ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยเทคนิค AFLP

GENETIC DIVERSITY OF DOWNY MILDEW RESISTANT CUCUMBER USING AFLP TECHNIQUE

ณัฐวรรณ ทองทศ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2550

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยเทคนิค AFLP

GENETIC DIVERSITY OF DOWNY MILDEW RESISTANT CUCUMBER USING AFLP TECHNIQUE

ณัฐวรรณ ทองทศ

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2550

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยเทคนิค AFLP

ณัฐวรรณ ทองทศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
2550

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พนม วิญญายอง)

.....กรรมการ
(อาจารย์สุมฤดี อ้นโต)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์สมฤดี อ้นโต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ อาจารย์ ดร.พนม วิญญายอง รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำปรึกษา รวมทั้งตรวจแก้ไขงานจนการศึกษาวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์จานุลักษณ์ ขนบดี จากสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา และ กระทรวงเกษตรของประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลในการศึกษา คำแนะนำ และอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้งศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนทั้งทางด้านการศึกษาและการวิจัยในวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณแม่สิริพร ทองทศ และสมาชิกครอบครัวของผู้เขียน สำหรับกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ ความสนับสนุน และความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่น่ารักทุกคนซึ่งมีส่วนช่วยในการศึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลของการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยที่เกี่ยวข้องและผู้ที่สนใจทั่วไป หากมีสิ่งผิดพลาดหรือข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนขอน้อมรับและขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ณัฐวรรณ ทองทศ

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยเทคนิค AFLP

ชื่อผู้เขียน นางสาวณัฐวรรณ ทองทศ

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.พนม วิญญายอง ประธานกรรมการ
อาจารย์ สมฤดี อ้นโต กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus*) ที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างทั้ง 47 สายพันธุ์ (ต้านทานโรคราน้ำค้างในระดับสูง 15 สายพันธุ์ ต้านทานในระดับปานกลาง 20 สายพันธุ์ และต้านทานในระดับต่ำ 12 สายพันธุ์) โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP) พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ มีไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แตงกวาได้ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 912 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 575 แถบ เมื่อนำมาคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างกัน (percentage of polymorphic bands) จะมีค่าเท่ากับ 63.05 เปอร์เซ็นต์ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเหมือนและความแตกต่างโดยใช้โปรแกรม NTSYS – pc รุ่น 2.01e[1] โดยใช้สูตรของ Nei และ Li[2] คำนวณหาดัชนีความเหมือน (similarity index) และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) ตามวิธีคำนวณของ Sneath และ Sokal[3] และแสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree ค่าดัชนีความเหมือนที่คำนวณได้ของแตงกวาทั้ง 47 ตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.785 – 0.975 เมื่อนำมาจัดกลุ่มในรูปแบบของ phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยทั้ง 4 กลุ่มมีความสัมพันธ์กันที่ค่าสัมประสิทธิความเหมือนเท่ากับ 0.82 และพบว่าตัวอย่างแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ในระดับสูงกระจายตัวอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 4 ซึ่งกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ในระดับสูงทั้งหมด 7 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูงทั้งหมด 7 ตัวอย่างเช่นกัน

คำสำคัญ : แตงกวา / โรคราน้ำค้าง / *Cucumis sativus* / AFLP

Thesis Title Genetic diversity of downy mildew resistant cucumber by using AFLP technique

Author Miss Nattawan Thongthod

Degree Master of Science (Biological Sciences)

Supervisory Committee Dr. Panom Winyayong Chairperson
Lecturer Somrudee Onto Member

ABSTRACT

The genetic diversity of 47 downy mildew resistant cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars was determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. To perform the AFLP analysis, 64 combinations of primers were used and the results were interpreted based on total and polymorphic scores. For *Cucumis sativus*, the total of 912 AFLP bands were detected using 12 combinations of primers, which were 575 polymorphic bands (~63.05%). The Genetic diversity estimated by NTSYS – pc version 2.01e[1] analysis based on Nei and Li's[2] similarity coefficients were calculated and a phylogenetic tree was then constructed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) analysis to trace their phylogenetic relationship. According to the results, these *C. sativus* plants were highly polymorphic and can be divided into 4 clusters, which were 3 clusters of downy mildew resistant cucumber (cluster 1, 2 and 4). The similarity values in the range of 0.785 – 0.975. The background genetic information would be useful for downy mildew resistant cucumber breeding programme.

Keyword: cucumber / downy mildew / *Cucumis vativus* / AFLP

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ค**
บทคัดย่อภาษาไทย	**ง**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ฉ**
สารบัญตาราง	**ญ**
สารบัญภาพ	**ฎ**
บทที่	
1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	**4**
2.1 แตงกวา	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.2 ประเภทของแตงกวา	8
2.2 โรคราน้ำค้าง	9
2.3 การปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรค	11
2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรม	12
2.4.1 วิธีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	13
2.5 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	15
2.5.1 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน	15
2.5.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2.6 การตรวจสอบสายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิค AFLP	19
2.6.1 หลักการของ AFLP	22
2.6.2 ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิค AFLP	23
2.6.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP	24
3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	**29**
3.1 เมล็ดพันธุ์แตงกวาและการเพาะปลูก	29
3.2 การสกัดดีเอ็นเอ	31
3.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ	33
3.3.1 วิธีการดูดกลืนแสง	33
3.3.2 วิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์	33
3.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค AFLP	34
3.4.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter	34
3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้น pre-selective amplification	36
3.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้น selective amplification	37
3.5 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel	39
3.5.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล	39
3.5.2 การเตรียม polyacrylamide gel เข้มข้น 6%	39
3.5.3 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส	40
3.5.4 การย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท	41
3.6 การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์	41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลและอภิปรายผลของการศึกษา	**42**
4.1 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตงกวา	42
4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e	56
5 สรุปผลการทดลอง	**62**
เอกสารอ้างอิง	**64**
ภาคผนวก	**73**
ภาคผนวก ก	74
ภาคผนวก ข	81
ภาคผนวก ค	87
ประวัติผู้เขียน	**94**

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

2.1 การเปรียบเทียบเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ 28

3.1 สายพันธุ์และแหล่งที่มาของแตงกวาจำนวน 47 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง 29

3.2 ลำดับเบสของ Oligomer ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาทั้ง 47 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค AFLP 35

3.3 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด 36

3.4 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter 36

3.5 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา preselective amplification 37

3.6 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา selective amplification 38

3.7 ปริมาณสารที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกระจกขนาด 35 x 45 เซนติเมตร 40

4.1 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบและไพรเมอร์ที่คัดเลือกสำหรับแตงกวา 43

4.2 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของแตงกวา โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี 43

4.3 ค่า Similarity Index ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือนกันของแถบดีเอ็นของแตงกวา 60

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	อนุกรมวิธานของแตงกวา	5
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงกวา	7
2.2	สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pseudoperonospora cubensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	10
2.3	ลักษณะของใบแตงกวาที่ติดโรคราน้ำค้าง	11
2.4	ส่วนประกอบของ AFLP ไพรเมอร์	22
2.5	การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์หนึ่งคู่	27
4.1	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACT/M-CAG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	44
4.2	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AAG/M-CAA หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	45
4.3	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACC/M-CAT หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	46
4.4	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGG/M-CAG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	47
4.5	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTT หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	48
4.6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AAG/M-CAC หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	49
4.7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACG/M-CAG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	50
4.8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGG/M-CAC หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGC/M-CAT หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder 52
4.10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGC/M-CAT หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder 53
4.11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder 54
4.12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGG/M-CAA หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 base pair ladder 55
4.13 การจัดกลุ่มของแตงกวาในลักษณะ phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 e 61

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

แตงกวา (*Cucumis sativus*) เป็นผักตระกูลแตงที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายทั่วโลกและสามารถปลูกได้ในทุกภาคและตลอดปีของประเทศไทย มีอายุตั้งแต่ช่วงปลูกถึงช่วงเก็บเกี่ยวผลสั้นใช้เวลาเพียง 35 – 45 วัน เมื่อเปรียบเทียบรายได้จากการปลูกแตงกวากับพืชอื่นๆ พบว่าแตงกวาเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกรในช่วงเวลาสั้น พื้นที่การปลูกแตงกวาทั่วโลกมีประมาณ 2.4 ล้านเฮกเตอร์ (อันดับที่ 5 ของพื้นที่ปลูกผักทั่วโลก) ในทวีปเอเชียมีประมาณ 1.9 ล้านเฮกเตอร์ (อันดับที่ 5 ของพื้นที่ปลูกผักในเอเชีย) ในประเทศจีนมีประมาณ 1.5 ล้านเฮกเตอร์ และในประเทศไทยมีประมาณ 28,000 เฮกเตอร์[4] โดยจะปลูกกระจายทั่วประเทศ สำหรับพื้นที่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ในการผลิตแตงกวาคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่การผลิตแตงกวาทั้งประเทศ[5] การปลูกแตงกวานอกจากต้องการผลสดเพื่อใช้ในการบริโภคและการแปรรูปทางอุตสาหกรรม ยังนิยมปลูกเพื่อใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ ความต้องการใช้เมล็ดพันธุ์แตงกวาในประเทศในแต่ละปีมีประมาณ 26.4 – 37.7 ตัน และมีอัตราการใช้เมล็ดเท่ากับ 350 – 500 กรัมต่อไร่[6] จากข้อมูลของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึงปี พ.ศ. 2549 พบว่า ประเทศไทยมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมโดยรวมแล้วสูงขึ้นเป็นลำดับ จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2549 ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ผักควบคุม จำนวน 12,510,860.28 กิโลกรัม มีมูลค่า 1,723,765,011.66 บาท ซึ่งเป็นเมล็ดพันธุ์แตงกวาจำนวน 58,663.38 กิโลกรัม มีมูลค่า 171,115,424.96 บาท คิดได้เป็นร้อยละ 9.9 ของมูลค่าการส่งออกของเมล็ดพันธุ์ควบคุม[7] จะเห็นได้ว่าถึงแม้จะมีปริมาณน้อยแต่มีมูลค่าต่อน้ำหนักสูง

แม้ว่าแตงกวาเป็นพืชผักที่สามารถเพาะปลูกได้ตลอดปี แต่เมื่อปลูกในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว มักพบปัญหาการเข้าทำลาย ของโรคราน้ำค้าง (downy mildew) หรือที่เกษตรกรเรียกว่าโรคใบลาย เกิดจากเชื้อราชื่อ *Pseudoperonospora cubensis* ซึ่งถือได้ว่าเป็นโรคทางใบที่สำคัญ

สำหรับพืชในเขตร้อนของโลก[8] ในกรณีที่ระบาดรุนแรงจะทำให้ผลผลิตแตงกวามีปริมาณลดลงมากกว่าร้อยละ 50[9] เชื้อดังกล่าวทำให้เกิดปัญหาและอุปสรรคในการผลิตแตงกวาสำหรับรับประทานผลสด แตงกวาสำหรับดองและการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวา นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์แตงกวาสำหรับบริโภคผลผลิตสดในประเทศไทยยังไม่สามารถต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ ดังนั้นการพัฒนาสายพันธุ์แตงกวาที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตสูงในเขตร้อนชื้น ตลอดจนสามารถต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง จะสามารถทำให้ประเทศไทยเพิ่มศักยภาพในการเพาะปลูกแตงกวา รวมถึงเป็นการเพิ่มมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวาได้มากยิ่งขึ้นอีกด้วย

ในปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในป้องกันและการกำจัดโรคราน้ำค้าง ซึ่งมีอันตรายต่อตัวเกษตรกรเองและผู้บริโภค อีกทั้งยังส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมด้วยเช่นกัน ดังนั้นวิธีการที่ดีที่สุดในการป้องกันและกำจัดโรคราน้ำค้างในปัจจุบันคือ การใช้แตงกวาสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ซึ่งการสร้างสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรค รวมถึงข้อมูลทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างด้วยเช่นกัน เนื่องจากแตงกวาเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำทำให้มีข้อจำกัดเมื่อนำสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาเป็นอย่างดีแล้วมารวมกันเข้าเป็นประชากรใหม่ ทำให้มีความยุ่งยากในการเพิ่มผลผลิต[10] ดังนั้นกระบวนการในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคและพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกร พ่อค้ารวมถึงผู้บริโภคนั้นจะต้องใช้เงินลงทุนสูง และใช้ระยะเวลาประมาณ 5 – 8 ปีในการพัฒนาต่อพันธุ์[11] ด้วยเหตุนี้การนำเทคโนโลยีใหม่มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์พืชจึงมีความสำคัญมากยิ่งขึ้น โดยคาดหวังว่าจะมีบทบาทในการพัฒนาศักยภาพงานค้นคว้าและวิจัยพันธุ์พืชใหม่นอกจากศักยภาพในด้านนี้แล้ว อาจจะช่วยลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อีกด้วย สำหรับการทดลองในครั้งนี้ได้ใช้วิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการใช้ศึกษาความหลาหลายทางพันธุกรรมพืช การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีอยู่ด้วยกันหลายเทคนิค เช่น เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP), เทคนิค random amplified polymoephic DNA (RAPD), เทคนิค simple sequence repeat (SSR) และเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เทคนิค AFLP ใช้ในการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR; polymerase chain reaction) โดยมีข้อดี

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยอาศัยเทคนิค AFLP

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างที่ได้รับเมล็ดจากกระทรวงเกษตรของประเทศสหรัฐอเมริกา (USDA) และจากสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา (LARTC) โดยใช้เทคนิค AFLP เพื่อนำผลการศึกษาที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 แตงกวา (Cucumber : *Cucumis sativus*)

แตงกวาเป็นพืชชนิดหนึ่งที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เชื่อกันว่าแตงกวามีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย หรือแถบเทือกเขาหิมาลัยในประเทศเนปาล จากนั้นชาวกรีกและโรมันได้นำแตงกวาจากประเทศอินเดียเข้าไปเผยแพร่ในทวีปยุโรป ทำให้มีความนิยมปลูกแตงกวากันอย่างแพร่หลายในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนเมื่อก่อน 2,000 ปี โดยนำผ่านเอเชียกลางและตอนเหนือของทวีปแอฟริกา ในช่วงศตวรรษที่ 6 แตงกวาได้เผยแพร่เข้าสู่ประเทศจีน โดยสันนิษฐานว่าได้นำผ่านจาก 2 ทาง คือ เส้นทางสายไหม โดยผ่านประเทศในเอเชียตะวันออกไปภาคเหนือของประเทศจีน ส่วนอีกเส้นทางหนึ่งคือผ่านประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ พม่า ไทย ลาว ไปสู่ทางภาคใต้ของจีน และในศตวรรษที่ 9 – 14 ได้เผยแพร่เข้าสู่ทวีปยุโรป ส่วนในช่วงศตวรรษที่ 15 – 16 ได้นำไปปลูกในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาเหนือ และได้มีการพัฒนาพันธุ์แตงกวาเป็นอย่างมากในประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงต้นศตวรรษที่ 19 จนได้รับสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการปลูกในโรงเรือนได้ [5, 12]

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

แตงกวามีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 14$ [13, 14] อยู่ในกลุ่มไม้เนื้ออ่อน อวบน้ำ เป็นพืชที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยอาศัยลมและแมลง เป็นพืชฤดูเดียว เถาเลื้อยหรือขึ้นค้าง เช่นเดียวกับแตงโม ฟักทอง บวบ มะระ และน้ำเต้า ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae หรือ Gourd ซึ่งแบ่งออกเป็น 96 สกุล, 750 ชนิดและ 5 วงศ์ย่อย (subfamily) คือ Fevilleae, Melothriae, Cucurbiteae, Sicyodeae และ Cyclanthereae แต่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจคือ Cucurbitaceae [6, 15] ซึ่งการจัดจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของแตงกวาเป็นดังนี้ (ภาพที่ 2.1)

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Cucurbitales

Family: Cucurbitaceae

Genus: ***Cucumis***

Species: ***Cucumis sativus***

ภาพที่ 2.1 อนุกรมวิธานของแตงกวา

ระบบราก ระบบรากของแตงกวาเป็นระบบรากแก้ว (tap root system) และมีรากแขนง (rootlet) จำนวนมาก รากแก้วจะเจริญในแนวดิ่งอย่างรวดเร็ว ยิ่งในสภาพที่เหมาะสมสามารถเจริญได้ถึง 3.8 เซนติเมตรต่อวัน และสามารถหยั่งรากได้ลึกถึง 1 เมตร ส่วนรากแขนงเจริญในแนวนอนรอบๆ ต้น ในช่วงแรกต่อจากนั้นจะเจริญไปกับเถา ซึ่งสามารถพบรากแขนงอยู่อย่างหนาแน่นในระดับความลึก 20 เซนตริเมตรจากพื้นดิน รากแขนงบางรากเมื่อเจริญในแนวนอนสามารถยาวได้ถึง 30 – 60 เซนติเมตรและเจริญต่อในแนวดิ่งได้ ซึ่งอาจเจริญได้ลึกกว่ารากแก้วและสามารถทดแทนรากแก้วได้เมื่อต้นแก่[16, 17]

ลำต้น การเจริญของลำต้นในช่วงแรกจะตั้งตรง แต่หลังจากเจริญเป็นเถาจะยาว 1.2 – 16 เมตรซึ่งสามารถเลื้อยเกาะตามโครงหรือไม้ค้างได้ เมื่อลำต้นมีการแตกใบจากลำต้นประมาณ 2 – 3 ใบแล้วจะเริ่มมีการแตกกิ่งแขนงและมือเกาะ[18] (ภาพที่ 2.2) การแตกกิ่งแขนงนั้นจะเป็นแบบ sympodial type (การแตกกอ) โดยกิ่งแขนงจะยาวประมาณ 0.6 – 1.5 เมตร และแต่ละข้อจะมีตาข้างซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญสำหรับกิ่งและผลใหม่ อยู่ด้านตรงข้ามกับใบ ลำต้นมีผิวขรุขระและมีขนเล็กๆ ขึ้นปกคลุมทั่วลำต้น เมื่อผ่าหรือตัดลำต้นตามขวางจะได้รูปสี่เหลี่ยม เมื่อลำต้นแก่แล้วไส้กลางอาจจะกลวง

