สีตะธณี (Personal communication) นักวิชาการเกษตร ผู้เชี่ยวชาญด้านการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อนแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จาก ดร. สิริกุล วะสี ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อนแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

### การศึกษาโครงสร้างประชากร

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 50 ตำแหน่ง ที่ครอบคลุม 12 โครโมโซม ซึ่งมีระยะห่างเฉลี่ยประมาณ 25 เซนติเมอร์แกน จากฐานข้อมูลของ Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากรมะเขือเทศ

### การศึกษาความสัมพันธ์ต่อลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเฉาโดย positional candidate loci

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด COS ถูกคัดเลือกจากฐานข้อมูลมะเขือเทศของ Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>) สำหรับใช้เป็น

candidate gene ที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ QTL ที่พบความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวบนโครโมโซม 2, 6 และ 12 จำนวน 33 ตำแหน่ง ร่วมกับยีน 3 ยีน คือ *ovate*, *Mi* และ *Fer* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 6 นอกจากนี้ ยังใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจพบความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวจากการวิเคราะห์ลิงค์เกจ จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ TG48, TG118 และ CP18 ที่ตรวจสอบด้วยวิธี cleaved amplified polymorphisms (CAPS) และ single strand conformation polymorphism (SSCP)

### การศึกษาความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวโดยยีนต้านทานโรคบนโครโมโซม 6 โดย functional candidate gene

#### การคัดเลือกตัวแทนยีนต้านทานโรค (Resistant candidate genes) บนโครโมโซม 6

โปรแกรม Marker to Sequence (<https://www.eusol.wur.nl/marker2seq/>) ถูกนำมาใช้ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรคในบริเวณที่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ CP18, TG118 (Thoquet *et al.*, 1996a; 1996b), TG73 (Carmeille *et al.*, 2006) และ TG365 (Danesh *et al.*, 1994) ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวบนโครโมโซม 6 ของมะเขือเทศ จากนั้น ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม BatchPrimer3 v1.0 (You *et al.*, 2008)

#### การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างมะเขือเทศต้านทานและอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว

มะเขือเทศ 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว 2 พันธุ์ คือ Hawaii7796 และ L285 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว 2 พันธุ์ คือ CLN 286 และ L390 ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างมะเขือเทศต้านทานและอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว โดยสำรวจหาความแตกต่างทาง

พันธุกรรมบริเวณยีนที่ได้จากการคัดเลือกตัวแทนยีนต้านทานโรค (Resistant candidate genes) บนโครโมโซม 6 สกัดดีเอ็นเอของมะเขือเทศด้วยวิธีการของ Fulton *et al.* (1995) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนที่ศึกษาด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction; PCR) ดังนี้ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ng, 1X PCR buffer, 100  $\mu$ M dNTP, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ M primer forward, 0.5  $\mu$ M primer reverse และ *Taq* DNA polymerase ในปริมาตรทั้งหมด 20  $\mu$ L ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยมีการเปลี่ยนแปลงตามลำดับดังต่อไปนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ ระบุปฏิกิริยาโดยการเติมสีย้อม (Dye) 1 เท่าของปฏิกิริยา และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel 4.5 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Photo Capt (Vilber Lourmat, France)

#### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวของยีนต้านทานโรค (Resistant candidate genes) บนโครโมโซม 6

ยีนที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอที่ได้จากการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างมะเขือเทศต้านทานและอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวด้วยวิธีการข้างต้น ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในมะเขือเทศทั้ง 92 พันธุ์ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวต่อไป

#### การประเมินโรคเหี่ยวเหี่ยว

ใช้ผลการประเมินโรคเหี่ยวเหี่ยวตามรายงานของ Srisawad *et al.* (2012) โดยมีรายละเอียดดังนี้

### เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ทดสอบความต้านทานโรคในสภาพโรงเรือน ด้วยเชื้อ 3 ไอโซเลท คือ CT1, EWS1 และ RS145 โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง triphenyl tetrazolium chloride ที่ไม่เติมสาร 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride เมื่อเชื้อมีอายุ 48 ชั่วโมง ทำการเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ  $10^8$  cfu/mL โดยวัดความเข้มข้นของเชื้อจากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.2 (Vudhivanich and Soontarasing, 1996)

ทดสอบโรคในแปลงปลูกที่มีเชื้อสาเหตุโรค *Ralstonia solanacearum* (ไอโซเลท S1) ซึ่งเป็นแปลงสำหรับใช้ทดสอบพันธุ์มะเขือเทศในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ของ บริษัท ซินเจนทาซีดี จำกัด ที่มีการรักษาเชื้อโดยการปลูกมะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอกลับกับมะเขือเทศทดสอบ

### การทดสอบโรคในสภาพโรงเรือนในระยะต้นกล้า

เพาะเมล็ดมะเขือเทศทดสอบลงในวัสดุปลูกหรือพีทมอส เมื่อต้นกล้ามีอายุ 3-4 สัปดาห์ จึงย้ายลงกระถางขนาด 4 นิ้ว จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุ 4-5 สัปดาห์ จึงนำไปปลูกเชื้อ โดยใช้กรรไกรจุ่มสารละลายเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท ที่เตรียมไว้ และตัดใบจริงคู่แรก 2 ใบ ที่อยู่เหนือใบเลี้ยง

### การทดสอบโรคในแปลงปลูก

ทดสอบโรคในสภาพแปลง โดยได้รับความอนุเคราะห์ในการดำเนินการทดสอบโรคจาก บริษัท ซินเจนทาซีดี จำกัด โดยการเพาะเมล็ดในพีทมอส จากนั้นย้ายต้นกล้าที่อายุประมาณ 45 วัน ลงปลูกในแปลงที่มีเชื้อ *R. solanacearum* อยู่อาศัยในดิน โดยย้ายกล้ามะเขือเทศลงแปลงปลูก พันธุ์ละ 1 แปลง จำนวน 10 ต้น โดยจัดเป็น 1 ซ้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อมะเขือเทศ 1 พันธุ์