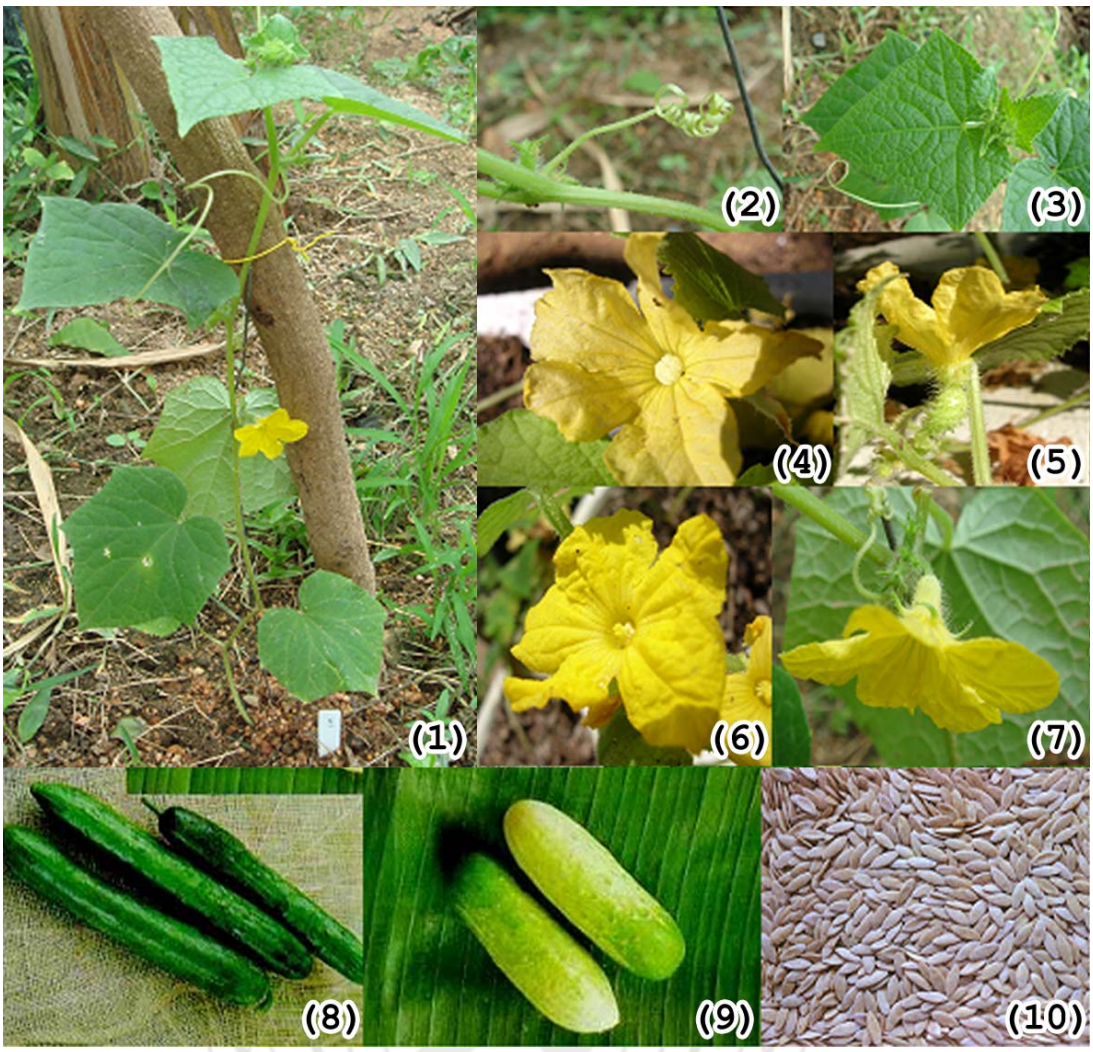
ใบ ใบของแตงกวามีขนหยาบปกคลุมทั่วใบ มีมุมใบประมาณ 3 – 5 มุม ปลายใบแหลม ใบมีขนาดใหญ่รูปเท่าฝ่ามือ ขอบใบหยักเว้า (palmate) มีเส้นใบ 5 – 7 เส้น (ภาพที่ 2.2) ส่วนของก้านใบยาว 5 – 15 เซนติเมตร[18] และมีการเจริญของมือเกาะจากด้านล่างก้านใบเพื่อใช้ในการยึดเกาะ

ดอก ดอกของแตงกวาส่วนใหญ่ดอกตัวผู้และตัวเมียจะแยกกัน ดอกสมบูรณ์เพศจะพบได้ยากมากในแตงกวา เดิมทีแตงกวาเป็นพืชที่มีลักษณะต้นแบบที่มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกัน แต่อยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious plant) แต่หลังจากได้มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์แตงกวามาเป็นเวลานาน ทำให้แตงกวาในปัจจุบันมีลักษณะต้นทั้งแบบที่มีเฉพาะดอกตัวเมีย (gynoecious plant) และแบบที่มีเฉพาะดอกตัวผู้ (androecious plant) ด้วยเช่นกัน[19]

ดอกตัวเมียส่วนใหญ่จะเจริญเป็นดอกเดี่ยว บนข้อของเถาใหญ่และเถาแขนง มีเกสรตัวผู้ที่ไม่สมบูรณ์ กลีบดอกจำนวนห้ากลีบสีเหลือง ก้านเกสรตัวเมียอวบสั้น มียอดเกสรแบ่งเป็นสามส่วน รังไข่ปรากฏชัดเจน (ภาพที่ 2.2) ในรังไข่มีช่องว่างสามช่อง ต่อมน้ำหวาน (nectary) มีลักษณะเป็นวงแหวนอยู่รอบฐานก้านเกสรตัวเมีย[20]

ดอกตัวผู้สังเกตได้ง่าย เนื่องจากมีก้านดอกเรียวเล็กไม่มีรังไข่ เจริญที่ข้อเป็นกลุ่ม ๆ ละ 3 – 5 ดอก แต่ละดอกมีกลีบเลี้ยงสีเขียวจำนวนห้ากลีบ กลีบดอกมีสีเหลืองปลายกลีบดอกแยกออกเป็นแฉก โคนกลีบดอกเป็นฐาน (ภาพที่ 2.2) มีเกสรตัวผู้ 3 ก้าน โดยสองก้านมีอับเรณูสองอันและอีกก้านหนึ่งมีหนึ่งอัน[20]

ผลและเมล็ด ลักษณะผลที่ยังไม่สุกหรือที่นิยมนำไปรับประทาน ส่วนใหญ่จะมีเปลือกสีเขียวหรือเขียวแกมขาว ยกเว้นในบางสายพันธุ์ที่ผลจะมีสีขาวหรือสีเหลือง เนื้อจะมีสีค่อนข้างขาวอมเขียวอ่อนๆผลของแตงกวาจะมีลักษณะยาวรี (ภาพที่ 2.2) ถ้าตัดตามขวางจะมีลักษณะค่อนข้างกลม ตอนยังเป็นผลอ่อนจะมีปุ่มเล็กๆ และหนามขึ้นอยู่บริเวณผิวของผล สีของหนามจะมีความสัมพันธ์กับสีของผลตอนสุกหรือแก่เต็มที่และความแตกลายของผิวเปลือก ผลที่มีหนามสีขาวจะมีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเหลืองเวลาผลแก่เต็มที่และผิวผลค่อนข้างไม่แตกลาย ผลที่มีหนามสีดำเมื่อแก่เต็มที่จะมีสีส้มแก่จนถึงสีน้ำตาลแก่ และมักจะมีลายตาข่ายขึ้นที่ผิวของผล[19] แตงกวาแต่ละผลจะมีเมล็ดแบน รูปรี สีขาวถึงเหลืองอ่อน (ภาพที่ 2.2) มีเมล็ดประมาณ 200 – 500 เมล็ดต่อผล[6, 18]



ภาพที่ 2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงกวา

(1) ลักษณะต้น

(2) ลักษณะมือเกาะ

(3) ลักษณะใบ

(4), (5) ลักษณะดอกตัวเมีย

(6), (7) ลักษณะดอกตัวผู้

(8), (9) ลักษณะผล

(10) ลักษณะเมล็ด

2.1.2 ประเภทของแตงกวา[6]

1. พันธุ์สำหรับรับประทานผลสด เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อบางและมีไส้ใหญ่ เปลือกเป็นสีเขียวอ่อน ผลมีน้ำมากเป็นพันธุ์ที่มีขนาดผลทั้งใหญ่และเล็ก เมื่อผลยังอ่อนอยู่จะมีหนามทั่วทั้งผล แต่เมื่อโตเต็มที่แล้วหนามจะหลุดออก พันธุ์แตงกวาสำหรับรับประทานผลสดนี้ไม่เหมาะสำหรับการนำไปดอง นอกจากนี้แตงกวาพันธุ์นี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มได้ตามขนาดของผลได้ดังนี้

1) แตงกวาผลยาว (long cucumber) รู้จักกันในชื่อของแตงร้าน จะมีความยาวผลอย่างน้อย 15 เซนติเมตร และมีความกว้างผลมากกว่า 2.5 เซนติเมตร ส่วนใหญ่จะมีเนื้อหนาและมีไส้แคบ ในกรณีที่เป็นพันธุ์ไทยนั้นจะมีผลสีเขียวแก่ตรงส่วนใกล้ขั้วของผลประมาณ 1/3 ของผลทั้งหมด ส่วนผลที่เหลือนั้นจะมีจุดประสีเขียวอ่อนหรือสีขาว และจะมีเส้นสีขาวเป็นแถบเล็กๆ ตามยาวตลอดทั้งผล ส่วนพันธุ์ของต่างประเทศนั้น จะมีสีเขียวเข้มสม่ำเสมอตลอดทั้งผล

2) แตงกวาผลสั้น (short cucumber) หรือที่รู้จักกันในชื่อของแตงกวา มีความยาวผลอยู่ที่ 8 – 12 เซนติเมตร และมีความกว้างผลมากกว่า 2.5 เซนติเมตร ส่วนใหญ่จะมีเนื้อบางและไส้กว้าง

2. พันธุ์แตงกวาที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อหนา ไส้เล็ก บางพันธุ์ก็ไม่มีไส้เลย จะมีเปลือกสีเขียวเข้ม เมื่อนำไปดองจะคงรูปร่างได้ดี ไม่ค่อยเหี่ยวย่น แตงกวาพันธุ์นี้มักจะเป็นลูกผสม ลักษณะผลจะมีรูปร่างผลยาว ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตามขนาดของผลได้ดังนี้

1) แตงกวาผลยาว (long cucumber) แตงกวาชนิดนี้นิยมใช้ทำแตงดองของญี่ปุ่นและจีน ซึ่งจะมีความยาวผลประมาณ 20 – 30 เซนติเมตร และมีความกว้างประมาณ 2 – 3 เซนติเมตร มีเนื้อหนาและมีไส้แคบ เปลือกมีสีเขียวเข้มตลอดความยาวของผล มักใช้ดองโดยมีการใช้น้ำปรุงรสด้วยส่วนผสมของซีอิ๊ว

2) แตงกวาผลสั้น (short cucumber) นิยมใช้ทำแตงดองของสหรัฐอเมริกาและยุโรป มีความยาวผลประมาณ 8 – 12 เซนติเมตร และมีความกว้างประมาณ 1 – 5 เซนติเมตร โดยทั่วไปจะมีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (L/D ratio) มีค่าอยู่ระหว่าง 2.8 – 3.1 มีเนื้อหนาและแน่น มีไส้แคบ เปลือกมีสีเขียวเข้มตลอดผล มักใช้ดองทั้งผล โดยผ่าตามยาวและหั่นเป็นชิ้นๆ ตามความกว้างของผลมักดองโดยมีการใช้น้ำปรุงรสด้วยส่วนผสมของซีอิ๊ว

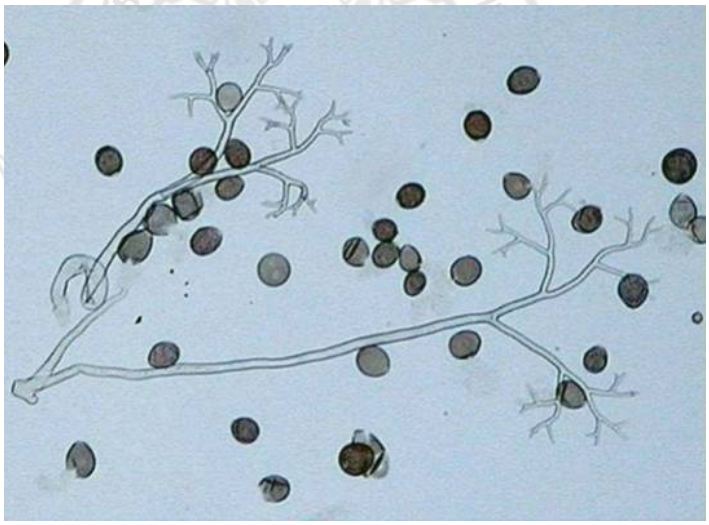
ปัจจุบันมีการปลูกแตงกวากันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศไทย แตงกวาเป็นพืชที่สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรได้ดีในช่วงเวลาอันสั้น เนื่องมาจากแตงกวามีอายุตั้งแต่การปลูกถึงการเก็บเกี่ยวสั้น และสามารถปลูกได้ตลอดปี พื้นที่ที่ใช้ในการเพาะปลูกแตงกวาในประเทศไทยมีประมาณ 28,000 แฮกเตอร์[4] โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือมีพื้นที่ในการเพาะปลูกแตงกวาประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ในการเพาะปลูกทั้งประเทศ[5] แตงกวาถือได้ว่า

อย่างไรก็ตามแตงกวาเป็นพืชผักชนิดหนึ่งที่มีศัตรูพืชเข้ามาทำลายมาก ไม่ว่าจะเป็นแมลงศัตรูพืช เช่น เพลี้ยไฟ (thrips : *Haplothrips floricola*) ไรแดง (red spider mites : *Tetranychus spp.*) เต่าแตงแดง (red cucurbit beetle : *Aulacophora simills*) และเต่าแตงดำ (black cucurbit beetle : *A. frontalis*) เป็นต้น รวมไปถึงโรคที่เป็นศัตรูพืชอีกหลายตัวที่ถือว่าเป็นปัญหาสำคัญที่พบได้บ่อยและสร้างความเสียหายกับแตงกวาเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นโรคใบด่าง (mosaic) โรคผลเน่า (fruit rot) โรคราแป้ง (powdery mildew) และโรคที่สำคัญอีกโรคหนึ่งที่ระบาดและสร้างความเสียหายได้ไม่น้อยกว่าโรคอื่นๆ นั่นก็คือ โรคราน้ำค้าง (downy mildew)

2.2 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew)

โรคราน้ำค้างในแตงกวา หรือที่เกษตรนิยมเรียกว่าโรคใบลาย เกิดจากเชื้อราที่มีชื่อว่า *Pseudoperonospora cubensis*[21, 22, 23] เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในวงศ์ Peronosporaceae เป็นปรสิตแบบถาวร (obligate parasite) ลักษณะเส้นใยของเชื้อนี้ เป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น (non-septate mycelium) เส้นใยเป็นท่อยาวเจริญแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของใบพืช (intercellular mycelium) เชื้อราจะสร้างอวัยวะที่เรียกว่า ฮูสตอเรีย (haustoria) แทงเข้าไปในเซลล์พืช และทำหน้าที่ดูดอาหารจากเซลล์พืช เมื่อเส้นใยแก่และสภาพแวดล้อมเหมาะสม ก็จะขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอแรงเจีย (sporangia) ที่มีสีใสบนก้านสปอแรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) ที่โผล่ออกจากปากใบพืช สปอแรงจิโอฟอร์จะแตกกิ่งก้านออกมาสองแฉก (dichothomously branches) ลักษณะของสปอแรงเจียคล้ายผลมะนาว (lemon–shaped sporangia) (ภาพที่ 2.3) สามารถแพร่กระจายเข้าสู่พืชโดยอาศัยกระแสลม น้ำฝน แมลง หรือติดไปตามอุปกรณ์การเกษตรและเสื้อผ้าของเกษตรกร เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญและแพร่พันธุ์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15 – 20 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีน้ำค้างและหมอกลงจัด ฝนตกชุก หรือในช่วงที่มีความชื้นสูง[15]

ลักษณะอาการของโรคราน้ำค้างในระยะแรกจะเริ่มมีจุดสีเขียวอ่อนกระจายทั่วไปบนใบ จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แผลจะมีลักษณะเป็นเหลี่ยมที่ถูกจำกัดขอบเขตโดยเส้นใบ (ภาพที่ 2.4) ถ้าต้นติดเชื้อโรคในปริมาณมากแผลจะลามไปทั้งใบ เมื่อมีอากาศชื้นใต้ใบตรงตำแหน่งของแผลจะมีเส้นใยสีขาวเกาะเป็นกลุ่มและมีสปอร์สีดำเป็นผงสีดำ มักจะเกิดอาการกับใบล่าง ๆ ก่อนแล้วลุกลามไปยังยอดทำให้ใบแห้งตาย ใบร่วงก่อนกำหนด ต้นโทรม คุณภาพของผลลดลงและทำให้ผลขนาดเล็กกว่าปกติแต่ไม่ทำลายผล[24] ถ้าโรคระบาดในระยะที่ผลยังอ่อน จะทำให้ผลมีขนาดลีบเล็กลง บิดเบี้ยวแคระแกร็นและคุณภาพต่ำ ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก เชื้อดังกล่าวนอกจากจะทำให้ปริมาณผลผลิตลดลงแล้ว ยังทำให้คุณภาพของของผลผลิตลดลง อีกด้วย ตัวอย่างเช่นลดความหวานในผลแคนตาลูปและแตงโม นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวลดลง และยังสามารถทำให้ต้นแตงตายได้[25, 26] โรคราน้ำค้างจะระบาดในช่วงที่มีความชื้นสูงโดยเฉพาะในตอนเช้าที่มีหมอกน้ำค้างจัด และหลังจากช่วงหลังฝนตกติดต่อกันทำให้มีความชื้นสูง[27] นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถเข้าไปเจริญอยู่ภายในเมล็ดทำให้เมล็ดพันธุ์มีคุณภาพต่ำอาจทำให้ผลผลิตลดลงมากกว่าร้อยละ 50[9]



ภาพที่ 2.3 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pseudoperonospora cubensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง[28]

ภาพที่ 2.4 ลักษณะของใบแตงกวาที่ติดโรคราน้ำค้าง[29]

แนวทางการป้องกันและกำจัดโรคราน้ำค้างซึ่งได้ผลและเกษตรกรนิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน คือการใช้สารเคมีคลุกเคล้ากับเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกควบคู่กับการฉีดพ่นสารเคมีให้ต้นแตง 5 – 6 ครั้ง ต่อฤดูกาลเพาะปลูก ซึ่งมีโอกาสทำให้เชื้อโรคดื้อยาและอาจเกิดสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงยิ่งขึ้น อีกทั้งก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนผู้ผลผลิตและผู้บริโภคอีกด้วย อีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการป้องกันโรคราน้ำค้างได้ดี เป็นวิธีที่ประหยัด สะดวก และมีความปลอดภัยทั้งต่อคนและสิ่งแวดล้อม นั่นคือการใช้สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง[19] ซึ่งในปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์ได้มีการศึกษาค้นคว้า และปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างเพื่อพัฒนาพันธุ์ให้เหมาะสมกับการเพาะปลูกและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้มากยิ่งขึ้นอีกด้วย

2.3 การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรค

โรคพืชสร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตปีละหลายล้านบาท เนื่องจากประเทศไทยมีอากาศร้อนชื้นตลอดปีซึ่งเหมาะแก่การเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในพืช เชื้อโรคจึงสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างต่อเนื่องในพืช เชื้อโรคบางชนิดเข้าทำลายพืชตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโต โดยทำลายใบ กาบใบ และลำต้น เช่นโรคใบจุด (leaf spot) โรคใบไหม้ (leaf blight) หรือโรคราน้ำค้าง (downy mildew) บางครั้งการทำลายรุนแรงมากจนใบพืชเหี่ยวแห้งไปทั้งใบ มีผลทำให้ผลผลิตลดอย่างมาก[30] เมื่อเกิดการระบาดของโรคขึ้น นอกจากการใช้สารเคมีในการกำจัดโรคพืชแล้ว นักปรับปรุงพันธุ์พืชเริ่มมองหาทางเลือกอื่นที่ประหยัด สะดวก และมีความปลอดภัยทั้งต่อคนและสภาพแวดล้อมมากกว่า นั้นก็คือการใช้สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคที่กำลังระบาด

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคมีขั้นตอนการดำเนินงานโดยทั่วไป คือ 1) การรวบรวมสายพันธุ์พืช 2) การสกัดสายพันธุ์บริสุทธิ์ 3) การปลูกทดสอบสายพันธุ์ 4) การผสมพันธุ์ 5) การคัดเลือกสายพันธุ์ [30] ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุ์พืชที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์จึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชนี้เป็นแหล่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ เพื่อใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคและศัตรูพืช รวมถึงสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่แปรผันได้[32, 33] ในปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์พืชที่สามารถต้านทานโรคในพืชหลากหลายชนิด โดยเฉพาะพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าวโพด[34, 35] ถั่วลิสง[36] ถั่วเหลือง[37] และแตงกวา[38, 39, 40] เป็นต้น