### การประเมินระดับความต้านทานโรค

การประเมินระดับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศที่ทดสอบในสภาพโรงเรือน ดัดแปลงจากวิธีของ Winstead and Kelman (1952) โดยจำแนกระดับคะแนนการเกิดโรคเป็น 6 ระดับ ดังนี้ ระดับ 1 ต้นมะเขือเทศปกติ ระดับ 2 มีใบเหี่ยว 1 ใบ ระดับ 3 มีใบเหี่ยว 2-3 ใบ ระดับ 4 มีใบเหี่ยว 4 ใบขึ้นไป แต่ยังไม่เหี่ยวถึงยอด ระดับ 5 เหี่ยวทั้งต้น และระดับ 6 ต้นมะเขือเทศตาย สำหรับการทดสอบในสภาพแปลง จำแนกระดับการเกิดโรคเป็น 6 ระดับ ดังนี้ ระดับ 0 ต้นมะเขือเทศปกติ ไม่แสดงอาการของโรค ระดับ 1 แสดงอาการเหี่ยว < 20 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น ระดับ 2 แสดงอาการเหี่ยว 20 ถึง <60 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น ระดับ 3 แสดงอาการเหี่ยว 60 ถึง <100 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น ระดับ 4 แสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น และระดับ 5 ต้นมะเขือเทศตาย (Hai et al., 2008)

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเฉา

ความสัมพันธ์ระหว่างความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาและตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ (หรือยีน) ถูกวิเคราะห์ด้วย general linear mode ในโปรแกรม TASSEL เวอร์ชัน 2.1 (Bradbury et al., 2007) โดยใช้ค่าสัดส่วนประชากรที่กลุ่มย่อยต่าง ๆ ของการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรที่  $K=7$  ซึ่งได้จากการศึกษาโครงสร้างประชากร ดังสมการ

$$y = X\beta + e$$

โดย  $y$  คือ เวกเตอร์ของค่าการทดสอบโรคเหี่ยวเฉาด้วยเชื้อ 4 ไอโซเลท ได้แก่ 1) ไอโซเลท CT1 ประเมินโรคด้วยค่า relative area under disease progress curve (RAUDPC) จากค่า disease index (DI) ของการทดสอบโรคที่จังหวัดกาญจนบุรี 2) ไอโซเลท S1 ค่าเฉลี่ยของระดับคะแนนการเกิดโรคที่ 50 วันหลังปลูกเชื้อ (Day after inoculation; DAI) ของการ

ทดสอบโรคที่จังหวัดขอนแก่น 3) ไอโซเลท RS145 ประเมินโรคด้วยค่า RAUDPC จากค่า DI ที่ 13 DAI ของการทดสอบโรคที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และ 4) ไอโซเลท EWS1 ประเมินโรคด้วยค่า RAUDPC จากค่าเปอร์เซ็นต์ต้นเหี่ยว (percent wilt plant) ที่ 28 DAI ของการทดสอบโรคที่จังหวัดเชียงใหม่ (Srisawad *et al.*, 2012),  $X$  คือ matrix ของค่าทางพันธุกรรมในแต่ละตำแหน่ง (marker) หรือยีนและค่า population structure ( $Q$  matrix),  $\beta$  คือ เวกเตอร์ของจีโนไทป์และโครงสร้างประชากร และ  $e$  คือ ความแปรปรวนอื่น ๆ ที่ไม่สามารถอธิบายได้ หรือ residual effects

ค่า  $\beta$  ของสมการถดถอย (regression) ถูกนำมาใช้ในการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวและเครื่องหมายดีเอ็นเอ (หรือยีน) โดยพิจารณานัยสำคัญของความสัมพันธ์จากค่า probability ( $P$ ) โดยค่า  $P < 0.05$  จัดว่าตำแหน่งนั้นมีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวล็กน้อย (\*) เมื่อค่า  $P$  เป็น 0.001–0.009, 0.0001–0.0009, 0.00001–0.00009 และ 0.000001–0.000009 จัดว่ามีความสัมพันธ์กันน้อย (\*\*), ปานกลาง (\*\*\*), สูง (\*\*\*\*) และ สูงมาก (\*\*\*\*\*) ตามลำดับ

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### ความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียว โดยตำแหน่งที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคเหี่ยวเขียว (Positional candidate loci)

Table 1 แสดงผลการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวจำนวน 57 ตำแหน่ง จำแนกเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 37 ตำแหน่ง เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด COS 14 ตำแหน่ง เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน 2 ยีน คือ *Mi* และ *Fer* และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวจากรายงานก่อนหน้า 4 ตำแหน่ง ได้แก่ TG48, TG118, CP18 และ T0989 จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ TG48, TG118, CP18 และ T0989 ด้วยวิธี association mapping พบว่า สามารถตรวจพบความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวของทั้ง 4 ตำแหน่งดังกล่าว เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ QTL แบบลิงค์เกจตามที่ได้มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ ยังพบตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวในหลาย ๆ ตำแหน่งที่สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา

**Table 1** Association mapping for bacterial wilt resistance through 57 positional candidate loci

Name of marker	Type of Marker*	Chromosome	Isolate of <i>R. solanacearum</i>			
			CT1 <sup>2</sup>	S1 <sup>3</sup>	RS145 <sup>4</sup>	EWS1 <sup>5</sup>
SSR266	SSR	1	0.12 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>	0.89 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>
SSR134	SSR	1	0.01*	0.26 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>
SSR75	SSR	1	0.77 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>	0.19 <sup>ns</sup>
SSR222	SSR	1	0.04 <sup>ns</sup>	0.14 <sup>ns</sup>	0.25 <sup>ns</sup>	0.04*
SSR572	SSR	1	0.001**	0.004**	0.53 <sup>ns</sup>	0.02*
SSR117	SSR	1	0.0008***	0.002**	0.53 <sup>ns</sup>	0.01*
SSR65	SSR	1	0.001**	0.12 <sup>ns</sup>	0.00088***	0.00018***
SSR40	SSR	2	0.78 <sup>ns</sup>	0.92 <sup>ns</sup>	0.76 <sup>ns</sup>	0.70 <sup>ns</sup>
SSR5	SSR	2	0.81 <sup>ns</sup>	0.66 <sup>ns</sup>	0.62 <sup>ns</sup>	0.28 <sup>ns</sup>
SSR349	SSR	2	0.02*	0.001**	0.54 <sup>ns</sup>	0.01*
SSR103	SSR	2	0.87 <sup>ns</sup>	0.55 <sup>ns</sup>	0.56 <sup>ns</sup>	0.83 <sup>ns</sup>
SSR331	SSR	2	0.35 <sup>ns</sup>	0.26 <sup>ns</sup>	0.008**	0.17 <sup>ns</sup>
TG48	QTL	2	0.85 <sup>ns</sup>	0.61 <sup>ns</sup>	0.03*	0.49 <sup>ns</sup>
C2_At3g55250	COS	2	0.87 <sup>ns</sup>	0.93 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	0.50 <sup>ns</sup>
T0628-H	COS	2	0.21 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	0.50 <sup>ns</sup>	0.52 <sup>ns</sup>
T0723	COS	2	0.93 <sup>ns</sup>	0.64 <sup>ns</sup>	0.29 <sup>ns</sup>	0.53 <sup>ns</sup>
C2_At2g04700	COS	2	0.94 <sup>ns</sup>	0.89 <sup>ns</sup>	0.92 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>ns</sup>
SSR287	SSR	2	0.35 <sup>ns</sup>	0.74 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.84 <sup>ns</sup>
SSR111	SSR	3	0.03*	0.04*	0.05 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>
SSR330	SSR	3	0.0000248****	0.0001620***	0.0000099*****	0.004**
SSR320	SSR	3	0.64 <sup>ns</sup>	0.44 <sup>ns</sup>	0.82 <sup>ns</sup>	0.02*
SSR296	SSR	4	0.51 <sup>ns</sup>	0.03*	0.26 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>ns</sup>
SSR306	SSR	4	0.38 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>ns</sup>	0.97 <sup>ns</sup>
SSR94	SSR	4	0.73 <sup>ns</sup>	0.83 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>	0.44 <sup>ns</sup>
SSR146	SSR	4	0.43 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	0.46 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>
SSR115	SSR	5	0.27 <sup>ns</sup>	0.27 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	0.11 <sup>ns</sup>
TES62	SSR	5	0.81 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	0.11 <sup>ns</sup>	0.04*
<i>Mi</i>	gene	6	0.28 <sup>ns</sup>	0.82 <sup>ns</sup>	0.71 <sup>ns</sup>	0.96 <sup>ns</sup>
<i>Fer-H</i>	gene	6	0.00009****	0.00002****	0.22 <sup>ns</sup>	0.00051***
TG118	QTL	6	0.01*	0.002**	0.09 <sup>ns</sup>	0.01*



Table 1 Continued.

Name of marker	Type of Marker*	Chromosome	Isolate of <i>R. solanacearum</i>			
			CT1 <sup>2</sup>	S1 <sup>3</sup>	RS145 <sup>4</sup>	EWS1 <sup>5</sup>
T1079	QTL	6	0.005**	0.002**	0.03*	0.003**
cLET-4-G23	COS	6	0.03*	0.002**	0.29 <sup>ns</sup>	0.02*
cLET-6-I13	COS	6	0.001**	0.002**	0.67 <sup>ns</sup>	0.009**
U217233-H	COS	6	0.000498***	0.000002*****	0.000033****	0.000071****
C2_At1g44760	COS	6	0.000942***	0.000095****	0.002**	0.000122***
CP18	QTL	6	0.02*	0.000964***	0.22 <sup>ns</sup>	0.01*
C2_At4g10030-H	COS	6	0.02*	0.004**	0.000417***	0.03*
C2_At1g73885	COS	6	0.97 <sup>ns</sup>	0.49 <sup>ns</sup>	0.02*	0.33 <sup>ns</sup>
C2_At5g61910	COS	6	0.49 <sup>ns</sup>	0.91 <sup>ns</sup>	0.005**	0.19 <sup>ns</sup>
SSR350	SSR	6	0.008**	0.007**	0.20 <sup>ns</sup>	0.11 <sup>ns</sup>
SSR285	SSR	7	0.09 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>	0.56 <sup>ns</sup>
SSR276	SSR	7	0.84 <sup>ns</sup>	0.26 <sup>ns</sup>	0.29 <sup>ns</sup>	0.61 <sup>ns</sup>
SSR45	SSR	7	0.09 <sup>ns</sup>	0.49 <sup>ns</sup>	0.54 <sup>ns</sup>	0.41 <sup>ns</sup>
TGS2259	SSR	7	0.86 <sup>ns</sup>	0.49 <sup>ns</sup>	0.21 <sup>ns</sup>	0.24 <sup>ns</sup>
SSR344	SSR	8	0.09 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	0.19 <sup>ns</sup>	0.61 <sup>ns</sup>
SSR63	SSR	8	0.37 <sup>ns</sup>	0.54 <sup>ns</sup>	0.02*	0.75 <sup>ns</sup>
SSR69	SSR	9	0.004**	0.01*	0.001**	0.007**
SSR19	SSR	9	0.07 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	0.28 <sup>ns</sup>	0.58 <sup>ns</sup>
SSR383	SSR	9	0.53 <sup>ns</sup>	0.87 <sup>ns</sup>	0.68 <sup>ns</sup>	0.43 <sup>ns</sup>
SSR333	SSR	9	0.05 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	0.01*	0.02*
SSR248	SSR	10	0.39 <sup>ns</sup>	0.02*	0.43 <sup>ns</sup>	0.43 <sup>ns</sup>
SSR360	SSR	10	0.25 <sup>ns</sup>	0.48 <sup>ns</sup>	0.84 <sup>ns</sup>	0.67 <sup>ns</sup>
SSR46	SSR	11	0.20 <sup>ns</sup>	0.01*	0.14 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>
T0659-Tru1l	COS	12	0.38 <sup>ns</sup>	0.80 <sup>ns</sup>	0.54 <sup>ns</sup>	0.38 <sup>ns</sup>
C2_At2g06005	COS	12	0.15 <sup>ns</sup>	0.14 <sup>ns</sup>	0.25 <sup>ns</sup>	0.66 <sup>ns</sup>
T0989	COS	12	0.006**	0.001**	0.89 <sup>ns</sup>	0.008**
SSR20	SSR	12	0.30 <sup>ns</sup>	0.64 <sup>ns</sup>	0.24 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup> SSR = Simple sequence repeat (or Microsatellite marker), COS = Conserved ortholog set, Gene = gene marker, and QTL = BW resistance QTL

<sup>2</sup> Relative area under disease progress curve (RAUDPC) of disease index evaluated with CT1 isolate at Kanchanaburi province

<sup>3</sup> Mean of disease scoring at 50 days after inoculation from field trial at Khonkaen province with S1 isolate

<sup>4</sup> RAUDPC of disease index at 13 days after inoculation evaluated with RS145 isolate