2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นหนึ่งในความหลากหลายทางชีวภาพ (biological diversity) ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพประกอบด้วย ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ (species diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetics diversity) และความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity)[32] ความหลากหลายทางพันธุกรรมหมายถึง ความหลากหลายของยีนที่มีอยู่ในแต่ละสิ่งมีชีวิต ซึ่งสิ่งมีชีวิตเดียวกันอาจมียีนที่แตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ ในระบบนิเวศหนึ่งๆ จะประกอบด้วยกลุ่มสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด แม้ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันก็ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดสายพันธุ์ต่างๆ อันเป็นรากฐานสำคัญที่เอื้ออำนวยให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงชีวิตให้สอดคล้องกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถดำรงเผ่าพันธุ์ได้สืบไป[41]

ความหลากหลายทางพันธุกรรม เกิดจากความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนทางพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ (mutation) ร่วมกับการสืบพันธุแบบอาศัยเพศที่ผ่านขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) และเกิดครอสซิ่งโอเวอร์ (crossing over) มีผลทำให้ยีนรวมตัวกันใหม่ (gene recombination) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดจากจากพ่อและแม่ไปสู่รุ่นต่อไป โดยการถ่ายทอดแต่ละรุ่นจะพบกับแรงกดดันทางวิวัฒนาการต่างๆ กัน เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพ ทำให้โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเปลี่ยนแปลงไป เช่น การขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม (deletion) หรือการเพิ่มบางส่วนขึ้นมา (insertion) ก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากร[32, 42] ในอดีตความหลากหลายทางพันธุกรรมทำให้มนุษย์สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชและสัตว์จากธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ เช่น ข้าวได้ถูกคัดเลือกจากพันธุ์ป่าเพื่อนำมาใช้ในการเพาะปลูก และเกิดสายพันธุ์ใหม่ที่ดีขึ้นเองโดยธรรมชาติ ดังนั้นในปัจจุบันเราจึงไม่เพียงแต่มีพืชและสัตว์จำนวนมากกว่า 1.5 ล้านชนิดเท่านั้น แต่เรายังมีสายพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นทั้งในพืชและสัตว์แต่ละชนิดอีกด้วย เช่น ปัจจุบันมีข้าวมากกว่า 100,000 สายพันธุ์ในโลก ความหลากหลายทางชีวภาพได้กลายเป็นพื้นฐานของการปรับปรุงผลผลิตอย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็นการคัดเลือกพันธุ์ การกลายพันธุ์ และการผลิตลูกผสม การปรับปรุงดังกล่าวนี้นำมาใช้ได้ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งถือได้ว่ามีความสำคัญทั้งทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และรวมไปถึงทางด้านเกษตรกรรมด้วยเช่นกัน[41]

2.4.1 วิธีการที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลักๆ คือ การศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูพันธุศาสตร์ พบว่าข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ให้รายละเอียดที่มีแบบแผนชัดเจนในด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั่วไปเทียบเคียงได้กับข้อมูลที่มาจากสัณฐานวิทยา[43]

1. การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

สัณฐานวิทยาสามารถศึกษาได้โดยง่าย เป็นลักษณะที่สังเกตเห็นได้ชัดเจนและถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามหลักเมนเดล ซึ่งจะสะท้อนให้เห็นถึงองค์ประกอบทางจีโนไทป์ที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ ซึ่งบางครั้งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเป็นพิเศษ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานก็ไม่ได้มีผลมาจากพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีผลมาจากสภาพแวดล้อมอีกด้วย จึงทำให้การเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาอาจเกิดความผิดพลาดได้ในกรณีของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน[44] ดังนั้นในปัจจุบันนักวิจัยจึงนิยมใช้เครื่องหมายอื่นๆ มาร่วมในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต

2. การศึกษาโดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

วิธีการที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มีอยู่หลากหลายเทคนิค ซึ่งจำแนกออกเป็นการศึกษาในระดับโปรตีนหรือการศึกษาเครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบโมเลกุลโปรตีนชนิดต่างๆ และการศึกษาในระดับดีเอ็นเอได้แก่ การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มาจากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบัน

การตรวจสอบพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคด้านลายพิมพ์ทางโมเลกุล (molecular fingerprint) เป็นสิ่งจำเป็น[45] เนื่องมาจากการใช้สัณฐานและสรีระของพืชยังมีปัญหาในการจัดจำแนกความแตกต่างของพันธุ์พืช เพราะลักษณะดังกล่าวสามารถแปรผันไปตามสภาพแวดล้อม อีกทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ส่วนใหญ่มีการพัฒนาอยู่ภายใต้อิทธิพลของปฏิกิริยาระหว่างจีโนไทป์ (genotype) กับสภาพแวดล้อม ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้มีความแปรปรวนหรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง[46, 47] อีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้สำหรับการตรวจสอบพันธุ์พืชและการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมคือการใช้เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) เช่น flavonoids[48, 49] และ anthocyanins[50] หรือการใช้เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาเพื่อประโยชน์ในการสะสมพันธุ์โดยการวิเคราะห์ไอโซไซม์[51, 52, 53, 54] การใช้ไอโซไซม์วิเคราะห์สายพันธุ์ของข้าว[55, 56, 57] และการใช้ไอโซไซม์ในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรด[58] แต่ข้อจำกัดของการใช้เครื่องหมายทางชีวเคมีหรือการใช้เครื่องหมายทางโปรตีน คือจำนวนยีนที่สามารถตรวจสอบได้มีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม ต้องศึกษาการแสดงออกของยีนในช่วงที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์เท่านั้น นอกจากนี้แล้วผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กันระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วยเป็นสำคัญ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอให้มีความหลากหลาย เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบทางพันธุกรรมพืช เพราะการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีมากกว่าและลดความแปรผันที่ขึ้นอยู่กับระยะการเติบโตของพืชและสภาพแวดล้อมได้ดี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอก็คือการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอนั่นเอง

2.5 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1984 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ Alec Jeffreys และถูกพัฒนาขึ้นใช้โดย Alec Jeffreys และคณะ ในปี 1985 โดยสกัดดีเอ็นเอได้จากเซลล์แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วตรวจหาโพลิมอฟิซึม (Polymorphism) ด้วยวิธี southern blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอมินิแซทเทลไลน์ (minisatellite DNA) เป็นโพรบ เพื่อใช้ในการบ่งชี้ความจำเพาะของแต่ละบุคคลด้วยดีเอ็นเอ

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีหลายประการ คือโมแลกุลของดีเอ็นมีความเสถียร จึงสามารถเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ก็ได้ จากระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัดครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ ให้เลือกใช้ให้ตรงกับความต้องการอย่างมากมาย ทำให้การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอทำได้อย่างกว้างขวางและสามารถประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้อีกหลายด้าน[44]

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีประโยชน์สามารถประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน เช่นใช้ในการแยกแยะบุคคลหนึ่งออกจากอีกบุคคลหนึ่งคนหนึ่ง การตรวจสอบความเกี่ยวข้องทางสายเลือดระหว่างพ่อแม่และลูก ดังนั้นในปัจจุบันการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงช่วยลดข้อจำกัดของการพิสูจน์ลายพิมพ์นิ้วมือ การพิสูจน์คราบเลือด ฯลฯ ซึ่งใช้เป็นหลักฐานสำคัญในทางนิติวิทยาศาสตร์ในกระบวนการยุติธรรมได้ดี นอกจากนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคมะเร็ง ตรวจวินิจฉัยยีนของทารกก่อนคลอด (prenatal diagnosis) เช่นโรคพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของยีนเดี่ยว เช่น ฮีโมฟีเลียเอ ฮีโมฟีเลียบี เป็นต้น ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของสัตว์ เช่น บอกชนิดหรือสปีชีส์ (species)[42] และยังสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์พันธุ์พืชได้อีกด้วย วิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอทำได้โดยอาศัยหลักการไฮบริไดเซชัน (hybridization) และการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) เป็นหลัก

2.5.1 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน (Hybridization-based DNA fingerprint)

การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization-based DNA fingerprint) สามารถตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมได้จากการนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (genomic DNA) มาตัดด้วย

เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส (point mutation) ในตำแหน่งจดจำของเอนไซม์โดยการหายไปหรือเพิ่มขึ้นของเบส

1. เกิดการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ 2 ตำแหน่งมีผลให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดได้มีขนาดไม่เท่ากัน

2. เกิดการหายไปของดีเอ็นเอส่วนที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์มีผลทำให้ตำแหน่งจดจำหายไป

3. เกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ของดีเอ็นเอ (DNA rearrangement) ในบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ 2 ตำแหน่ง

เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างขึ้น (ตรวจสอบได้โดยการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปทำการไฮบริไดซ์กับโพรบ) สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายทางอณูโมเลกุล หรือใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมต่อไป[59]

เทคนิค RFLP สามารถประยุกต์ใช้ในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการจัดจำแนกสายพันธุ์พืช วิเคราะห์ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การหาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ เช่น การศึกษาความสัมพันธ์และความแปรผันทางพันธุกรรมในสายพันธุ์แตงกวา[60, 61] การศึกษาความหลากหลายของข้าวบาร์เลย์ [62, 63] ข้าวโอ๊ต *Avena sativa* L.[64] ข้าวสาลี *Tricum aestivum*[65] ในการตรวจสอบสายพันธุ์ เช่น ข้าวสาลี *Triticum aestivum* L.[66] เห็ดทรัฟเฟิ่ลขาว Tuber magnatum[67] ใช้ศึกษาการทำแผนที่ยีนของ ข้าวฟ่าง[68] ข้าว *Oryza sativa* L.[69] และใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดในสกุล *Pleurotus*[70] เป็นต้น เทคนิค RFLP มีข้อดีคือสามารถทำซ้ำแล้วได้ผลเหมือนเดิม สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายดี

2.5.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR-based DNA fingerprint)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR-based DNA fingerprint) เป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาไม่นาน โดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ DNA polymerase ในหลอดทดลอง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือยีนเป้าหมายที่ตำแหน่งเฉพาะเพียงตำแหน่งเดียวโดยวิธีพีซีอาร์จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีความจำเพาะกับบริเวณดีเอ็นหรือยีนที่ต้องการตรวจสอบ โดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน เพื่อเป็นข้อมูลในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ แล้วจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อตรวจสอบยืนยันว่ามียีนดังกล่าวในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษาอยู่ ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งโดยวิธีพีซีอาร์ทำได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือไพรเมอร์ชนิดสุ่มรหัส (random primer) เพียงชนิดเดียวมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในบางแห่งเกิดเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์แทนการใช้โพรบเพื่อทำการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอเป้าหมายมีข้อดีอยู่หลายประการคือ นอกจากตรวจโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ได้ในระดับสูงแล้วยังทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่า สามารถนำไปใช้ได้ดีในกรณีที่มีตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบจำนวนมาก ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอมีอยู่หลายเทคนิคดังตัวอย่างต่อไปนี้

Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Microsatellite

SSR เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucletide) ที่ประกอบด้วยลำดับเบสสั้นๆ ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ กัน (simple sequence repeat) ประมาณ 2 – 5 นิวคลีโอไทด์ เช่น (CA)n (n = 10 – 60) ซึ่งลำดับเบสนี้จะพบกระจายทั่วไปบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตและ

Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)

เทคนิค AP-PCR คิดค้นโดย Welsh และ McClelland ในปี ค.ศ. 1990[74] โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 หรือมากกว่า 20 นิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 โปรแกรม คือใช้อุณหภูมิต่ำในรอบแรกสำหรับช่วงปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ให้ไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สมเข้ามาจับคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (annealing) แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอีก 30 – 40 รอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ช่วงหลังใส่นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีลงไป แล้วจึงแยกขนาดดีเอ็นเอในโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrymide gel) ตรวจสอบผลด้วยการทำออโตเรดิโอกราฟ

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เทคนิค RAPD เป็นวิธีที่วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นในพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่คิดค้นโดย William และคณะ (1990)[75] โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 8 – 10 นิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจล และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์ เทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้เป็นแบบไม่จำเพาะ[44] เทคนิค RAPD มีข้อดีคือทำได้ง่าย ประหยัด รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่มีข้อด้อยคือทำการทดลองซ้ำมักไม่ได้ผลคงเดิม ซึ่งเกิดได้จากหลายตัวแปร เช่น คุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะให้ผลที่ดีกว่า เป็นต้น และเทคนิคนี้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกทและเฮทเทอโรไซโกทได้[76]

DNA Amplification Fingerprint (DAF)

เทคนิค DAF ใช้ครั้งแรกโดย Caetano-Anolles และคณะในปี ค.ศ. 1991[77] โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5 – 8 นิวคลีโอไทด์และใช้โปรแกรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ

เทคนิคดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น เป็นเทคนิคที่ให้แถบดีเอ็นเอได้หลายแถบและนิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์พืช โดยเฉพาะเทคนิค RAPD เนื่องมาจากมีวิธีที่ไม่ยุ่งยาก สะดวก รวดเร็วและให้ข้อมูลในปริมาณมาก ตัวอย่างเช่น การศึกษาความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมของแตงกวา[78] การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาแฟริกาเพื่อการสะสมพันธุ์[79] การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD ในการป้องกันแตงกวาสายพันธุ์ใหม่[80] และการศึกษาตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในแตงกวา[38] เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตงกวา ในเชิงเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค RAPD ไอโซไซม์ และ RFLP[52, 81] พบว่าการศึกษาทางด้านไอโซไซม์มีความน่าเชื่อถือน้อยที่สุดในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตงกวา ส่วนเทคนิค RAPD และเทคนิค RFLP มีประสิทธิภาพในการศึกษาความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน โดยการเปรียบเทียบผลจากค่า genetic distance (GD) แต่เมื่อเปรียบเทียบรวมถึงต้นทุน ความสะดวก และผลของแถบดีเอ็นที่ได้ เทคนิค RAPD มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมากที่สุด

อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีจะเป็นแบบ dominant marker คือไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ และทำการทดลองซ้ำแล้วได้ผลคงเดิมยาก จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมาอีกหลายเทคนิค เช่น เทคนิค ramdomly amplified microsatellite polymorphism (RAMPO), เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะต่างกันที่ขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้และวิธีการตรวจสอบผลที่แตกต่างกัน การเลือกใช้แต่ละเทคนิคจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษานั้นๆ

2.6 การตรวจสอบสายพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิค AFLP

เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มาก่อน เทคนิค AFLP นี้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยประเทศเนเธอร์แลนด์ ในปี ค.ศ. 1993 พื้นฐานของเทคนิค AFLP คือการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เอนไซม์: เทคนิค AFLP นิยมใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในการตัด คือ ชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง (frequent cutter) ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^4(= 256)และชนิดที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง (rare cutter) ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^6 (= 4,096) เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มีหลายชนิด เช่น *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Bgl*II, *Xba*I (6-cutter) และ *Sse* 83871 (8-cutter) ร่วมกับ *Mse*I หรือ *Taq*I ซึ่งเป็น 4-cutter เอนไซม์ *Mse*I มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TTAA-3' และ *Taq*I มีตำแหน่งจดจำเป็น 5'-TCGA-3' ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ *Mse*I มากกว่า เนื่องจากตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ และแยกขนาดโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่ใช้เป็นคู่กันมักใช้เอนไซม์ *Eco*RI เนื่องจากราคาถูก และการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์มีน้อย การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดจะทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พอเหมาะ และมีข้อดีอีกหลายประการดังนี้

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส จะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดเล็กซึ่งจะทำให้เพิ่มปริมาณได้ดีในปฏิกิริยาพีซีอาร์เหมาะสมที่จะนำไปแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจล

2. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง จะตัดดีเอ็นเอได้น้อยจึงช่วยลดชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้พอเหมาะต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องมาจากชิ้นส่วนที่เพิ่มได้เกือบทั้งหมดเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง และปลายอีกด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 6 ตำแหน่ง ส่วนการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงชนิดเดียวจะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ปลายทั้ง 2 ด้านมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (invert repeat) เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวจะสามารถกลับมาจับกันเองเกิดโครงสร้างแบบ stem-loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ หรืออาจทำให้ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวนน้อย เฉพาะชิ้นที่มีขนาดเล็กเท่านั้น เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าจึงไม่ค่อยนิยม

3. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้มีขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำ PCR และยังสามารถปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน

4. การใช้ไพรเมอร์คู่ผสมทั้ง 2 ชนิดจำนวนน้อยก็สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก เช่นมีไพรเมอร์ชนิดละ 5 แบบ จากการเพิ่มเบสคัดเลือกสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 25 แบบ เป็นต้น

5. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดในการทำพีซีอาร์จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดทำให้สามารถเลือกติดฉลากที่ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่ง และเมื่อนำไปแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทำให้วิเคราะห์ผลง่าย

Adapter: adapter ที่นำมาต่อกับชิ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์เป็น adapter ที่ออกแบบมาให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสคู่ที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถเข้าไปทำการตัดได้อีก แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นที่ถูกตัดไปแล้วกลับมาเชื่อมต่อกันเองก็จะสามารถถูกตัดได้อีก adapter ที่ถูกนำมาเชื่อมต่อกบชิ้นดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นตำแหน่งให้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงเข้ามาจับ การออกแบบเบสที่จะนำมาใช้เป็น adapter จะมีความสัมพันธ์กับสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์[82]

ไพรเมอร์: การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนในเทคนิค AFLP สามารถทำได้โดยการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสทางปลาย 5′ เหมือนกันกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และจะมีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้น Vos และคณะ (1995)[82] ได้อธิบายส่วนประกอบของ AFLP ไพรเมอร์ โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน (ภาพที่ 2.5) ดังต่อไปนี้

	CORE	ENZ	EXT
***Eco*RI**	5-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3
***Mse*I**	5-GATGAGTCCTGAG	TTA	NNN-3

ภาพที่ 2.5 ส่วนประกอบของ AFLP ไพรเมอร์

1. Core sequence (CORE): เป็นส่วนที่อยู่ทางด้านปลาย 5′ ของไพรเมอร์ เป็นตำแหน่งที่มีลำดับเบสคู่สมกับ adapter ทำให้ไพรเมอร์เข้าไปจับและทวีจำนวนอย่างจำเพาะเจาะจงโดยเทคนิคพีซีอาร์

2. Enzyme specific sequence (ENZ): เป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางของไพรเมอร์เป็นตำแหน่งที่มีเบสคู่สมกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์

3. Selective extension (EXT): เป็นส่วนที่อยู่ทางด้านปลาย 3′ ของไพรเมอร์ เป็นตำแหน่งที่มีการเพิ่มเบสคัดเลือก (selective nucleotide) เพื่อใช้ในการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้น การเพิ่มเบสคัดเลือกนิยมเพิ่ม 1 – 3 เบส ขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนมของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลอง โดยการเติมเบสหนึ่งตัวจะสามารถลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ 4 เท่าตัวต่อทุกๆ เบสที่เพิ่มขึ้น ในกรณีที่ตัวอย่างมีจีโนมขนาดเล็กมาก จะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1 – 2 เบส ส่วนในกรณีที่ตัวอย่างมีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสคัดเลือกมากกว่า 2 เบสที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด

2.6.1 หลักการของ AFLP

ขั้นตอนในการทำ AFLP มี 3 ขั้นตอนหลัก[82] (ภาพที่ 2.6) ดังต่อไปนี้

1. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย adapter การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ที่มีจำนวนเบสของตำแหน่งจดจำต่างกันมากกว่าเนื่องจากตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel

เมื่อได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะแล้วจึงเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่ง adapter จะออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสคู่ที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก

2. การเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนอย่างจำเพาะเจาะจงโดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มตัวเบสคัดเลือก ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5′ เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วน ซึ่งการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3′ มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำ PCR ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification[44, 82] ดังนั้นในการศึกษาจีโนมขนาดเล็ก หรือโคลนที่อยู่ใน พลาสมิด คอสมิด หรือ bacterial ratification chromosome ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบส

3. การวิเคราะห์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อิเล็กโทรโฟริซิส denaturing polyacrylamide gel แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่แยกได้อยู่ในช่วง 50 – 100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท หรืออาจตรวจสอบโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ หรือตรวจสอบผลด้วยการไฮบริไดเซชันกับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (nonradioactive label) หรือตรวจสอบการเรืองแสงโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic sequencer) เป็นต้น

2.6.2 ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิค AFLP

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตต่างๆ มากมาย เช่น แบคทีเรีย, สัตว์ และพืช มากขึ้นเป็นลำดับ[83] เนื่องมาจาก

1. ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอตัวอย่าง จึงสามารถทำได้อย่างกว้างขวาง ทำได้รวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณน้อย โดยเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์จึงมีประสิทธิภาพสูง

2. จากรายงานของ Vos และ Kuiper (1997)[84] กล่าวว่าเทคนิค AFLP สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้โดยดูจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้ จึงวิเคราะห์ผลได้แบบเดียวกับดีเอ็นเอเครื่องหมายที่แสดงการข่มแบบ co-dominance แต่จากรายงานอื่นๆ จะถือว่าเป็นเครื่องหมายที่แสดงการข่มแบบ dominance[44]

3. เกิดโพลิมอร์ฟิซึมจำนวนมาก สามารถใช้บ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี รวมไปถึงในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน คือมี multiplex ratio สูง

4. เป็นเทคนิคที่มีความน่าเชื่อถือ มีความผิดพลาดน้อย เมื่อทำการทดลองซ้ำพบมีความคลาดเคลื่อนน้อยเนื่องจาก misprinting และ scoring error น้อยกว่า 2 % โดย Jones และคณะ ในปี ค.ศ.1997[83] ทำการทดลองซ้ำใน 8 ห้องปฏิบัติการในประเทศแถบยุโรป พบแถบดีเอ็นเอ แตกต่างกันเพียง 1 แถบจากทั้งหมด 172 แถบ คิดเป็นค่าความผิดพลาดเนื่องจากการทดลองคนละสถานที่ (Between – laboratory error) น้อยกว่า 0.6 %

นอกจากนี้แล้ว เทคนิค AFLP ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายด้านด้วยกันเช่น

1. ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RAPD หรือการวิเคราะห์ด้วยไมโคร-แซทเทลไลท์

2. การทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอได้จำนวนมาก และมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากดีเอ็นเอคนละตำแหน่งกันได้ จึงอาจทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้

3. เทคนิค AFLP ไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมากๆ หรือเหมือนกันมากๆ เพราะอาจทำให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค AFLP กับเทคนิคอื่นๆ ได้แก่ เทคนิค RFLP, RAPD และ SSR ในด้านต่างๆ แล้ว พบว่ามีทั้งข้อดีและข้อด้อยกว่าดังตารางที่ 2.1

2.3.6 การประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP

เนื่องจากเทคนิค AFLP ทำให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมจำนวนมากจึงสามารถประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน เช่น การศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง การจดทะเบียนพันธุ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม การติดตามยีนและการทำแผนที่จีโนม นอกจากนี้แล้วยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชด้วยเช่นกัน

Winfield และคณะ (1998)[85] ได้อาศัยเทคนิค AFLP ในการศึกษาความหลากหลายของ *Populus nigra* subsp. *betulifolia* ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศอังกฤษ จำนวน 146 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับ non – *betulifolia* poplar อีก 3 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 147 แถบ จากการใช้ 2 คู่ไพรเมอร์ โดยได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 82 แถบ คิดเป็นค่าความแตกต่างได้ 56% เมื่อนำค่าความเหมือนที่คำนวณได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มกว้างๆ 5 กลุ่ม โดยหนึ่งกลุ่มเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เป็น non–*betulifolia* poplar และอีก 4 กลุ่มเป็นกลุ่มของ *Populus nigra* ssp. *betulifolia* ตามความสัมพันธ์ทางด้านแหล่งที่มาและพันธุกรรม จากข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุ์พืช *Populus nigra* ssp. *betulifolia* ในประเทศอังกฤษได้

Sanz – Cortès และคณะ (2003)[86] ได้ศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของต้นมะกอก 10 สายพันธุ์ จำนวน 38 ตัวอย่างจากพื้นที่เพาะปลูกรอบเมือง Vanlencia ในประเทศสเปน

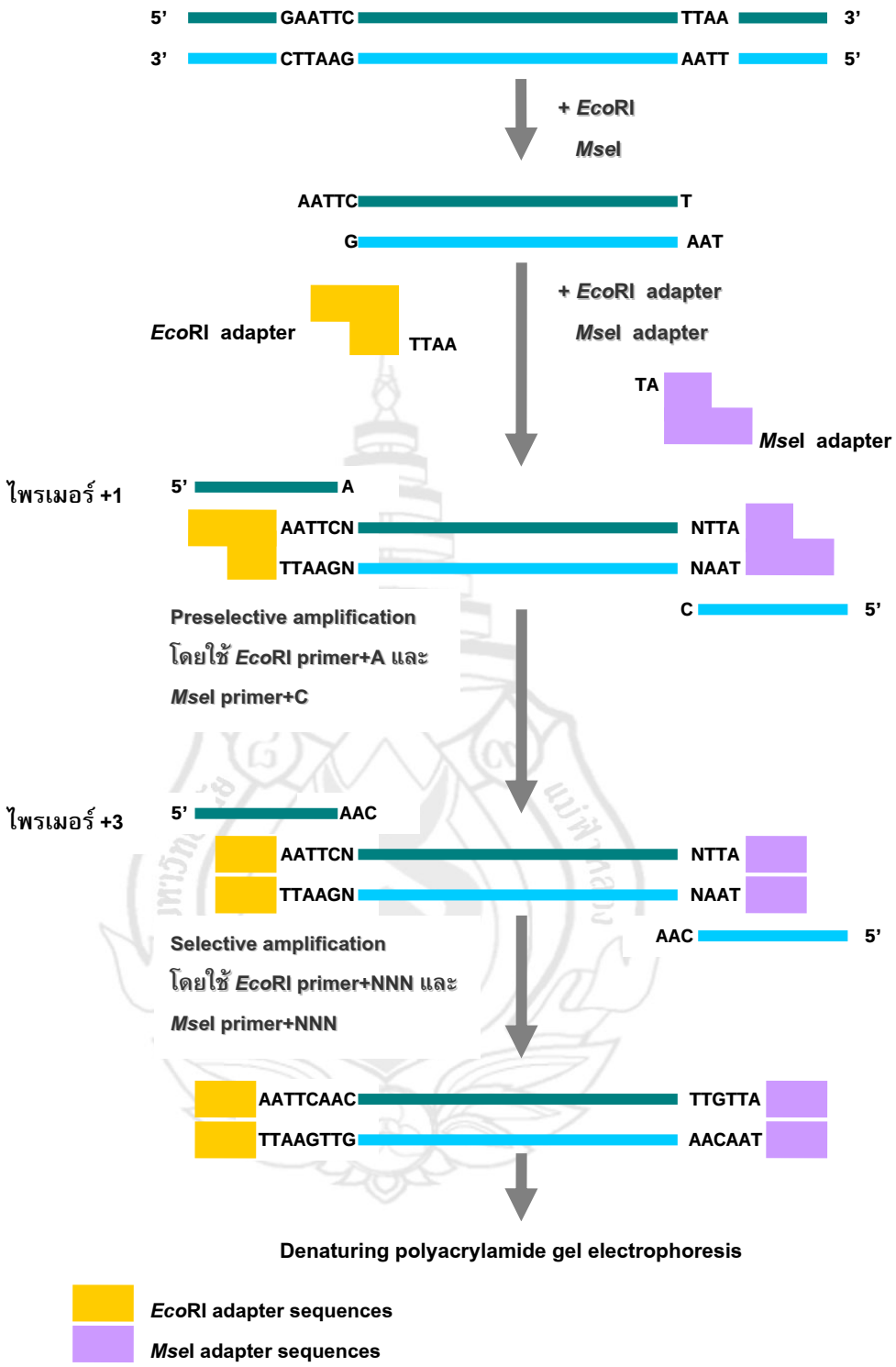
Schnell และคณะ (2001)[87] ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของขนุน 26 ตัวอย่างโดยอาศัยเทคนิค AFLP เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ขนุนที่มีการเก็บสะสมใน Fairchils Tropical Garden (FTG) จาก 30 คู่ไพรเมอร์พบว่ามีเพียง 12 คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการใช้แยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 187 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 92 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 49.2% มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.567 – 0.950 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ร่วมกับวิธี Principle Component Analysis (PCA) สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีแหล่งที่มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และกลุ่มที่สองเป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากประเทศอินเดีย จากการศึกษาด้วยเทคนิค AFLP ทำให้ทราบว่ายังมีความหลากหลายทางสายพันธุ์คงอยู่ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บสะสมไว้ และผลการศึกษายังมีความสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพ

Balasaravanan และคณะ (2003)[88] ได้อาศัยเทคนิค AFLP ศึกษาสายพันธุ์ชา 49 สายพันธุ์ทางตอนใต้ของอินเดีย พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน 1,555 แถบ การจัดกลุ่มได้อาศัยวิธี UPGMA และวิธี PCA สามารถแบ่งตัวอย่างออกได้เป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน ได้แก่กลุ่มของ Assam, China และ Cambod ซึ่งในกลุ่มของ China มีค่าดัชนีความแตกต่างมากที่สุด (0.612) และกลุ่มของ Assam มีค่าดัชนีความแตกต่างน้อยที่สุด (0.285) ผลจากการศึกษาที่ได้จะนำไปใช้ในการอนุรักษ์และเก็บสะสมสายพันธุ์ชา รวมไปถึงใช้ในการปรับ ปรุงสายพันธุ์ชา

Bayazit และคณะ (2007)[89] ได้ศึกษาหาความความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นวอลนัท (*Juglans regia* L.) ที่มีลักษณะปรับตัวอยู่ในสภาวะอากาศที่อบอุ่นได้ โดยใช้เทคนิค AFLP

Muminovic และคณะ (2004)[90] อาศัยเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 15 คู่ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพด (*Varlerianella locusta*) จากทั้งหมด 64 ตัวอย่าง ซึ่ง 45 ตัวอย่างได้มาจากสายพันธุ์ที่ใช้ในการเพาะปลูกและอีก 19 ตัวอย่างจาก genebank ค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะถูกนำมาคำนวณ Jaccard's coefficient of genetic similarity (GS) ซึ่งค่า GS ในกลุ่มสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมมีค่าเท่ากับ 0.09 และค่า GS ในกลุ่มสายพันธุ์ที่ได้มาจากต่างประเทศมีค่าเท่ากับ 0.47 จากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มดังนี้ กลุ่ม *V. locusta*, กลุ่มสปีชีส์อื่นของ Valerianella และกลุ่มพันธุ์ป่า ซึ่งเทคนิค AFLP ถือได้ว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพด สำหรับการเก็บสะสมสายพันธุ์ และเป็นข้อมูลที่ใช้ในการปรับปรุงพันธ์ได้เป็นอย่างดี

นอกจากนี้ยังพบว่ามีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชอีกหลายชนิด เช่น พืชในสกุล *Typha*[91] ถั่วเหลือง [Glycine max (L.) Merrill][92] หญ้าเนเปียร์, หญ้ากินนีสีม่วง และหญ้ารูซี่[93] กระเทียม *(Allium sativum* L.)[94] และ มะละกอ (*Carica papaya*)[95] เป็นต้น



ภาพที่ 2.6 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์หนึ่งคู่

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ[45]

	RFLP	**RAPD**	**SSR**	**AFLP**
Principle	Restriction endonuclease digestion, Southern blotting hybridization	DNA amplification with random primers	PCR of simple sequence repeat regions	PCR of subset of restriction fragments from extended adapter primers
Abundance in the genome	High	Very high	Medium	High
Level of polymorphism	Medium	Medium	High	Medium
Dominance	Co – dominant	Dominant	Co–dominant	Mixed
Multiplex ratio	1 – 2	5 – 20, adjustable	1	30 – 100, adjustable
DNA amt. required	2 – 10 µg	10 – 25 ng	50 – 100 ng	1 – 2 µg
DNA sequence information requirement	No	No	Yes	No
Radioactive detection	Yes / No	No	No / Yes	Yes / No
Development cost	Medium	Low	High	Medium
Start – up costs	Medium / High	Low	High	Medium

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 เมล็ดพันธุ์แตงกวาและการเพาะปลูก

เมล็ดแตงกวาจำนวน 47 สายพันธุ์ ได้รับจากกระทรวงเกษตรของประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture, USDA) และจากสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง (Lampang Agriculture Research and Training Center, LARTC) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา (ตารางที่ 3.1) เมล็ดที่ได้นำมาทำการเพาะกล้าแตงกวาในเรือนเพาะชำของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน จนได้ใบอ่อนที่มีความกว้างประมาณ 5 – 7 เซนติเมตร เพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์และแหล่งที่มาของแตงกวาจำนวน 47 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

No.	Accession	Country	Source	Disease Rating[3] (score 1-5)
1	PI 197088	India	USDA[1]	1.0
2	PI 321009	Taiwan	USDA	0.5
3	PI 330628	Pakistan	USDA	0.8
4	PI 358813	Malaysia	USDA	1.2
5	PI 358814	Malaysia	USDA	0.8
6	PI 432875	China	USDA	0.8
7	PI 432876	China	USDA	0.8
8	PI 432878	China	USDA	0.5
9	PI 432886	China	USDA	1.2
10	CSL 0013	Thailand	LARTC[2]	1.0

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

No.	Accession	Country	Source	Disease Rating[3] (score 1-5)
11	CSL 0077	Thailand	LARTC	1.2
12	CSL 0088	Thailand	LARTC	1.2
13	CSL 0089	Thailand	LARTC	1.2
14	CSL 0096	Thailand	LARTC	0.8
15	CSL 0097	Thailand	LARTC	0.8
16	PI 279468	Japan	USDA	1.5
17	PI 288238	Japan	USDA	1.5
18	CSL 0068	Thailand	LARTC	1.5
19	CSL 0092	Thailand	LARTC	1.5
20	PI 114339	Japan	USDA	1.8
21	PI 234517	United State	USDA	1.8
22	PI 390259	Japan	USDA	1.8
23	CSL 0014	Thailand	LARTC	1.8
24	CSL 0044	Thailand	LARTC	1.8
25	CSL 0076	Thailand	LARTC	1.8
26	CSL 0080	Thailand	LARTC	1.8
27	PI 164173	India	USDA	2.0
28	CSL 0022	Thailand	USDA	2.0
29	PI 426170	Philippines	USDA	2.2
30	CSL 0043	Thailand	LARTC	2.3
31	CSL 0012	Thailand	LARTC	2.4
32	PI 426169	Philippines	USDA	2.5
33	CSL 0015	Thailand	LARTC	2.5
34	CSL 0046	Thailand	LARTC	2.5
35	CSL 0067	Thailand	LARTC	2.8
36	PI 103049	China	USDA	4.0

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

No.	Accession	Country	Source	Disease Rating[3] (score 1-5)
37	PI 167223	Turkey	USDA	4.0
38	PI 175121	India	USDA	4.5
39	PI 178886	Turkey	USDA	4.5
40	PI 209067	United State	USDA	3.8
41	PI 211979	Iran	USDA	3.5
42	PI 227013	Iran	USDA	3.0
43	PI 321010	Taiwan	USDA	4.0
44	PI 357857	Yugoslavia	USDA	3.5
45	PI 466922	Russian Federation	USDA	3.2
46	PI 478366	China	USDA	3.0
47	PI 483340	Korea	USDA	2.8

หมายเหตุ 1; United States Department of Agriculture

2; Lampang Agriculture Research and Training Center

3; ระดับความรุนแรงของโรค โดยที่ค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 แสดงถึงพื้นที่ใบเสียหายไม่เกินร้อยละ 20 ถ้ามากกว่าหรือเท่ากับ 3.5 แสดงถึงมีพื้นที่ใบเสียหายระหว่างร้อยละ 60 ถึง 80[96]

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบของตัวอย่างแตงกวาทั้งหมด 47 สายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอ ใช้วิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) โดยนำตัวอย่างประมาณ 2 กรัม (ใช้ใบอ่อนที่โตพอสมควร) ตัดก้านใบออกแล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ลงในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว จากนั้นบดให้ละเอียด ควรรีบบดอย่าทิ้งไว้นานเพราะจะทำให้เอนไซม์ของพืชทำลายดีเอ็นเอ นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 2X CTAB buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) 0.5 มิลลิลิตร (CTAB buffer จะมีความหนืด ควรอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้) และ 2–mercaptoethanol 1.5 ไมโครลิตร บ่มหลอดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60

3.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้พร้อมๆ กัน วิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไปมี 2 วิธีคือการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้ spectrophotometer หรือวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์ หลังจากทำการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส

3.3.1 วิธีวัดการดูดกลืนแสง

วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอและวัดปริมาณของดีเอ็นเอได้แม่นยำ จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ไม่มีอาร์เอ็นเอและโอลิโกนิวคลีโอไทด์เจือปน และต้องมีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่า OD ได้ซึ่งอยู่ในระดับไมโครกรัม เมื่อได้สารละลายดีเอ็นเอแล้วจึงนำไปวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD_{260} เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ได้ดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = OD_{260} x 50 μg/ml x dilution factor

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอจะวัดที่ความยาวในช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) ด้วย เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้า OD_{260} / OD_{280} มีค่าอยู่ระหว่าง 1.7 – 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนที่ได้สูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน หรือถ้าต่ำกว่าแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือ phenol[45]

3.3.2 วิธีวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์

วิธีการวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์ ทำได้โดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมมาทำอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจลแล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเรืองแสง ทำให้สามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างได้โดยประมาณ ซึ่งความเข้มของแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้จะมีหน่วยเป็นนาโนกรัม ดังนั้นในกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอมีน้อยไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้จะใช้วิธีนี้ นอกจากนี้วิธีการนี้ยังสามารถบอกคุณภาพดีเอ็นเอได้ว่ามีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอหรือไม่ขนาดของดีเอ็นเอใหญ่ขนาดไหน มีการแตกหักของโมเลกุลมากน้อยเพียงใด ซึ่งวิธีการปฏิบัติมีรายละเอียดดังนี้

เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% โดยละลายผงอะกาโรส 0.8 กรัม ในสารละลาย TE buffer 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนอะกาโรสหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทเจลลงในถาดเตรียมเจลให้มีความหนาประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วจึงเสียบหวีลงที่ปลายด้านบนของแผ่นเจล ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงดึงหวีออก เพื่อให้ได้ช่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ นำเจลออกจากถาดแล้วใส่ลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟลิซิส ให้ด้านที่มีช่องหันไปทางขั้วลบและเติม 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)) ให้ท่วมแผ่นเจล 1 – 2 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading dye buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5:1 แล้วค่อยๆ หยอดสารละลายผสมลงในช่องหวีด้วยไมโครปิเปตและหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ 1kb DNA ladder marker [Invitrogen] ที่ทราบขนาดและความเข้มข้น เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอ ปิดฝาเครื่องและเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของ 6X loading dye buffer เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางพอสมควรซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 – 45 นาที สังเกตได้จากการเคลื่อนที่ของสีของ 6X loading dye buffer โดยให้สีล่างห่างจากขอบล่างของเจล ประมาณ 2 – 3 เซนตริเมตร (สีบนได้แก่ xylene cyanol และ สีล่างได้แก่ bromophenol Blue) นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5μg/ml) ประมาณ 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำประปาที่เปิดแบบไหลผ่านประมาณ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้เครื่อง Gel Doc รุ่น 2000 [BIO – RAD] เพื่อเปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานแล้วถ่ายภาพ

3.4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค AFLP

3.4.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I โดยใส่ดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีรายละเอียดตามตารางที่ 3.3 จากนั้นบ่มสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดได้กับ *Eco*RI และ *Mse*I adapter (ตารางที่ 3.2) ตามรายละเอียดในตารางที่ 3.4 แล้วนำสารละลายดี