<sup>5</sup> RAUDPC of percent wilt plant at 28 days after inoculation evaluated with EWS1 isolate

\* P < 0.05, \*\* P = 0.001–0.009, \*\*\* P = 0.0001–0.0009, \*\*\*\* P = 0.00001–0.00009, \*\*\*\*\* P = 0.000001–0.000009, ns = not significant

โครโมโซม 6 เป็นบริเวณที่พบตำแหน่งที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวจำนวนมากที่สุด (Table 1) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ตำแหน่งที่พบส่วนมากเป็นตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซมตามที่เคยมีรายงานไว้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบลิงค์เกจยวกันโครโมโซม 1 ซึ่งเป็นตำแหน่งใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน เมื่อพิจารณาตำแหน่งที่สัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวกับเชื้อ *R. solanacearum* ที่ต่างกันจำนวน 4 ไอโซเลทพบว่า มี 6 ตำแหน่ง บน 3 โครโมโซม ที่มีความสัมพันธ์ต่อเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท คือ โครโมโซม 3 มี 1 ตำแหน่ง ได้แก่ SSR330 โครโมโซม 6 พบ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ T1079, U217233-H, C2\_At1g44760 และ C2\_At4g10030-H โดยมีอีก 1 ตำแหน่ง บนโครโมโซม 9 คือ SSR69 ขณะที่ ตำแหน่งของ SSR331 (โครโมโซม 2), TG48 (โครโมโซม 2) และ SSR63 (โครโมโซม 8) มีความสัมพันธ์เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ RS145 เท่านั้น

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวโดยวิธี association mapping นี้ สอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบลิงค์เกจที่พบว่า ตำแหน่งบนโครโมโซม 6 มีความสัมพันธ์กับเชื้อหลายไอโซเลทเช่นกัน (Danesh *et al.*, 1994; Thoquet *et al.*, 1996a; 1996b; Wang *et al.*, 2000; Carmelle *et al.*, 2006) แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวในบางตำแหน่งเป็นแบบ horizontal คือ ตอบสนองต่อเชื้อได้หลากหลายไอโซเลท เช่น ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซม 6 ได้แก่ U217233-H, C2\_At1g44760 และ C2\_At4g10030-H เป็นต้น ขณะที่ บางตำแหน่งแสดงความสัมพันธ์ที่เฉพาะเจาะจง เช่น ตำแหน่งของ SSR320 (โครโมโซม 3) พบว่า มีความสัมพันธ์ต่อเชื้อ EWS1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.02$ ) และ ตำแหน่งของ SSR331 และ TG48 บนโครโมโซม 2 และ SSR63 บนโครโมโซม 8 มีความสัมพันธ์เฉพาะเจาะจง

ต่อเชื้อ RS145 เท่านั้น ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $P = 0.008, 0.03$  และ  $0.02$  ตามลำดับ ซึ่งการตรวจพบความสัมพันธ์ของความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวที่ตำแหน่ง TG48 ที่จำเพาะต่อเชื้อ RS145 นี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Dara-Carlos (1998) ที่ใช้เชื้อ RS145 ซึ่งเป็นไอโซเลทเดียวกันกับการศึกษาในครั้งนี้

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ TG48 (โครโมโซม 2), TG118 (โครโมโซม 6), CP18 (โครโมโซม 6) และ T0989 (โครโมโซม 12) ซึ่งใช้เป็นตำแหน่งควบคุมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคเหี่ยวเขียวโดยการวิเคราะห์แบบลิงค์เกจ เมื่อใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี association mapping ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียวเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ QTL แบบลิงค์เกจ โดยพบว่า ตำแหน่งของ TG48 มีความสัมพันธ์ที่เฉพาะต่อเชื้อ RS145 เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ที่พบว่า มีเฉพาะรายงานของ Dara-Carlos (1998) เท่านั้น ที่พบความสัมพันธ์ของตำแหน่งนี้ และได้ใช้เชื้อ RS145 ซึ่งเป็นไอโซเลทเดียวกันในการทดสอบ แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเขียว ด้วยวิธี association mapping ให้ผลการวิเคราะห์ในระดับตำแหน่งที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ QTL แบบลิงค์เกจ ตามที่ได้เคยมีรายงานไว้ นอกจากนี้ การวิเคราะห์โดยวิธี association mapping ยังสามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ระดับอัลลีลที่สัมพันธ์ต่อลักษณะที่ศึกษาได้เช่นกัน ดังการศึกษาของ Srisawad (2012) ที่พบว่า ที่ตำแหน่งของ SSR349 อัลลีล A แสดงถึงความต้านทาน และอัลลีล E ที่ตำแหน่งของ SSR19 สัมพันธ์กับความต้านทานในมะเขือเทศพันธุ์ Hawaii7996, Hawaii7997 และ GA1565

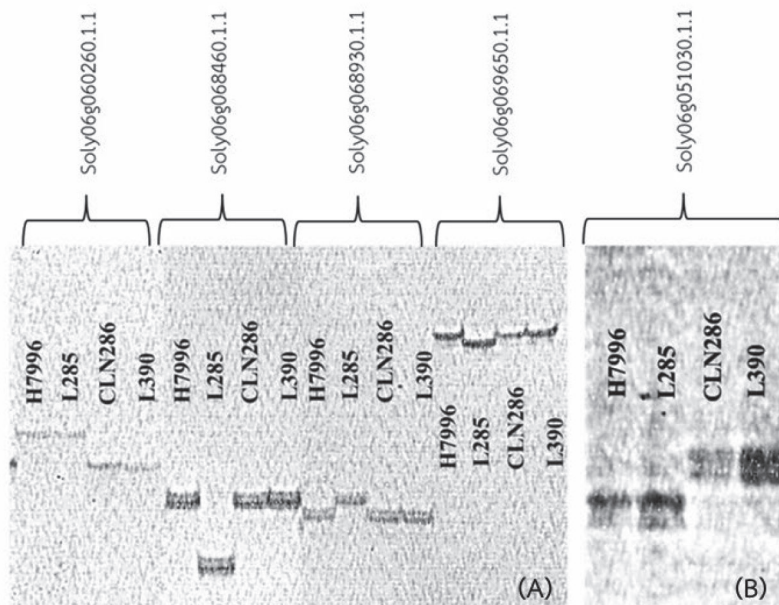
ความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวโดย ยีนต้านทานโรคบนโครโมโซม 6 (Functional candidate gene)

**การคัดเลือกตัวแทนยีนต้านทานโรค (Resistant candidate genes) บนโครโมโซม 6**

จากการคัดเลือกยีนต้านทานโรคบนโครโมโซม 6 ที่อยู่ในบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอ CP18, TG118, TG73 และ TG365 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สัมพันธ์ทางลิงค์เกจกับความต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ โดยการค้นหา ยีนต่าง ๆ ที่อยู่ในบริเวณดังกล่าวด้วยโปรแกรม Marker to Sequence (<https://www.eusol.wur.nl/marker2seq/>) ได้คัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคในมะเขือเทศมาทั้งหมด 34 ยีน (Table 2) เช่น coiled-coil-containing protein, TIR-NBS-LRR resistance protein, jasmonate ZIM-domain protein 2, nucleotide binding site (NBS), ethylene receptor, leucine rich repeat (LRR), ascorbate peroxidase, kinase และ WRKY เป็นต้น จากนั้นได้นำยีนดังกล่าวมาหาข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูล Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยได้ไพรเมอร์ชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) ภายในยีน จำนวน 17 ยีน และที่ไมใช่ไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 17 ยีน แต่มีเพียง 6 ยีน คือ Solyc06g051030.1.1, Solyc06g051540.1.1, Solyc06g054480.1.1, Solyc06g062440.1.1, Solyc06g064790.1.1 และ Solyc06g065120.1.1 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ ซึ่งถูกนำไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะเขือเทศที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยวด้วยเทคนิค CAPS ต่อไป ส่วนอีก 11 ยีน ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้

**การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างมะเขือเทศต้านทานและอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว**

จากการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism เพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว (Hawaii7796 และ L285) และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหี่ยว (CLN286 และ L390) พบว่า ยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่มี polymorphism จำนวน 4 ยีน (คิดเป็น 23.53 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ Solyc06g060260.1.1, Solyc06g068460.1.1, Solyc06g068930.1.1 และ Solyc06g069650.1.1 (Figure 1A) นอกจากนี้ ยังพบว่ายีนต้านทานโรคที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค CAPS มี 1 ยีน ที่มี polymorphism (คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ Solyc06g051030.1.1 (Figure 1B)



**Figure 1** Polymorphisms of simple sequence repeat (SSR) marker in 4 candidate genes: Solyc06g060260.1.1, Solyc06g068460.1.1, Solyc06g068930.1.1 and Solyc06g069650.1.1 (A) and 1 cleaved amplified polymorphisms (CAPS) marker in candidate gene: Solyc06g051030.1.1 (B)

**Table 2** Thirty-four resistant candidate genes on chromosome 6 used for DNA polymorphic survey between bacterial wilt resistance (Hawaii7996 and L285) and susceptible (CLN286 and L390) tomato cultivars

Contig name	Description	Technique <sup>1</sup>	DNA polymorphic <sup>2</sup>
Solyc06g051030.1.1	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1	CAPS	P
Solyc06g051510.1.1	Kinase family protein	SSR	M
Solyc06g051540.1.1	Receptor kinase-like protein	CAPS	M
Solyc06g051610.1.1	Ethylene receptor	NA	NA
Solyc06g051840.1.1	Ethylene responsive transcription factor	NA	NA
Solyc06g054320.1.1	Disease resistance response	NA	NA
Solyc06g054430.1.1	F-box/LRR-repeat protein 4	NA	NA
Solyc06g054440.1.1	F-box/LRR-repeat protein 14	SSR	M
Solyc06g054480.1.1	Serine/threonine protein kinase-like	CAPS	M
Solyc06g054500.1.1	Peroxidase	NA	NA

Table 2 Continued.

Contig name	Description	Technique <sup>1</sup>	DNA polymorphic <sup>2</sup>
Solyc06g054630.1.1	Ethylene-responsive transcription factor	SSR	M
Solyc06g060060.1.1	NAD kinase	SSR	M
Solyc06g060260.1.1	Ascorbate peroxidase	SSR	P
Solyc06g062440.1.1	Disease resistance protein	CAPS	M
Solyc06g063360.1.1	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1	SSR	M
Solyc06g064680.1.1	Disease resistance protein RPP13 variant	SSR	M
Solyc06g064690.1.1	NBS-coding resistance gene protein	NA	NA
Solyc06g064700.1.1	Coiled-coil-containing protein	NA	NA
Solyc06g064710.1.1	NBS-LRR resistance protein-like protein	NA	NA
Solyc06g064720.1.1	Disease resistance protein RPP13 variant	SSR	M
Solyc06g064750.1.1	NBS-coding resistance gene analog	SSR	M
Solyc06g064760.1.1	Disease resistance protein RPP13 variant	SSR	M
Solyc06g064780.1.1	NBS-coding resistance gene protein	SSR	M
Solyc06g064790.1.1	NBS-LRR resistance protein-like protein	CAPS	M
Solyc06g065120.1.1	TIR-NBS-LRR resistance protein	CAPS	M
Solyc06g065140.1.1	Disease resistance protein	NA	NA
Solyc06g065150.1.1	Disease resistance protein	NA	NA
Solyc06g066370.1.1	WRKY transcription factor 1	SSR	M
Solyc06g068460.1.1	WRKY transcription factor 1	SSR	P
Solyc06g068510.1.1	Serine/threonine-protein kinase 3	SSR	M
Solyc06g068930.1.1	Jasmonate ZIM-domain protein 2	SSR	P
Solyc06g069290.1.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR1	NA	NA
Solyc06g069650.1.1	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1	SSR	P
Solyc06g071410.1.1	Protein kinase	SSR	M

<sup>1</sup> CAPS = cleaved amplified polymorphisms, SSR = simple sequence repeat, NA = not amplify

<sup>2</sup> M = monomorphic, P = polymorphic, NA = not amplify

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมาย ดีเอ็นเอกับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยว

จากการศึกษาความหลากหลายของอัลลีลยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหี่ยวบนโครโมโซมที่ 6 ในมะเขือเทศ 92 พันธุ์ โดยแบ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน 53 พันธุ์ และพันธุ์

อ่อนแอ 39 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence repeat (SSR) ภายในยีนต้านทาน 4 ตำแหน่ง และชนิด CAPS 1 ตำแหน่ง ผลการวิเคราะห์ขนาดอัลลีลด้วยโปรแกรม Photo Capt พบว่า ตำแหน่ง Solyc06g068930 มีความหลากหลายของอัลลีลมาก