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบสของ oligomer ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาทั้ง 47 ตัวอย่าง โดยอาศัยเทคนิค AFLP

Oligomers	Sequences	Source
*Eco*RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	Invitrogen
	3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	
*Mse*I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'	Invitrogen
	3'-TACTCAGGACTCAT-5'	
*Eco*RI primer + 1 (E-A)	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'	Invitrogen
*Mse*I primer + 1 (M-C)	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'	Invitrogen
*Eco*RI primer + 3 (E-AAC)	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	Invitrogen
(E-AAG)	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'	
(E-ACA)	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	
(E-ACT)	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'	
(E-ACC)	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'	
(E-ACG)	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	
(E-AGC)	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'	
(E-AGG)	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'	
*Mse*I primer + 3 (M-CAA)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'	Invitrogen
(M-CAC)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'	
(M-CAG)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'	
(M-CAT)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'	
(M-CTA)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'	
(M-CTC)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'	
(M-CTG)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'	
(M-CTT)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'	

ตารางที่ 3.3 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/µl)	2.50
5X reaction buffer	5.00
*Eco*RI (10 U/µl)	0.25
*Mse*I (5 U/µl)	0.50
น้ำกลั่น	16.75
ปริมาตรรวม	**25.00**

ตารางที่ 3.4 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
สารละลายดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์	25.00
*Eco*RI adapter (5 pmol/µl)	1.00
*Mse*I adapter (25 pmol/µl)	2.00
5X T4 ligase buffer	10.00
T4 DNA ligaes (1 U/µl)	1.00
น้ำกลั่น	11.00
ปริมาตรรวม	**50.00**

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้น preselective amplification

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ หรือเบสคัดเลือก 1 ตัวเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ *Eco*RI และ *Mse*I (ตารางที่ 3.2) เพื่อช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง และช่วยให้เกิดการคัดเลือกในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในชั้นหนึ่งก่อน เตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.5 ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.5 ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ [Auto PCR รุ่น iCycle, BIO – RAD] โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	ทำซ้ำ 20 รอบ
Annealing	อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	
Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

ตารางที่ 3.5 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา preselective amplification

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
สารละลายดีเอ็นเอจากการเชื่อมต่อ adapter	2.00
Primer E-A (5 pmole/µl)	1.00
Primer M-C (5 pmole/µl)	1.00
dNTP mix (2mM)	2.50
10X PCR buffer	2.50
$MgCl_2$ (50mM)	0.75
Taq polymerase (5 U/µl)	0.10
น้ำกลั่น	15.15
ปริมาตรรวม	**25.00**

ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์โดยแบ่ง PCR Product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ PCR Product ที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะพบรอยยาว (smear) ในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส (ถ้าไม่พบแสดงว่าปริมาณสารหรือสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสม หรือการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter ไม่ประสบผลสำเร็จ) จากนั้นนำ PCR product ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งบางส่วนมาทำให้เจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE buffer สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป ส่วน PCR product ที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้น selective amplification

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์หรือเบสคัดเลือก 3 ตัวเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ *Eco*RI และ *Mse*I (ตารางที่ 3.2) โดยคู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด มีชนิดละ 8 แบบ เพื่อช่วยคัดเลือกการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอให้เป็นไปอย่าง

ตารางที่ 3.6 สารและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา selective amplification

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
DNA sample จากขั้นตอน preamplification	5.00
Primer E-NNN (5 pmole/µl)	1.00
Prime M-NNN (5 pmole/µl)	1.00
dNTP mix (2mM)	2.50
10X PCR buffer	2.50
$MgCl_2$ (50mM)	0.06
Taq polymerase (5 U/µl)	0.10
น้ำกลั่น	8.30
ปริมาตรรวม	**25.00**

ผสมสารละลายที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.6 ให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที } ทำ 1 รอบ
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

จากนั้นจะลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing (65 องศาเซลเซียสจากรอบแรก) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และทำปฏิกิริยาต่อดังนี้

Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที } ทำซ้ำ 23 รอบ
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์โดยแบ่ง PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะพบรอยยาวหรือแถบดีเอ็นเอในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส นำสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.5 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

3.5.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

นำแผ่นกระจก (35 x 45 เซนติเมตร) สำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาดแล้วเช็ดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอล ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังให้ทั่วด้วย bind silane [Amersham Biosciences] เพื่อทำให้เจลเกาะติดกับกระจก เช็ดกระจกแผ่นหน้า (มีลักษณะเหมือนหูกระต่าย) ให้ทั่วด้วย repel silane [Amersham Biosciences] หรือน้ำยาเช็ดกระจกรถยนต์ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 – 10 นาที เพื่อป้องกันไม่ให้เจลเกาะติดกับกระจกแผ่นหน้า ประกอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกันโดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน โดยวาง spacer ซึ่งมีความหนาประมาณ 0.35 – 0.4 มิลลิเมตร คั่นไว้ทั้ง 2 ข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น ใช้เทปกาวติดรอบด้านล่างและทั้ง 2 ข้างของกระจก เพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา แล้วจึงใช้คลิปหนีบอีกครั้งหนึ่งบริเวณด้านข้างของกระจก

3.5.2 การเตรียม polyacrylamide gel เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์

การเตรียม polyacrylamide gel เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ จะมีอัตราส่วนของ acrylamide:bisacrylamide (19:1) และ ยูเรียเข้มข้น 7.5 โมลาร์ ดังตารางที่ 3.7 โดยผสมยูเรีย น้ำกลั่น และ 5X TBE buffer (445 mM Tris-borate, 445 mM boric acid, 10 mM EDTA) ในบีกเกอร์ที่ปิดด้วยฟิล์มใสห่ออาหารเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ให้ความร้อนจนยูเรียหลอมละลายหมดโดยใช้ไมโครเวฟ ประมาณ 5 – 10 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 30% acrylamide (19:1), 10% APS (ammonium persulfate) และ TEMED (N,N,N’,N’-tetramethylenediamine) เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม โดยวางกระจกด้านบนให้เอียงทำมุมประมาณ 30 องศากับแนวระนาบ เสียบหวีลงในช่องด้านบนของกระจก จากนั้นปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 5 ชั่วโมง หรือถ้าจะทิ้งเจลไว้ข้ามคืนควรใช้แผ่นฟิล์มใสห่ออาหารปิดด้านบนของกระจก เพื่อรักษาความชื้น

ตารางที่ 3.7 ปริมาณสารที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกระจกขนาด 35 x 45 เซนติเมตร

ส่วนประกอบ	ปริมาตร
ยูเรีย	22.5 กรัม
น้ำกลั่น	12.5 มิลลิลิตร
5X TBE buffer	10 มิลลิลิตร
30% acrylamide (19: 1)	10 มิลลิลิตร
10% APS	0.5 มิลลิลิตร
TEMED	20 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	**50 มิลลิลิตร**

3.5.3 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ก่อนนำมาใช้จะทำการล้างกระจกด้านนอกให้สะอาดแล้วจึงดึงหวีและแกะเทปกาวออก ระหว่างดึงหวีออกต้องค่อยๆ ดึงระวังอย่าให้เจลที่อยู่ระหว่างช่องหวีขาด จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส EC 160 DNA SEQUENCING [E–C APPARATUS CORPORAT] แล้วเติม 0.5X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่างของของชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก แล้วต่อสายเข้ากับตัวเครื่องทำการ pre-run ก่อนโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 1,000 โวลต์ประมาณ 45 นาที หลังจากปิดเครื่องแล้วใช้เข็มฉีดยาดูด 0.5X TBE buffer และใช้เข็มฉีดยาฉีด buffer ลงในช่องหวีแต่ละช่องเพื่อไล่ยูเรียที่อยู่ในช่องหวีออกให้หมด ทำให้สามารถหยอดตัวอย่างดีเอ็นได้เต็มช่องหวี จากนั้นเตรียมตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอกับ formamide loading buffer (98% formamide, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromophenol blue, 10 mM 0.5 M EDTA pH 8.0) ในอัตราส่วนสารละลายดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตรต่อ formamide loading buffer 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มใน heating box ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้ได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวและเป็นการทำลาย secondary structure ของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที นำตัวอย่างสารละลายผสมของดีเอ็นเอที่ได้หยอดลงในแต่ละช่องหวีด้วยไมโครปิเปต และหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน [25 bp DNA ladder marker ของ Invitrogen] ที่ทำการผสมกับ formamide loading buffer แล้วลงในช่องหวีช่องแรกและช่องสุดท้าย เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ แล้วจึงเปิดเครื่องโดย

3.5.4 การย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างในถาดที่มีน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยหงายด้านที่มีเจลติดอยู่ขึ้นด้านบนเสมอ ระวังอย่าทำให้เนื้อเจลลอกหรือถลอก เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสี xylene cyanol จะจางหายไป นำแผ่นกระจกย้ายมาแช่ในถาดที่มีสารละลาย CTAB เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ 1 ลิตร เขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำแผ่นกระจกย้ายมาแช่ในถาดที่มีสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 ลิตร ที่เตรียมใหม่ๆ เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำแผ่นกระจกย้ายมาแช่ในถาดที่มีสารละลายซิลเวอร์ในเตรทที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 20 นาที จึงย้ายแผ่นกระจกมาแช่ในถาดน้ำกลั่น 1 ลิตรอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำแผ่นกระจกย้ายมาแช่ในสารละลาย developer (2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde) ที่เตรียมใหม่ 1 ลิตร ซึ่งแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ อย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 5 – 25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน จากนั้นนำแผ่นกระจกย้ายมาแช่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร อย่างรวดเร็วเพื่อหยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำขึ้นมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.6 การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาทั้งหมด 47 สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคเอเอฟเอลพีมาทำการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างไหนมีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์ “1” ถ้าไม่มีให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเหมือนและความแตกต่าง โดยใช้สูตรของ Nei และ Li (1979)[2] คำนวณหาดัชนีความเหมือนและจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA)[3] และแสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e (Rolf, 1997)[1]

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลของการศึกษา

4.1 วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวา

จากการสกัดดีเอ็นเอแตงกวาจำนวน 47 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าคู่ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แตงกวาได้ และไพรเมอร์จำนวน 49 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ และไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (ตารางที่ 4.1) เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโรลิซิสใน denaturing polyacrylamide gel จากนั้นย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในปริมาณมากและเหมาะสมต่อการศึกษาดังภาพที่ 4.1 – 4.12 จากคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้จำนวน 12 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 912 แถบ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่นำมาคิดเป็นคะแนนอยู่ในช่วง 50 คู่เบสถึง 500 คู่เบส (เทียบขนาดจาก ดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder) เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันของตัวอย่างจำนวน 575 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวน 337 แถบ โดยพบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ให้ค่าโพลีมอร์ฟิซึมเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยมีดังต่อไปนี้ คู่ E-ACT / M-CAG, คู่ E-AAG / M-CAA, คู่ E-ACC / M-CAT, คู่ E-AGG / M-CAG, คู่ E-AAC / M-CTT, คู่ E-AAG / M-CAC, คู่ E-ACG / M-CAG, คู่ E-ACT / M-CAA, คู่ E-AGG / M-CAC, คู่ E-AGC / M-CAT, คู่ E-ACC / M-CTG และ คู่ E-AGG / M-CAA ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเกิดแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 47 – 122 แถบ ต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์ คิดเป็นค่าเฉลี่ยได้เท่ากับ 76 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เมื่อคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (percentage of polymorphic bands) จะมีค่าเท่ากับ 63.05 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบและไพรเมอร์ที่คัดเลือกสำหรับแตงกวา

คู่ไพร์เมอร์	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
E-AAG	✓	✓	O	✗	✗	✗	✗	✗
E-ACA	✗	O	✗	✗	✗	✗	✗	✗
E-ACC	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✗
E-ACG	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗
E-ACT	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗
E-AGC	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗
E-AGG	✓	✓	✓	✗	✗	✗	O	✗

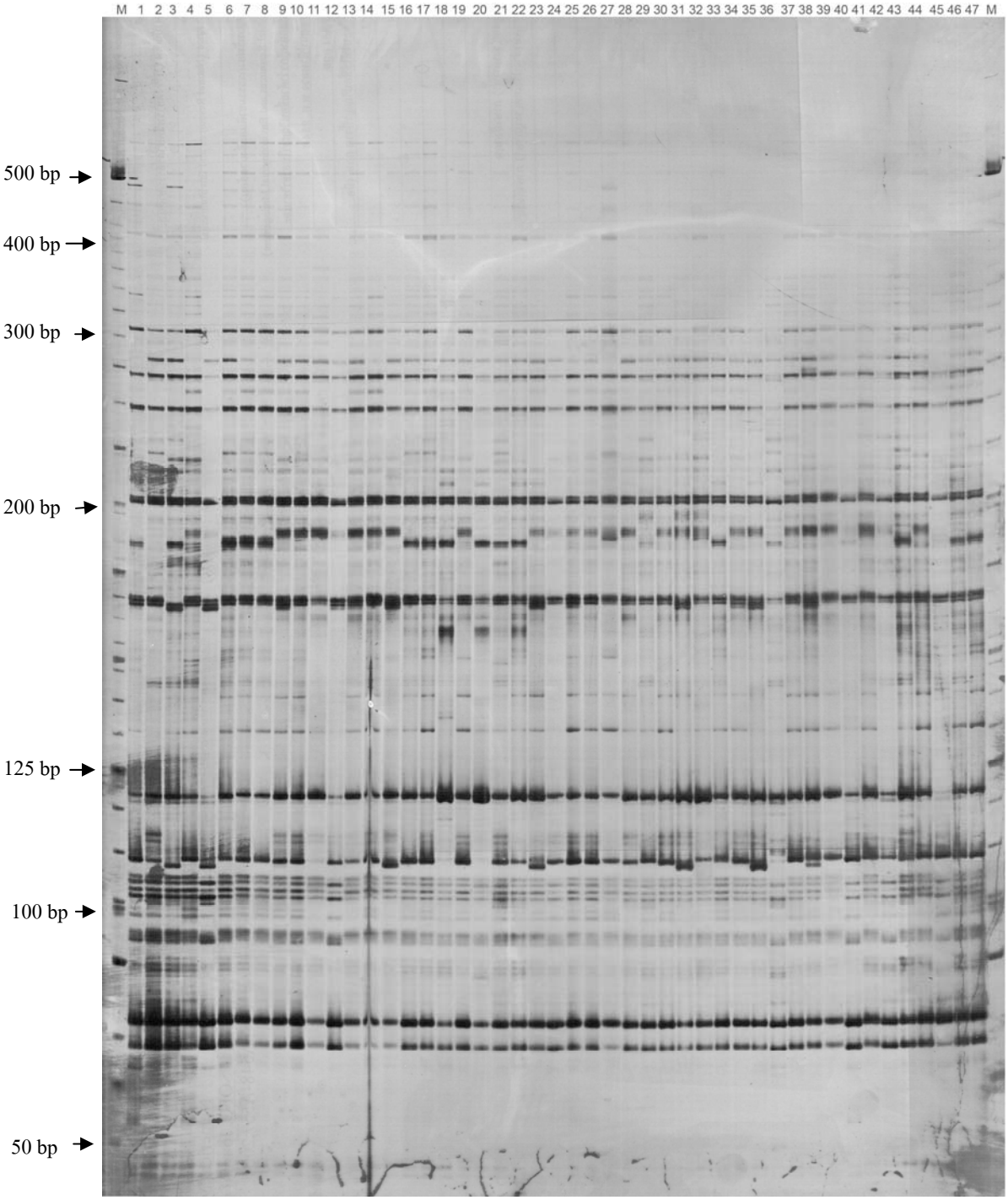
หมายเหตุ ✓ = คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และเลือกใช้ในการทดลอง

✗ = คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

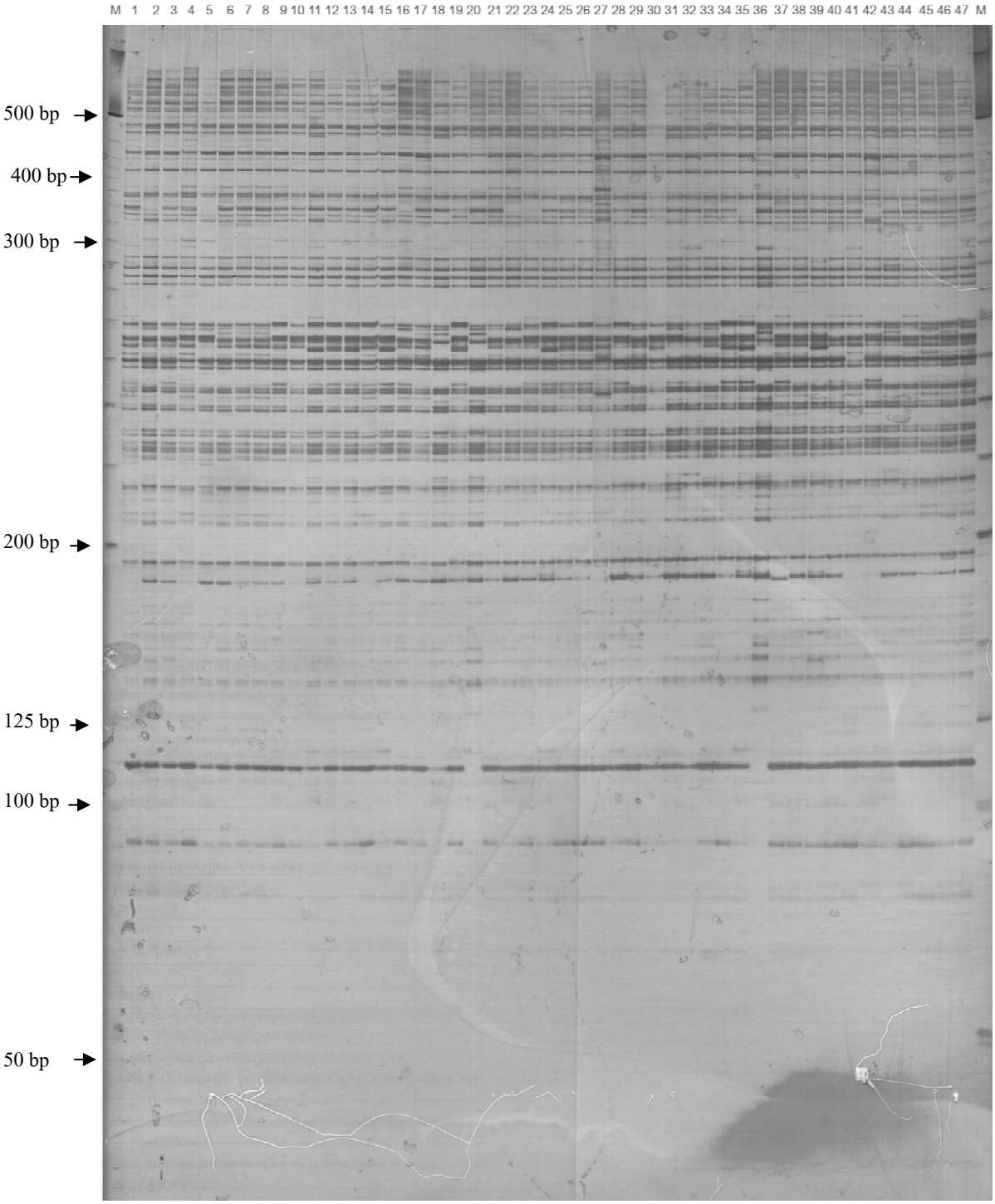
O = คู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ตารางที่ 4.2 สรุปผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของแตงกวา โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

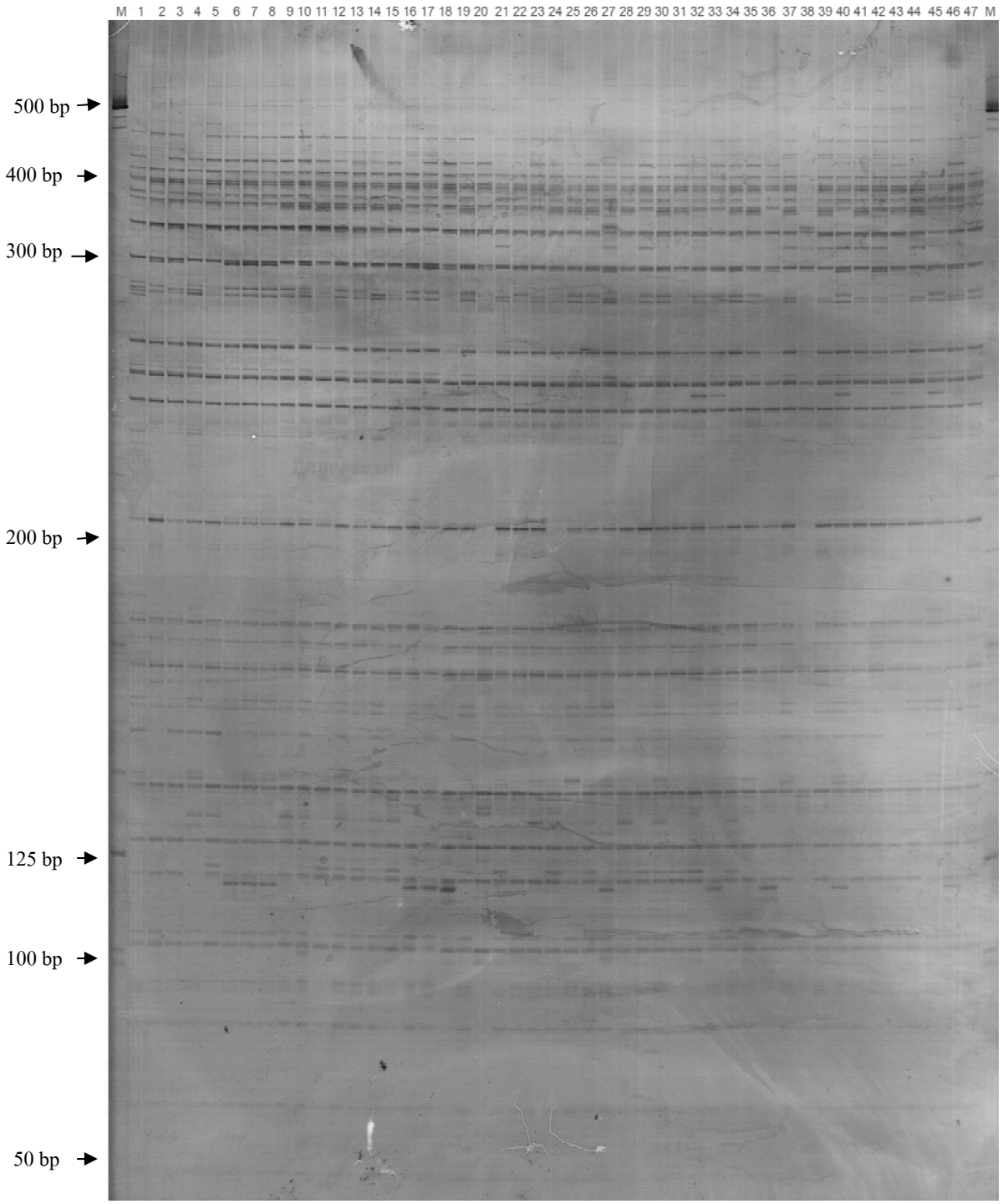
คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ polymorphism
E-ACT / M-CAG	84	16	100	84.00
E-AAG / M-CAA	81	41	122	66.39
E-ACC / M-CAT	57	17	74	77.03
E-AGG / M-CAG	53	15	68	77.94
E-AAC / M-CTT	51	47	98	52.04
E-AAG / M-CAC	44	21	65	67.69
E-ACG / M-CAG	44	35	79	55.70
E-ACT / M-CAA	36	12	48	75.00
E-AGG / M-CAC	35	44	79	44.30
E-AGC / M-CAT	35	36	71	49.30
E-ACC / M-CTG	28	33	61	45.90
E-AGG / M-CAA	27	20	47	57.45
รวม	**575**	**337**	**912**	$\bar{X}$ **= 63.05**



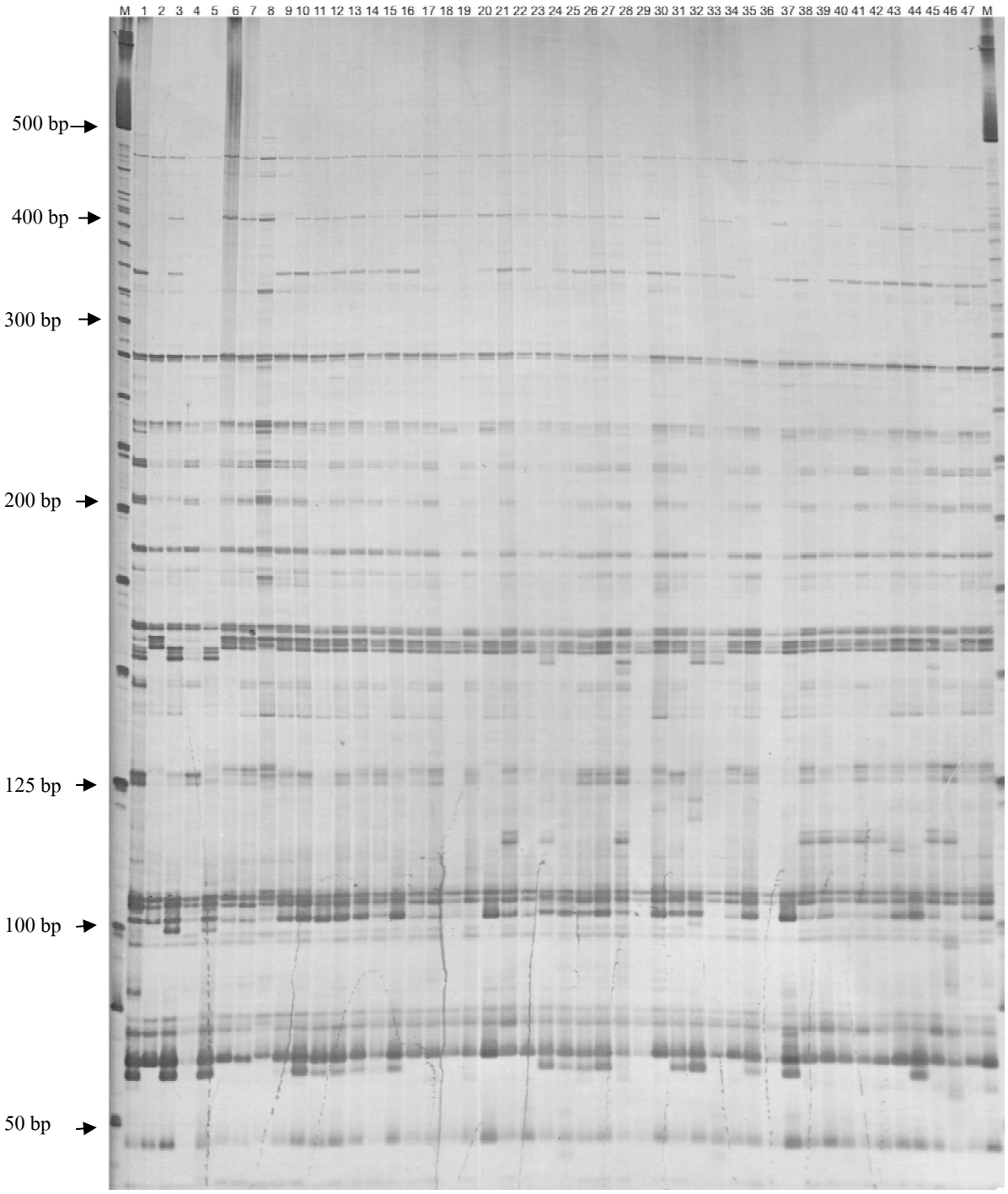
ภาพที่ 4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACT / M-CAG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



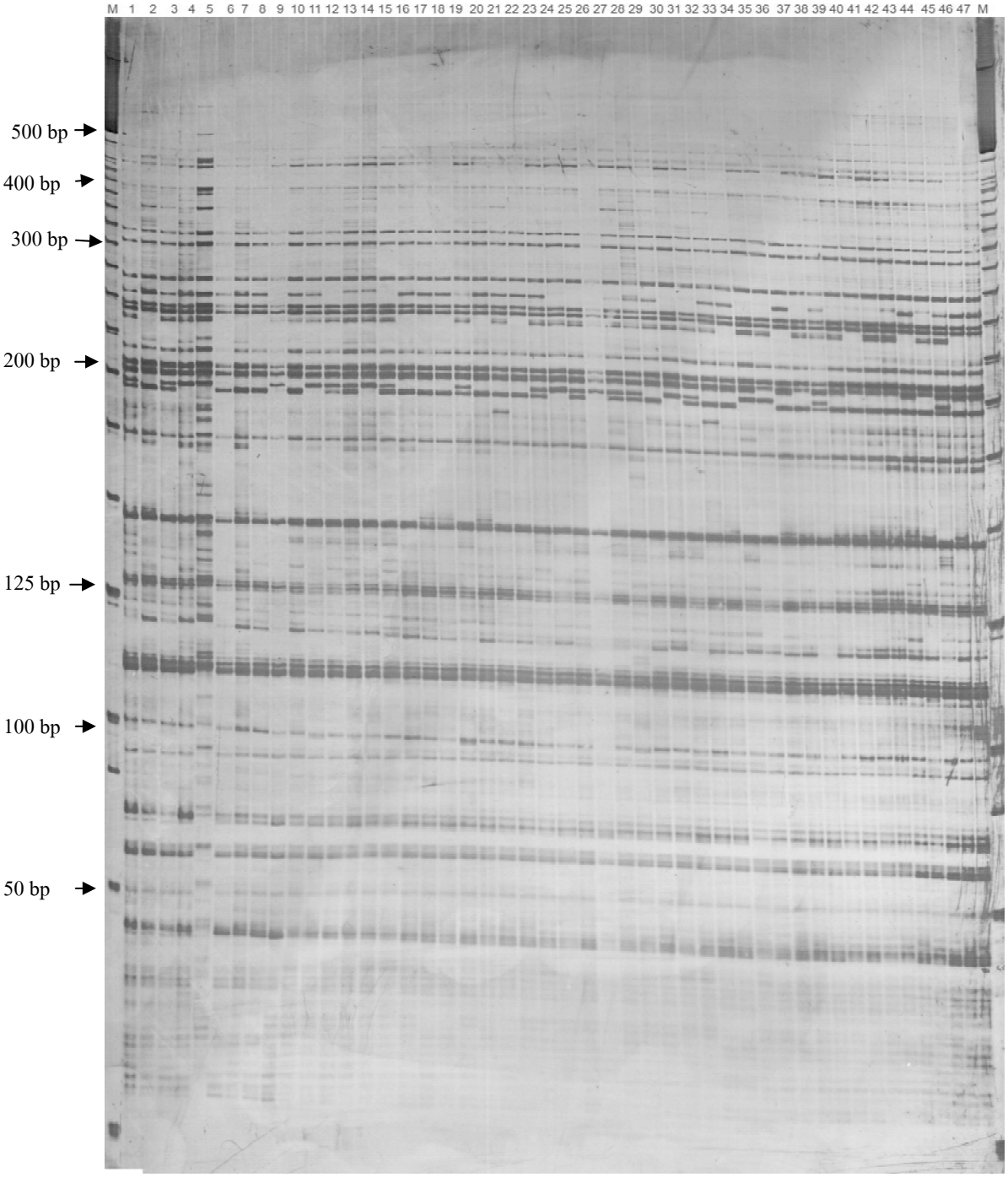
ภาพที่ 4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AAG / M-CAA หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



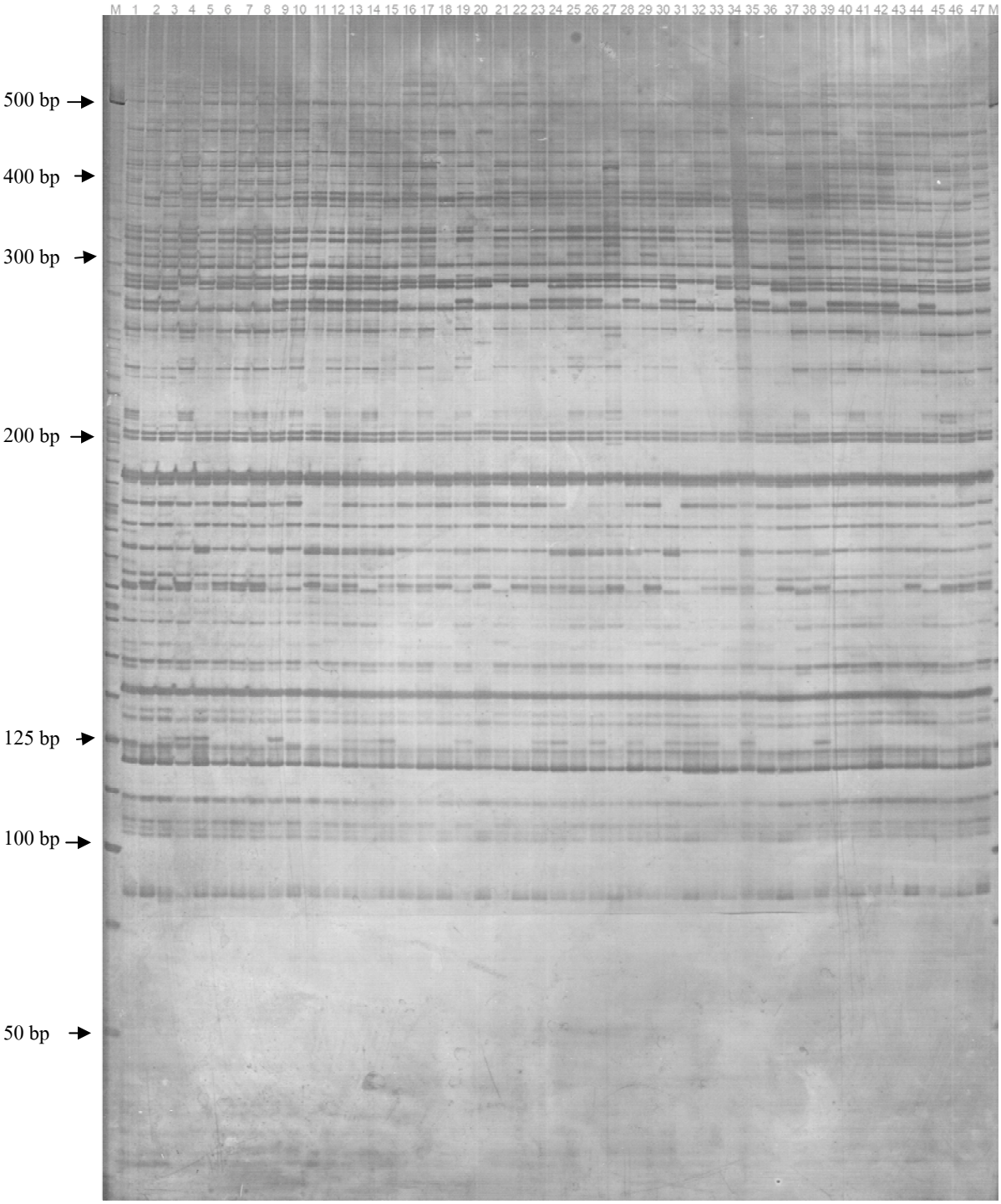
ภาพที่ 4.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACC / M-CAT หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



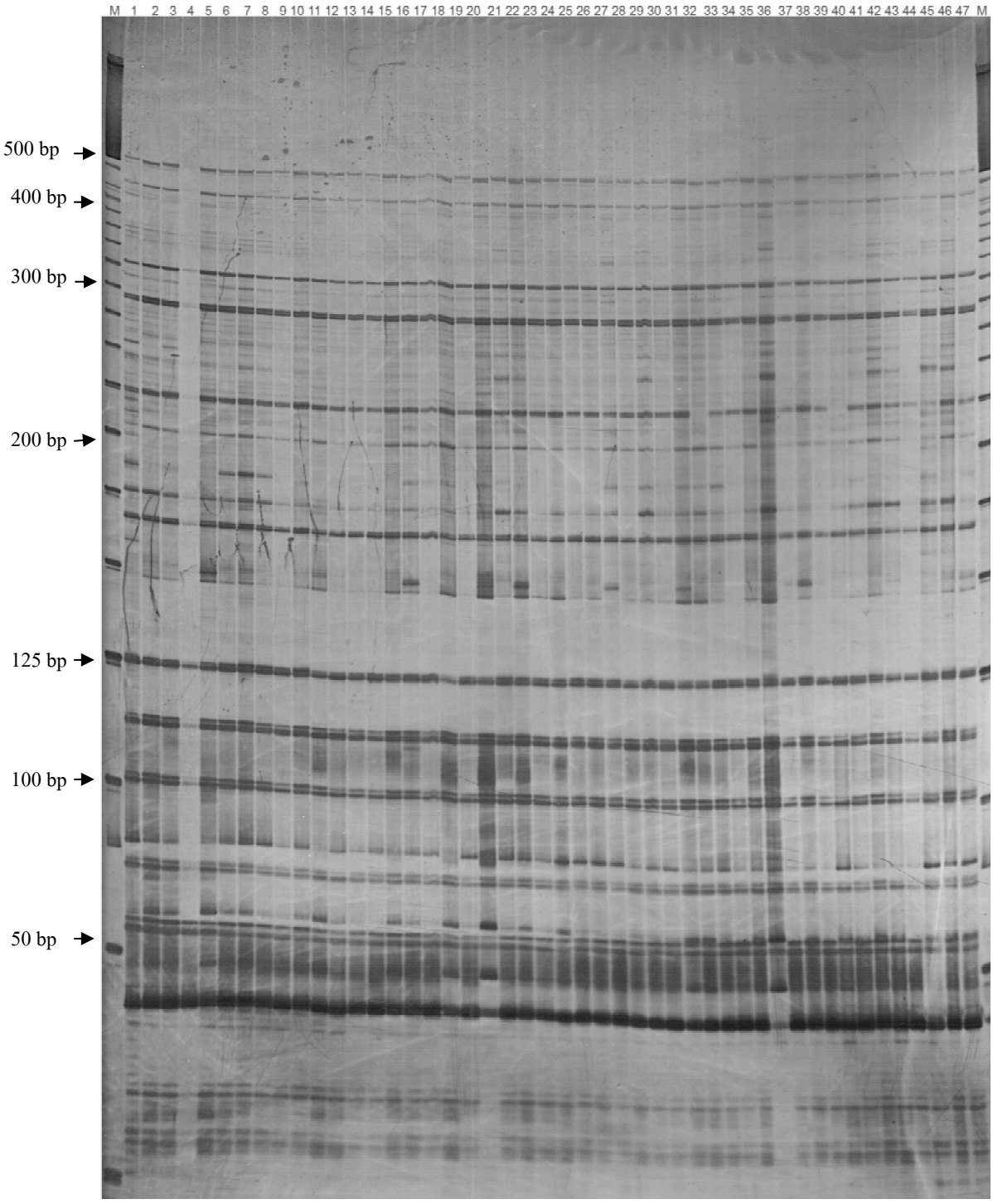
ภาพที่ 4.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGG / M-CAG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