ที่สุด คือ 4 อัลลีล รองลงมาคือ ตำแหน่ง Solyc06g069650 และ Solyc06g060260 มี 3 อัลลีล ขณะที่ ตำแหน่ง Solyc06g068460 และ Solyc06g051840 มีจำนวน อัลลีลน้อยที่สุด คือ 2 อัลลีล ดัง Table 3

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนต้านทาน โรคบนโครโมโซม 6 ด้วยวิธี association mapping โดยใช้โปรแกรม TASSEL และพิจารณาความสัมพันธ์ จาก P-value เป็นลำดับเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยตำแหน่ง สามารถตรวจพบความสัมพันธ์ ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคกับลักษณะ ต้านทานโรคเหี่ยวเฉาจำนวน 4 ยีน คือ Solyc06g069650 (LRR), Solyc06g060260 (Ascorbate peroxidase), Solyc06g068930 (Jasmonate) และ Solyc06g051840 (Ethylene responsive transcription factor) โดยมี

เพียง 1 ยีน คือ Solyc06g68460 (WRKY) ที่ไม่พบ ความสัมพันธ์ ดัง Table 4 อย่างไรก็ตาม การศึกษาใน ครั้งนี้ใช้การตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนมไทป์ด้วย เทคนิค SSR ที่ความผันแปรเกิดจากจำนวนลำดับเบส ซ้ำ และเทคนิค CAPS ที่เป็นผลจากการเกิดความผันแปร ของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบ insertion-deletion (IN-DEL) จึงทำให้ตรวจพบความสัมพันธ์ในระดับเล็ก น้อยถึงน้อยเท่านั้น ซึ่งหากใช้วิธีการตรวจสอบจีโนมไทป์ ที่มีความละเอียดสูงขึ้น ได้แก่ การวิเคราะห์ลำดับเบส และค้นหาความแตกต่างทางจีโนมไทป์ในระดับลำดับเบส จะทำให้สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม ได้ละเอียดขึ้น และมีโอกาสพบความสัมพันธ์ระหว่าง เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือยีนกับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยว เฉาในระดับสูงขึ้นได้

**Table 3** The allele size of each candidate gene in fifty-three resistance and forty-nine tomatoes in this study

Marker	Size (bp)	Resistance	Susceptible
Solyc06g068460	152	45	38
	140	7	1
	Missing data	1	0
Solyc06g069650	188	40	37
	186	9	2
	176	1	0
	188:186	3	0
Solyc06g060260	156	21	1
	146	29	36
	122	1	1
	156:146	1	0
	146:122	0	1
	Missing data	1	0

Table 3 Continued.

Marker	Size (bp)	Resistance	Susceptible
Solyc06g068930	161	0	1
	155	6	3
	152	44	33
	122	2	1
	155:152	1	0
	161:152	0	1
Solyc06g051840	290	26	39
	285	25	0
	Missing data	2	0

อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อลักษณะด้วยวิธี association mapping เนื่องจากยีนที่พบความสัมพันธ์เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อความต้านทานโรค โดย LRR มีบทบาทสำคัญต่อความต้านทานโรคในพืชหลายชนิด รวมทั้งมะเขือเทศ ซึ่งมีการศึกษาจีโนมมะเขือเทศที่แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างของ LRR มีความสำคัญต่อการแสดงความต้านทานโรค (Andolfo *et al.*, 2013) ส่วน ascorbate peroxidase เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค โดยมีการตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรค ซึ่งพบว่าบริเวณที่พืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลายนั้น ในส่วนรอบ ๆ ของเชื้อจะพบการตายของพืชโอบล้อมเชื้อไว้ ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ปฏิกริยานี้เป็นที่รู้จักกันว่า hypersensitive response การตอบสนอง

นี้จะจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อ โดยอาศัยการตายของเซลล์พืช (Morel and Dangl, 1997) ascorbate peroxidase เกี่ยวข้องกับการผลิต reactive oxygen species เช่น superoxide ( $O_2^-$ ) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) เป็นต้น ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อโรคได้โดยตรง และมีผลทำให้เซลล์พืชตายได้ (Noctor and Foyer, 1998; Smirnoff, 2000) แสดงให้เห็นว่า ascorbate peroxidase มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรค ขณะที่ jasmonate และ ethylene เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณที่สำคัญสำหรับขบวนการต้านทานโรคในพืช (Almagro *et al.*, 2009) และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR พบว่า salicylic acid และ ethylene มีบทบาทสำคัญต่อขบวนการต้านทานต่อเชื้อ *R. solanacearum* (Baichoo and Jaufeerally-Fakim, 2017)

**Table 4** Association mapping of candidate resistance genes for bacterial wilt resistance through 57 positional candidate loci

Marker	Isolate of <i>R. solanacearum</i>			
	CT1 <sup>1</sup>	S1 <sup>2</sup>	RS145 <sup>3</sup>	EWS1 <sup>4</sup>
Solyc06g68460	0.95 <sup>ns</sup>	0.24 <sup>ns</sup>	0.16	0.10 <sup>ns</sup>
Solyc06g69650	0.14 <sup>ns</sup>	0.60 <sup>ns</sup>	0.04*	0.01*
Solyc06g60260	0.01*	0.002**	0.02*	0.004**
Solyc06g68930	0.33 <sup>ns</sup>	0.72 <sup>ns</sup>	0.06 <sup>ns</sup>	0.008**
Solyc06g51840	0.01*	0.003**	0.14 <sup>ns</sup>	0.01**

<sup>1</sup> Relative area under disease progress curve (RAUDPC) of disease index evaluated with CT1 isolate at Kanchanaburi province

<sup>2</sup> Mean of disease scoring at 50 days after inoculation from field trial at Khonkaen province with S1 isolate

<sup>3</sup> RAUDPC of disease index at 13 days after inoculation evaluated with RS145 isolate

<sup>4</sup> RAUDPC of percent wilt plant at 28 days after inoculation evaluated with EWS1 isolate