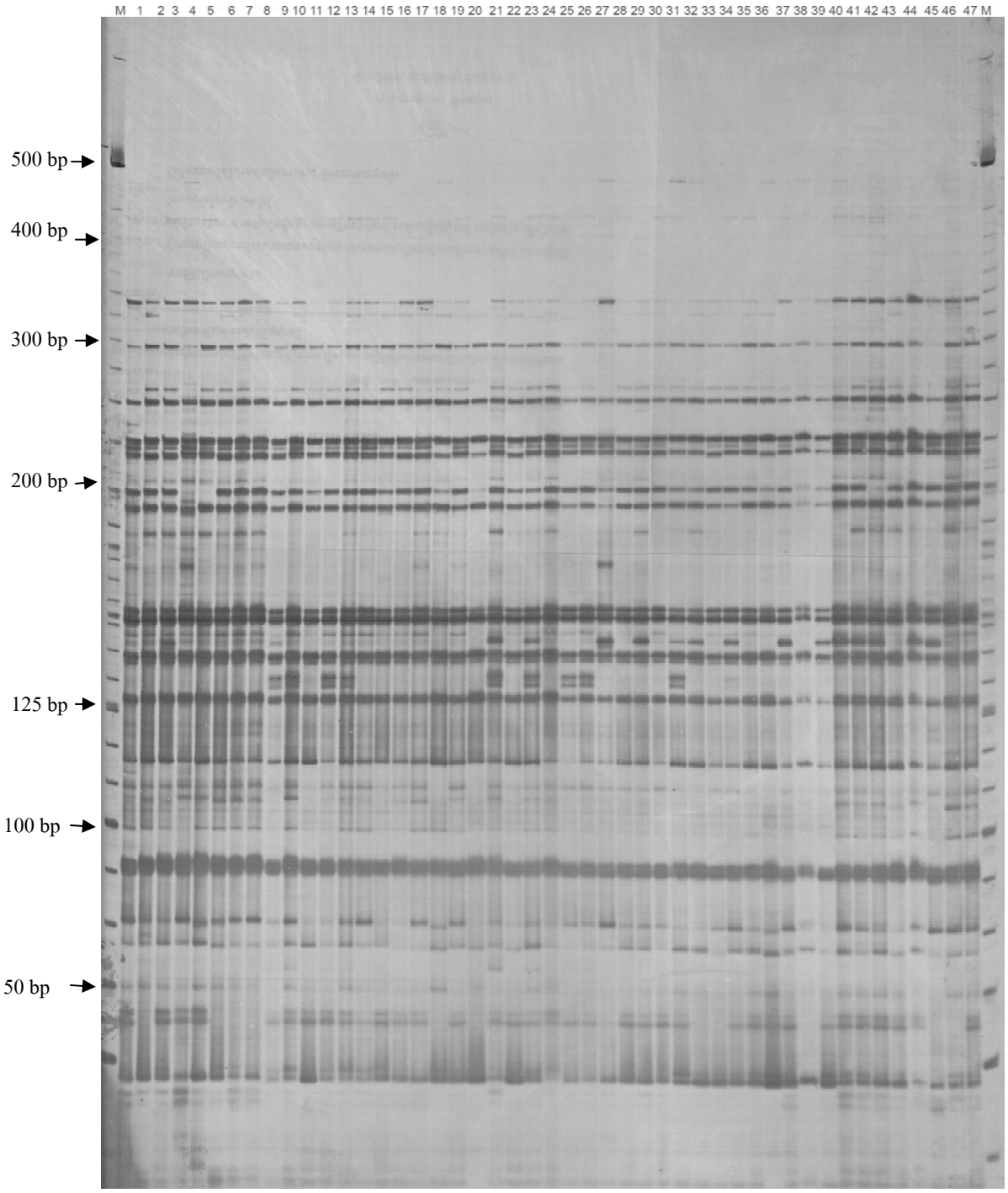
ภาพที่ 4.5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AAC / M-CTT หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



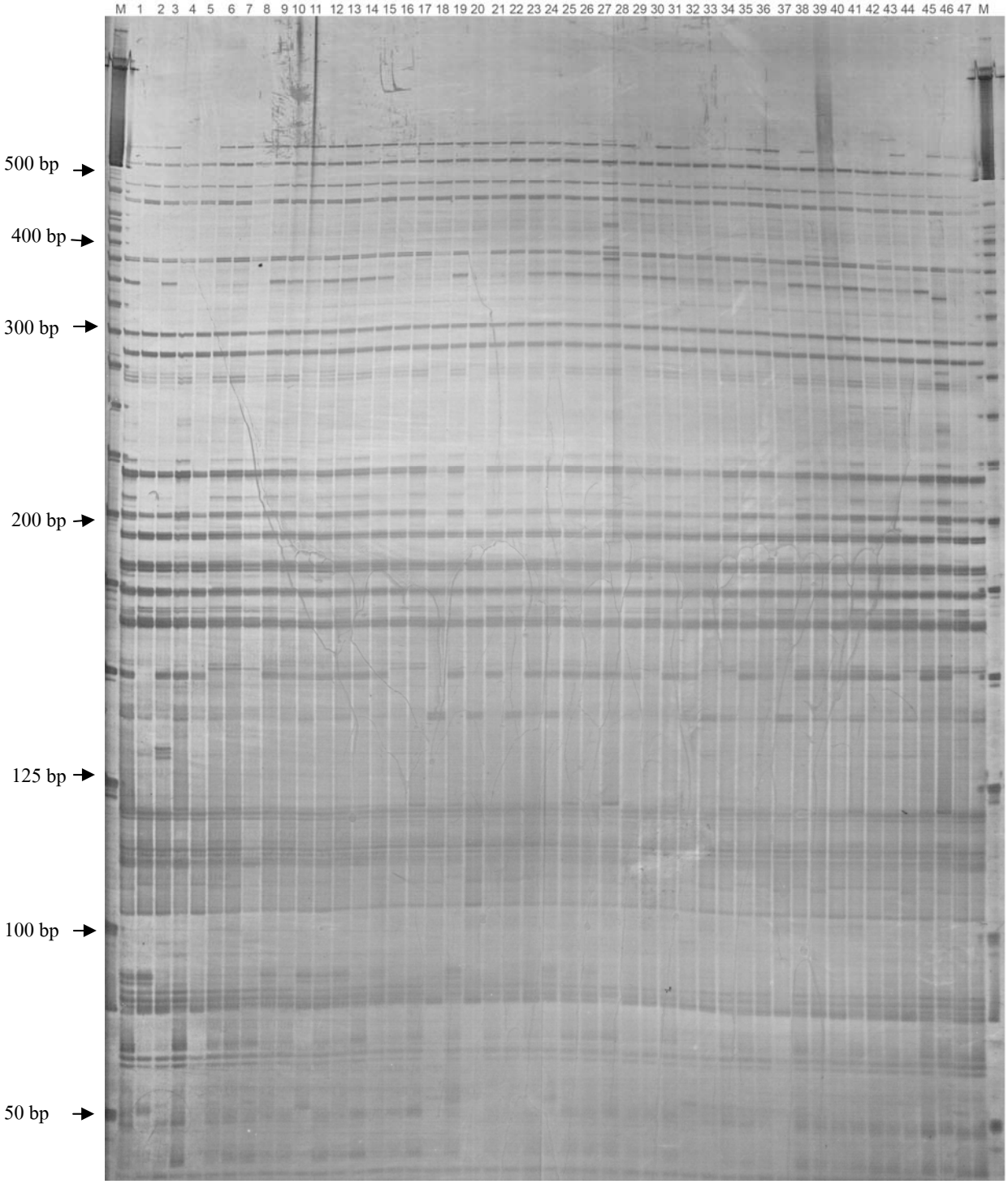
ภาพที่ 4.6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AAG / M-CAC หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



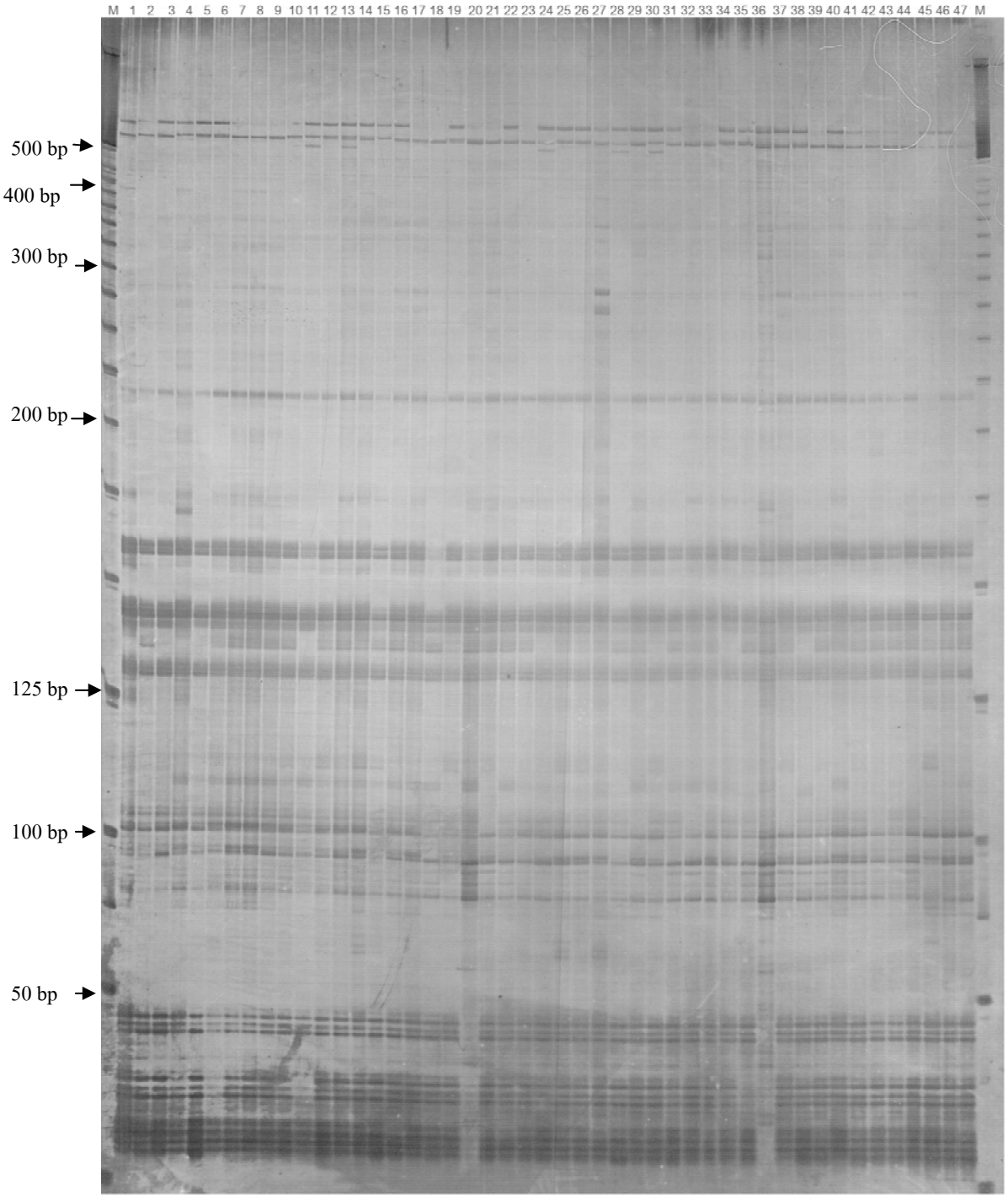
ภาพที่ 4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACG / M-CAG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



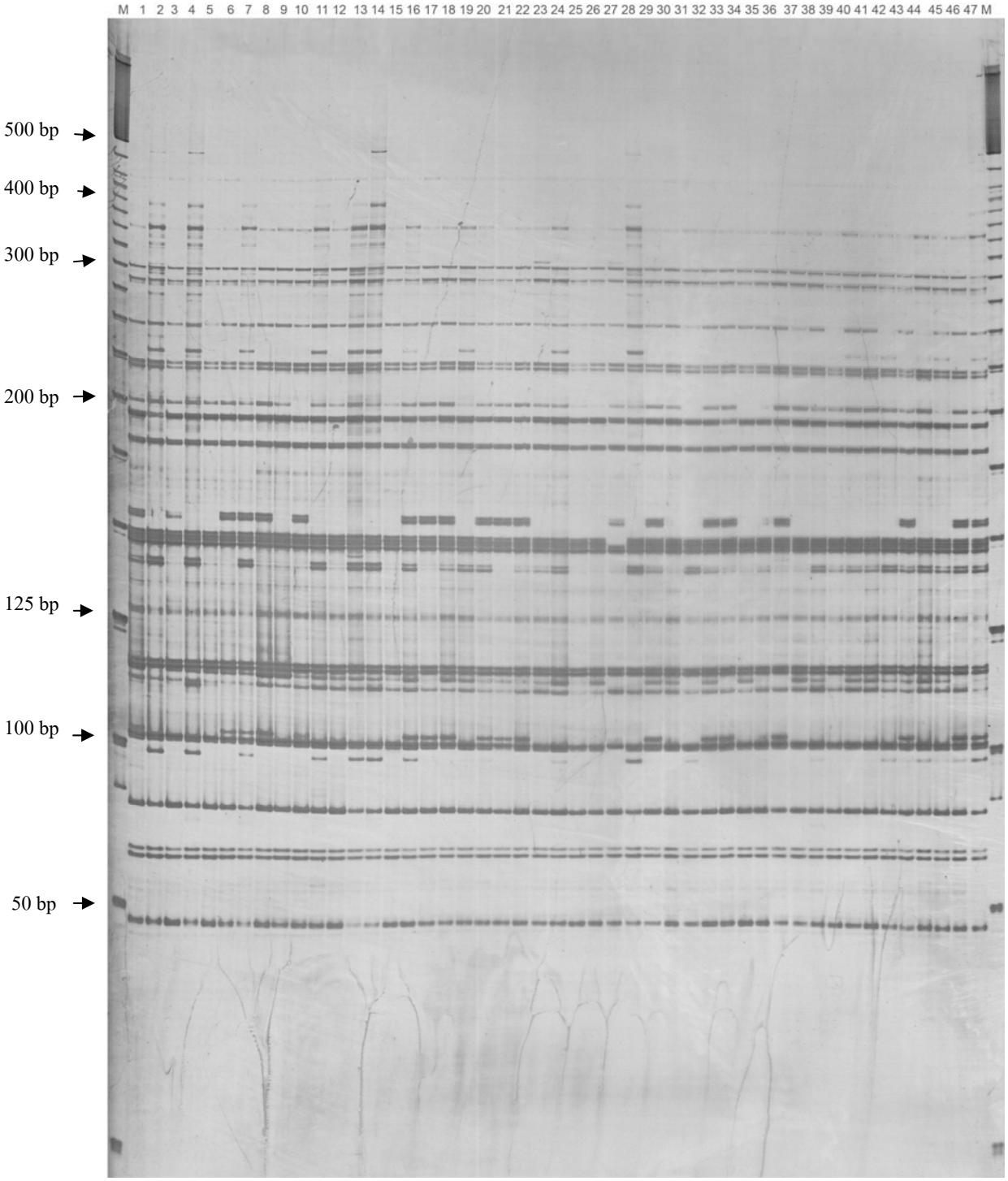
ภาพที่ 4.8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGG / M-CAC หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



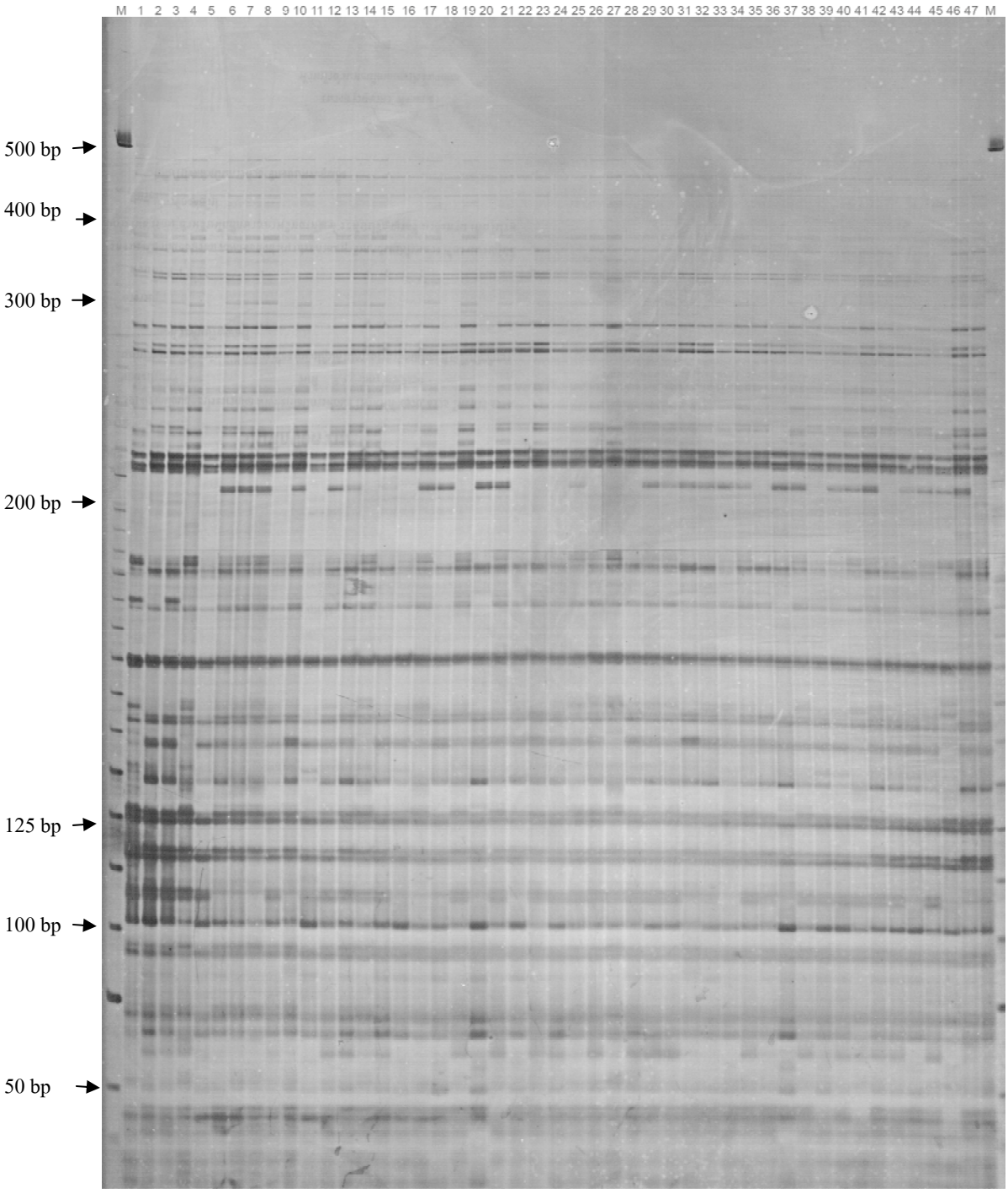
ภาพที่ 4.9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGC/M-CAT หมายเลขแสลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 4.10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGC / M-CAT หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 4.11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-ACC / M-CTG หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder



ภาพที่ 4.12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ E-AGG /M-CAA หมายเลขแสดงลำดับตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 และ M คือดีเอ็นเอมาตราฐาน 25 base pair ladder

4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแตงกวา จากการนำข้อมูลของขนาดและจำนวนแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีจากตัวอย่างทั้งหมด 47 ตัวอย่าง ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 912 แถบ จากคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 12 คู่ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 575 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 337 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ polymorphism เท่ากับ 63.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์และจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e[1] โดยใช้สูตรของ Nei and Li (1979)[2] คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ของตัวอย่างพืชทีละคู่สลับกันจนครบทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 4.3) จากนั้นนำค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบไปจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA[3] และแสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree (ภาพที่ 4.13)