\* P < 0.05, \*\* P = 0.001–0.009, ns = not significant

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นของการใช้วิธีวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอหรือยีนต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉาด้วยวิธี association mapping และพบว่าการใช้ตัวแทนของตำแหน่ง (Positional candidate) สามารถตรวจพบความสัมพันธ์ได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์แบบลิงค์เกจ ทั้งยังพบตัวแทนของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค (Functional candidate) ได้แก่ LRR, ascorbate peroxidase, jasmonate และ ethylene ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเฉา ซึ่งให้เห็นว่า การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะโดยวิธี association mapping เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการค้นหาตำแหน่งที่สัมพันธ์ต่อลักษณะ นอกเหนือจากการวิเคราะห์แบบลิงค์เกจได้อีกวิธีการหนึ่ง อย่างไรก็ตาม

ปัจจุบันมีความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสของทั้งจีโนมที่มีความสะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายที่ถูกลง และมีการพัฒนาโมเดลในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำมากขึ้น ได้แก่ mixed linear model (Zhang *et al.*, 2010) โดยใช้ทั้งค่า ประชากรย่อย (Q) และความสัมพันธ์ระหว่าง individual (K) ในการลดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ ดังนั้น การวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย mixed linear model ด้วยการใช้ข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับลำดับเบสของทั้งจีโนมในประชากรจะช่วยให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศต่อไป



## สรุป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะด้านทานโรคเหี่ยวเฉียดด้วยวิธี association mapping โดยตำแหน่ง (Positional candidate) พบความสัมพันธ์ในหลายตำแหน่ง โดยพบมากที่สุดบนโครโมโซม 6 และจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ TG48, TG118 และ CP18 ที่ถูกรายงานว่าเป็นตำแหน่งที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉียดด้วยวิธีลิงค์เกจเป็นตำแหน่งควบคุม (Control) ในการศึกษาครั้งนี้ ยังพบความสัมพันธ์เช่นเดียวกัน โดยพบตำแหน่งใหม่ที่สัมพันธ์ระดับปานกลางกับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉียด 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งบนโครโมโซม 1 ได้แก่ SSR134, SSR572, SSR117 และ SSR65 ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์ของยีนด้านทานโรค 4 ชนิด คือ LRR, ascorbate peroxidase, jasmonate และ ethylene กับความต้านทานโรคเหี่ยวเฉียดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี association mapping ด้วยเช่นกัน ซึ่งให้เห็นว่า

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อลักษณะโดยวิธี association mapping เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการค้นหาตำแหน่งที่สัมพันธ์ต่อลักษณะ และมีข้อดีในการตรวจสอบหาอัลลีลที่สัมพันธ์ต่อลักษณะที่ต้องการศึกษาได้พร้อมกัน

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับการสนับสนุนสถานที่เพาะปลูกกล้าและเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา ขอขอบคุณ บริษัท เจียใต้ จำกัด บริษัท ชินเจนทาซีดี จำกัด และ บริษัท อีสท์ เวสต์ ซีดี จำกัด สำหรับสถานที่ในการปลูกและทดสอบความต้านทานโรค

## เอกสารอ้างอิง

- Acosta, J.C. 1963. Genetic Analysis of Bacterial Wilt Resistance and Certain Other Characters in a Tomato Cross, *Lycopersicon esculentum* Mill. × *L. pimpinellifolium* Mill. PhD Thesis, University of Hawaii, Hawaii.
- Acosta, J.C., J.C Gilbert and V.L. Quinon. 1964. Heritability of bacterial wilt resistance in tomato. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 84: 455–462.
- Almagro, L., L.V. Gomez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barcelo and M.A. Pedreno. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. J. Exp. Bot. 60(2): 377–390.
- Anand, N., A.T. Sadashiva, S.K. Tikoo, Ramkishun and K.M. Reddy. 1993. Resistance to bacterial wilt in tomato: gene dosage effects, pp. 142–148. In G.L. Hartman and A.C. Hayward, eds. Bacterial Wilt. ACIAR Proc. No. 45. Brisbane, Australia.
- Andolfo, G., W. Sanseverino, S. Rombauts, J. Van der Peer, J.M. Bradeen, D. Carputo, L. Frusciante and M.R. Ercolano. 2013. Overview of tomato (*Solanum lycopersicum*) candidate pathogen recognition genes reveals important *Solanum* R locus dynamics. New Phytol. 197: 223–237.

- Baichoo, Z. and Y. Jaufeerally–Fakim. 2017. *Ralstonia solanacearum* upregulates marker genes of the salicylic acid and ethylene signaling pathways but not those of the jasmonic acid pathway in leaflets of *Solanum* lines during early stage of infection. *Eur. J. Plant Pathol.* 147: 615–625.
- Bradbury, P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss and E.S. Buckler. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23(19): 2633–2635.
- Buckler IV, E.S. and J.M. Thornsberry. 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 107–111.
- Butsarakul, S., S. Pisil, P. Siritorn and K. Lertrat. 1997. Resolution of bacterial wilt resistant–tomato varieties in the international set of resistance in tomato to bacterial wilt under the northeast condition. Report of Khon Kaen University, Khon Kaen. (in Thai)
- Carmeille, A., C. Caranta, J. Dintinger, P. Prior, J. Luisetti and P. Besse. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3–phylo type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113(1): 110–121.
- Danesh, D., S. Aarons, G.E. McGill and N.D. Young. 1994. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 7(4): 464–471.
- Dara–Carlos, L. 1998. Mapping of Bacterial Wilt Resistance Genes Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) using AFLP Markers. MS Thesis, University of the Philippines Los Banos, Los Banos.
- Flint–Garcia, S.A., J.M. Thornsberry and E.S. Buckler IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 357–374.
- Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13(3): 207–209.
- Fulton, T.M., R. Van der Hoeven, N.T. Eannetta and S.D. Tanksley. 2002. Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell* 14: 1457–1467.
- Garris, A.J., S.R. McCouch and S. Kresovich. 2003. Population structure and its effects on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the *xa5* locus of rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 165: 759–769.
- Gebhardt, C., A. Ballvora, B. Walkemeier, P. Oberhagemann and K. Schuler. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker–trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Mol. Breed.* 13: 93–102.

- Hai, T.T.H., E. Esch and J.F. Wang. 2008. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in wild tomato germplasm. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 471–479.
- Hanson, P.M., J.F. Wang, O. Licardo, Hanudin, S.Y. Mah, G.L. Harthman, Y.C. Lin and J.T. Chen. 1996. Variable reaction of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in southeast Asia. *Hort. Sci.* 31: 143–146.
- Hanson, P.M., O. Licardo, Hanudin, J.F. Wang and J.T. Chen. 1998. Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. *Plant Dis.* 82: 74–78.
- Hayward, A.C. 1991. Biological and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65–87.
- Ivancic, V.C., A. Hackett, E. Nevo, R. Keith, W.T.B. Thomas and B.P. Foster. 2002. Analysis of simple sequence repeat (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. *Plant Mol. Biol.* 48: 511–527.
- Kelman, A. 1953. *The Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum*. North Carolina Agricultural Experiment Station, USA. 194 pp.
- Kruger, S.A., J.A. Able, K.J. Chalmers and P. Langridge. 2004. Linkage disequilibrium analysis of hexaploid wheat. *In Proc. the Plant and Animal Genomes XII Conference, 10–14 January 2004.* p. 321.
- Marker to sequence. Available Source: <https://www.eusol.wur.nl/marker2seq/>, May 22, 2013.
- Mazzucato, A., R. Papa, E. Bitocchi, P. Mosconi, L. Nanni, V. Negri, M.E. Picarella, F. Siligato, G.P. Soressi, B. Tiranti and F. Veronesi. 2008. Genetic diversity, structure and marker–trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theor. Appl. Genet.* 116: 657–669.
- Morel, J.B. and J.L. Dangl. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4: 671–683.
- Noctor, G. and C.H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249–279.
- Nordborg, M., J.O. Borevitz, J. Bergelson, C.C. Berry, J. Chory, J. Hagenblad, M. Kreitman, J.N. Maloof, T. Noyes, P. Oefner, E.A. Stahl and D. Weigel. 2002. The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 30: 190–193.
- Palaisa, K., M. Morgante, M. Williams and A. Rafalski. 2003. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant Cell* 15: 1795–1806.

- Palaisa, K., M. Morgante, S. Tingey and A. Rafalski. 2004. Long-range patterns of diversity and linkage disequilibrium surrounding the maize *Y1* gene are indicative of an asymmetric selective sweep. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(26): 9885–9890.
- Ranc, N., S. Muñoz, J. Xu, M.C. Le Paslier, A. Chauveau, R. Bounon, S. Rolland, J.P. Bouchet, D. Brunel and M. Causse. 2012. Genome-wide association mapping in tomato (*Solanum lycopersicum*) is possible using genome admixture of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*. *G3 (Bethesda)* 2: 853–864.
- Remington, D.L., J.M. Thornsberry, Y. Matsuoka, L.M. Wilson, S.R. Whitt, J. Doebley, S. Kresovich, M.M. Goodman and E.S. Buckler IV. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 11479–11484.
- Ruggieri, V., G. Francese, A. Sacco, A. D’Alessandro, M.M. Rigano, M. Parisi, M. Milone, G. Mennella and A. Barone. 2014. An association mapping approach to identify favorable alleles for tomato fruit quality breeding. *BMC Plant Biol.* 14: 337.
- Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 229–235.
- Sol Genomics Network. Available Source: <https://solgenomics.net/>, May 12, 2013.
- Srisawad, N. 2012. Identifying of Bacterial Wilt Resistance Haplotype in Tomato using Association Analysis. PhD Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Srisawad, N., C. Leksomboon and J. Chunwongse. 2012. Evaluation of bacterial wilt resistance level in international resistant tomato lines using some isolates of *Ralstonia solanacearum* from growing areas in Thailand. *Agricultural Sci. J.* 43(2–3): 325–337. (in Thai)
- Thaveechai, N., W. Kositratana and C. Leksomboon. 1992. Bacterial wilt of tomato in Thailand. The AVNET Phase-I Final Workshop and AVNET Phase-II Joint Planning Meeting. Lembang, Indonesia. p. 24.
- Thoquet, P., J. Oliver, C. Sperisen, P. Rogowsky, H. Laterrot and N. Grimsley. 1996a. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar H7996. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 9(9): 826–836.
- Thoquet, P., J. Oliver, C. Sperisen, P. Rogowsky, P. Prior, G. Anais, B. Mangin, B. Bazin, R. Nazer and N. Grimsley. 1996b. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 9(9): 837–842.
- Thornsberry, J.M., M.M. Goodman, J. Doebley, S. Kresovich, D. Nielsen and E.S. Buckler IV. 2001. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat. Genet.* 28: 286–289.

- Vudhivanich, S. and S. Soontarasing. 1996. Screening for bacterial wilt resistance of tomato by scalpel leaf-clip method, pp. 183–192. *In Proc. the 34<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference, 30 January – 1 February 1996.* (in Thai)
- Wang, J.F., J. Olivier, P. Thoquet, B. Mangin, L. Sauviac and N.H. Grimsley. 2000. Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 7: 464–471.
- Wang, J.F., P. Hanson and J.A. Barnes. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato, pp 269–275. *In P. Prior, C. Allen and J. Elphinstone, eds. Bacterial Wilt Disease.* Springer, Berlin, Heidelberg.
- Winstead, N.N. and A. Kelman. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42: 628–634.
- Wu, F.N., L.A. Mueller, D. Crouzillat, V. Petiard and S.D. Tanksley. 2006. Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: a test case in the euasterid plant clade. *Genetics* 174(3): 1407–1420.
- Xu, J., N. Ranc, S. Muños, S. Rolland, J. Bouchet, N. Desplat, M.C. Le Paslier, Y. Liang, D. Brunel and M. Causse. 2013. Phenotypic diversity and association mapping for fruit quality traits in cultivated tomato and related species. *Theor. Appl. Genet.* 126: 567–581.
- You, F.M., N. Huo, Y.Q. Gu, M.C. Luo, Y. Ma, D. Hane, G.R. Lazo, J. Dvorak and O.D. Anderson. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics* 9: 253.
- Zhang, J., J. Zhao, Y. Liang and Z. Zou. 2015a. Genome-wide association-mapping for fruit quality traits in tomato. *Euphytica* 207: 439–451.
- Zhang, J., J. Zhao, Y. Xu, J. Liang, P. Chang, F. Yan, M. Li, Y. Liang and Z. Zou. 2015b. Genome-wide association mapping for tomato volatiles positively contributing to tomato flavor. *Front. Plant Sci.* 6: 1042.
- Zhang, Z., E. Ersoz, C.Q. Lai, R.J. Todhunter, H.K. Tiwari, M.A. Gore, P.J. Bradbury, J. Yu, D.K. Arnett, J.M. Ordovas and E.S. Buckler. 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42: 355–360.