ค่าดัชนีความเหมือนของแตงกวาทั้ง 47 ตัวอย่างที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 0.785 – 0.975 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มแตงกวาตัวอย่างมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างใกล้ชิดกัน โดยคู่ตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความเหมือนมากที่สุดคือตัวอย่างที่ 25 (CSL 0076) และ 26 (CSL 0080) โดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.975 แสดงว่าแตงกวาตัวอย่างที่ 25 และ 26 มีความคล้ายคลึงกันเท่ากับ 97.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อพิจารณาประวัติการผสมพันธ์และแหล่งที่มาพบว่าทั้ง 2 ตัวอย่างมีแหล่งที่มาจากประเทศไทย รวมทั้งมีพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มาจากแหล่งพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ก) ส่วนคู่ตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความเหมือนน้อยที่สุดคือตัวอย่างที่ 5 (PI 358814) และ 27 (PI 164173) โดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.785 หรือมีความคล้ายคลึงกันเท่ากับ 78.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีแหล่งที่มาจากประเทศมาเลเซียและอินเดียตามลำดับ ค่าดัชนีความเหมือนของการศึกษาในครั้งนี้มีช่วงใกล้เคียงกับรายงานของ Onto และคณะ (2008)[97] ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตงกวา 12 ตัวอย่างโดยเทคนิค RAPD ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.67 – 0.93 แต่มีช่วงที่แคบกว่าค่าที่ได้จากรายงานของ Milki และคณะ (2001)[79] ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาแอฟริกาทั้งหมด 26 ตัวอย่างโดยเทคนิค RAPD ซึ่งค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาตัวอย่างที่ได้อยู่ในช่วง 0.41 – 0.97 โดยค่าความต่างที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาของ Milki และคณะนั้นได้นำตัวอย่างแตงกวาป่า (*C. sativus* var. *hardwickii*) และลูกผสมแตงกวาป่ามาทำการศึกษาด้วย ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างมากกว่าการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้แล้วยังพบผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวา (*Cucumis sativus*) โดยอาศัยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์อื่นๆ (isozyme, RFLP และ RAPD) ที่แสดงว่า *C. sativus* var. *sativus* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ *C. sativus* var. *hardwickii* [54, 61, 82]

เมื่อนำตัวอย่างแตงกวาทั้ง 47 ตัวอย่างมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ตาม phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 4.13) โดยทั้ง 4 กลุ่มมีความสัมพันธ์กันที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.820 โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 6, 7 และ 8 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในกลุ่มเท่ากับ 0.867 ซึ่งตัวอย่างภายในกลุ่มที่ 1 ทั้งหมดเป็นสายพันธุ์แตงกวาที่มีค่าความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูง และเป็นสายพันธุ์ที่มีแหล่งที่มาจากประเทศอินเดีย มาเลเซีย ไต้หวัน ปากีสถาน และจีน ซึ่งเป็นประเทศในแถบทวีปเอเชียทั้งหมด

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 และ 47 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีตัวอย่างที่มีระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างทั้งสูง ปานกลาง และต่ำ โดยที่ตัวอย่างส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาจากประเทศในทวีปเอเชียโดยเฉพาะประเทศไทยมีถึง 17 ตัวอย่าง และมีเพียง 2 ตัวอย่างที่มาจาก United State of America และ Yugoslavia มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในกลุ่มเท่ากับ 0.857

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 18, 20 และ 36 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในกลุ่มเท่ากับ 0.866 ซึ่งตัวอย่างภายในกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างที่มีค่าความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับปานกลาง 2 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 18 และ 20 ส่วนตัวอย่างที่ 36 มีค่าความต้านทานโรคราน้ำค้างในระดับต่ำ แหล่งที่มาของตัวอย่างในกลุ่มนี้ได้แก่ ประเทศไทย ญี่ปุ่น และ จีน ตามลำดับ และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยตัวอย่างเพียงหนึ่งตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 5 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูง และมีแหล่งที่มาจากประเทศมาเลเซีย ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนในกลุ่มเท่ากับ 0.820

จาก phylogenetic tree ที่ได้พบว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 และ 2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกลุ่มเท่ากับ 0.851 และกลุ่มถัดมาได้แก่กลุ่มที่ 3 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 0.841 ส่วนแตงกวาตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 มีค่าความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแตงกวาตัวอย่างอีก 3 กลุ่มน้อยที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.820 นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลการจัดกลุ่มจาก phylogenetic tree ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา (ตารางที่ ก2 ภาคผนวก ก) และแหล่งที่มาของกลุ่มตัวอย่างแตงกวาทั้ง 47 ตัวอย่างที่ได้รับมาจากจากสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา พบว่าไม่มีการแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจนตามลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาหรือตามแหล่งที่มา แต่การแบ่งกลุ่มมีความสอดคล้องตามแหล่งที่มาและประวัติของการผสมพันธุ์ โดยจะสังเกตได้ว่าตัวอย่างแตงกวาบางส่วนที่มีค่า

ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันจะมีแหล่งที่มาจากภูมิศาสตร์ที่ใกล้เคียงกัน เช่น ตัวอย่างแตงกวาในกลุ่มที่ 3 (ประเทศไทย ญี่ปุ่น และจีน) และตัวอย่างแตงกวาในกลุ่มที่ 1 (ประเทศอินเดีย มาเลเซีย ไต้หวัน ปากีสถาน และจีน) โดยเฉพาะแตงกวาตัวอย่างที่มีแหล่งที่มาจากประเทศไทยจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 เกือบทั้งหมด ยกเว้นตัวอย่างที่ 18 (CSL 0068) ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งเมื่อพิจารณาตามประวัติการผสมพันธุ์พบว่าตัวอย่างแตงกวาที่มาจากประเทศไทยส่วนใหญ่มาจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีแหล่งพันธุ์กรรมใกล้เคียงกัน (ตารางที่ ก1 ภาคผนวก ก)

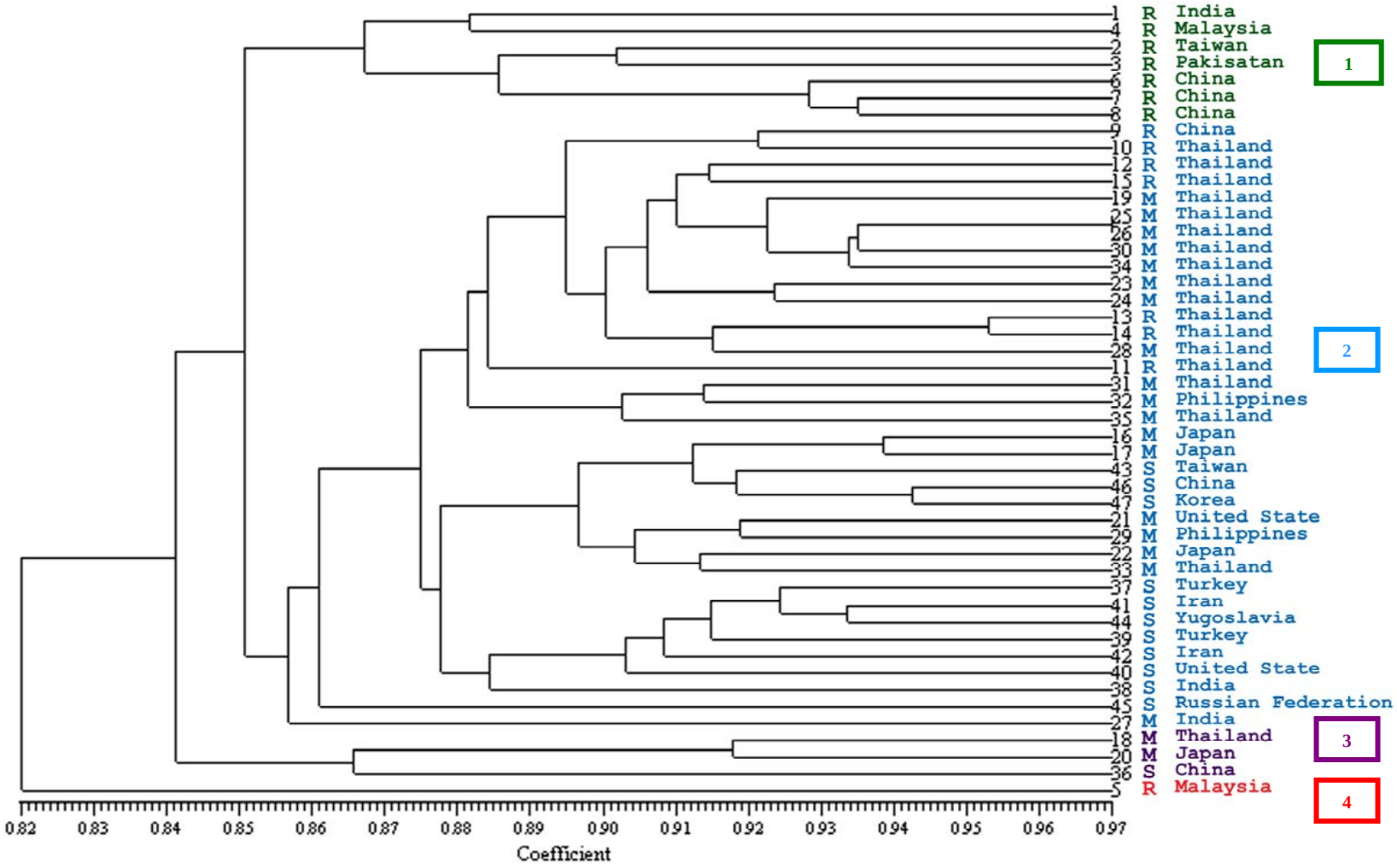
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบ phylogenetic tree ที่ได้กับระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างที่แบ่งออกเป็นสายพันธุ์แตงกวาที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูง (R) 15 ตัวอย่าง ต้านทานในระดับปานกลาง (M) 20 ตัวอย่าง และต้านทานได้ในระดับต่ำระดับต่ำ (S) 12 ตัวอย่าง ก็ไม่พบการแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจนระหว่างตัวอย่างแตงกวาตามระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง รวมถึงเมื่อตรวจสอบจากลายพิมพ์ AFLP ที่ได้ก็ไม่พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ (MAS: marker assisted selection) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูงและระดับต่ำได้เช่นกัน แต่จากผลการศึกษาของ Horejsi และคณะ (2000)[38] ได้รายงานว่าพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูงและต่ำได้โดยอาศัยเทคนิค RAPD (960 ไพรเมอร์)ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (*dm* gene) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการวิจัยที่พบเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษา เช่น การศึกษาของ Witkowicz และคณะ (2003)[98] รายงานว่าพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของการแสดงออกของเพศดอกในต้นแตงกวาด้วยคู่ไพรเมอร์ *Eco* RI และ *Mse* I รวมทั้งหมด 56 คู่ไพรเมอร์ และการศึกษาของ Su-qin และคณะ (2007)[99] ได้รายงานว่าพบเครื่องหมายดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่ง (E25/M63-103) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราแป้ง (powdery mildew) และสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานจากคู่ไพรเมอร์ *Eco* RI และ *Mse* I รวมทั้งหมด 256 คู่ไพรเมอร์ เป็นต้น และเมื่อพิจารณาเฉพาะตัวอย่างแตงกวาที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูง พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่กลุ่มที่ 1, 2 และ 4 โดยกลุ่มที่ 1 มีตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 6, 7 และ 8 มีแหล่งที่มาจากประเทศอินเดีย มาเลเซีย ไต้หวัน ปากีสถาน และจีน มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่มอยู่ระหว่าง 0.842 – 0.938 กลุ่มที่ 2 มีตัวอย่างแตงกวาที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูง 7 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่ 9, 10, 11, 12, 13, 14 และ 15 ซึ่งมีแหล่งมีมาจากประเทศจีนและไทย มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่มอยู่ระหว่าง 0.876 – 0.957 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 5 เพียงตัวอย่างเดียว

ซึ่งมีแหล่งที่มาจากประเทศมาเลเซีย มีค่าดัชนีความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 กลุ่มเท่ากับ 0.820

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดจำแนกกลุ่มแตงกวาตัวอย่างที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ เนื่องจากผลของ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าแหล่งพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งสามกลุ่มนั้นแตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 คาดว่าน่าจะมีแหล่งพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกลุ่มอยู่ที่ 0.851 ส่วนกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 5 เพียงตัวอย่างเดียว พบว่าตัวอย่างนี้มีแหล่งพันธุกรรมที่แตกต่างออกมาจากกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อย่างชัดเจน โดยมีค่าสัมประสิทธ์ความเหมือนระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 อยู่ที่ 0.820 ซึ่งตัวอย่างที่ 5 (PI 358814) นี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการนำไปปรับปรุงพันธุ์จากฐานพันธุกรรมที่แตกต่างออกจากกลุ่มตัวอย่างที่ 1 และ 2 เป็นอย่างมาก โดยสามารถเลือกตัวแทนแตงกวาที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างมากที่สุดในแต่ละกลุ่มมาผสมพันธุ์ระหว่างกลุ่มเพื่อสร้างประชากรใหม่ที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้มากยิ่งขึ้น รวมไปถึงการพัฒนาเพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโดยเทคนิค AFLP เพื่อประโยชน์ในการรวบรวมสายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ตารางที่ 4.3 ค่า Similarity Index ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือนกันของแถบดีเอ็นของแตงกวา

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
1	1.000																																														
2	0.857	1.000																																													
3	0.895	0.904	1.000																																												
4	0.883	0.888	0.863	1.000																																											
5	0.843	0.846	0.860	0.818	1.000																																										
6	0.864	0.883	0.908	0.842	0.846	1.000																																									
7	0.866	0.903	0.885	0.882	0.835	0.937	1.000																																								
8	0.869	0.863	0.880	0.852	0.822	0.926	0.938	1.000																																							
9	0.849	0.853	0.883	0.864	0.834	0.866	0.868	0.896	1.000																																						
10	0.855	0.853	0.879	0.848	0.826	0.879	0.873	0.895	0.924	1.000																																					
11	0.820	0.837	0.841	0.826	0.828	0.820	0.826	0.823	0.885	0.884	1.000																																				
12	0.854	0.842	0.869	0.830	0.844	0.850	0.840	0.857	0.904	0.903	0.893	1.000																																			
13	0.836	0.866	0.857	0.877	0.815	0.842	0.875	0.857	0.893	0.897	0.889	0.922	1.000																																		
14	0.845	0.868	0.860	0.893	0.808	0.839	0.880	0.862	0.894	0.895	0.876	0.909	0.957	1.000																																	
15	0.841	0.838	0.872	0.822	0.843	0.848	0.838	0.850	0.894	0.899	0.897	0.917	0.907	0.891	1.000																																
16	0.832	0.863	0.873	0.834	0.808	0.893	0.899	0.893	0.873	0.888	0.854	0.857	0.871	0.875	0.883	1.000																															
17	0.841	0.851	0.868	0.840	0.797	0.906	0.902	0.904	0.878	0.897	0.831	0.863	0.865	0.872	0.866	0.942	1.000																														
18	0.800	0.826	0.845	0.786	0.801	0.861	0.840	0.844	0.819	0.840	0.840	0.817	0.815	0.811	0.848	0.874	0.870	1.000																													
19	0.853	0.854	0.868	0.860	0.822	0.863	0.859	0.869	0.900	0.902	0.876	0.909	0.910	0.911	0.901	0.893	0.905	0.836	1.000																												
20	0.809	0.808	0.827	0.778	0.794	0.834	0.817	0.829	0.816	0.838	0.841	0.824	0.813	0.814	0.843	0.868	0.849	0.920	0.831	1.000																											
21	0.856	0.852	0.876	0.839	0.806	0.870	0.867	0.875	0.872	0.891	0.840	0.867	0.869	0.871	0.878	0.901	0.908	0.851	0.903	0.858	1.000																										
22	0.830	0.850	0.871	0.818	0.832	0.882	0.872	0.877	0.868	0.879	0.853	0.852	0.853	0.851	0.889	0.927	0.900	0.895	0.886	0.901	0.910	1.000																									
23	0.832	0.846	0.869	0.839	0.846	0.844	0.842	0.851	0.888	0.891	0.879	0.895	0.890	0.877	0.912	0.878	0.878	0.857	0.910	0.856	0.900	0.908	1.000																								
24	0.833	0.839	0.855	0.826	0.843	0.832	0.833	0.841	0.882	0.883	0.909	0.903	0.893	0.889	0.917	0.873	0.862	0.840	0.907	0.851	0.877	0.892	0.926	1.000																							
25	0.852	0.844	0.868	0.849	0.817	0.849	0.851	0.869	0.919	0.905	0.877	0.920	0.915	0.917	0.912	0.887	0.897	0.831	0.935	0.831	0.901	0.886	0.912	0.917	1.000																						
26	0.847	0.846	0.871	0.849	0.812	0.847	0.842	0.867	0.916	0.902	0.877	0.922	0.910	0.911	0.912	0.879	0.886	0.827	0.931	0.825	0.896	0.877	0.909	0.914	0.975	1.000																					
27	0.842	0.810	0.830	0.822	0.785	0.830	0.843	0.856	0.850	0.847	0.809	0.857	0.852	0.857	0.847	0.854	0.874	0.786	0.875	0.798	0.871	0.845	0.870	0.850	0.888	0.881	1.000																				
28	0.810	0.867	0.842	0.860	0.821	0.819	0.848	0.828	0.871	0.864	0.896	0.883	0.920	0.916	0.900	0.873	0.855	0.833	0.906	0.830	0.857	0.874	0.892	0.908	0.909	0.914	0.844	1.000																			
29	0.843	0.847	0.875	0.830	0.811	0.879	0.872	0.886	0.889	0.893	0.846	0.870	0.864	0.868	0.891	0.911	0.910	0.858	0.904	0.857	0.922	0.909	0.883	0.890	0.911	0.904	0.874	0.878	1.000																		
30	0.847	0.852	0.870	0.848	0.833	0.855	0.843	0.860	0.909	0.899	0.880	0.910	0.900	0.899	0.922	0.891	0.889	0.838	0.917	0.826	0.895	0.882	0.900	0.905	0.941	0.935	0.873	0.905	0.910	1.000																	
31	0.825	0.830	0.850	0.816	0.826	0.834	0.827	0.827	0.867	0.885	0.891	0.887	0.877	0.861	0.909	0.872	0.856	0.854	0.891	0.857	0.876	0.888	0.911	0.904	0.898	0.893	0.843	0.896	0.877	0.911	1.000																
32	0.809	0.825	0.844	0.798	0.833	0.847	0.837	0.845	0.846	0.861	0.861	0.841	0.838	0.829	0.875	0.875	0.863	0.867	0.867	0.877	0.880	0.906	0.890	0.881	0.864	0.861	0.838	0.865	0.901	0.875	0.916	1.000															
33	0.835	0.854	0.863	0.824	0.820	0.884	0.874	0.877	0.873	0.883	0.857	0.864	0.857	0.862	0.884	0.905	0.910	0.871	0.893	0.874	0.896	0.916	0.881	0.882	0.899	0.889	0.850	0.869	0.911	0.897	0.881	0.898	1.000														
34	0.834	0.842	0.859	0.838	0.823	0.850	0.842	0.860	0.908	0.901	0.882	0.909	0.899	0.898	0.909	0.890	0.895	0.831	0.919	0.839	0.891	0.884	0.912	0.908	0.942	0.934	0.867	0.899	0.896	0.935	0.906	0.874	0.913	1.000													
35	0.826	0.830	0.848	0.807	0.831	0.836	0.825	0.838	0.884	0.884	0.895	0.884	0.867	0.863	0.900	0.870	0.862	0.851	0.891	0.864	0.868	0.892	0.908	0.908	0.904	0.899	0.844	0.900	0.884	0.907	0.914	0.895	0.894	0.919	1.000												
36	0.824	0.822	0.832	0.796	0.800	0.845	0.836	0.845	0.832	0.857	0.830	0.838	0.831	0.830	0.856	0.867	0.862	0.860	0.844	0.874	0.874	0.882	0.836	0.862	0.858	0.856	0.840	0.835	0.872	0.859	0.863	0.871	0.889	0.859	0.877	1.000											
37	0.849	0.840	0.853	0.847	0.804	0.854	0.851	0.868	0.898	0.883	0.860	0.885	0.875	0.877	0.877	0.877	0.889	0.829	0.898	0.833	0.888	0.871	0.887	0.872	0.912	0.904	0.883	0.861	0.888	0.900	0.865	0.862	0.889	0.916	0.879	0.865	1.000										
38	0.821	0.830	0.838	0.830	0.794	0.826	0.837	0.837	0.866	0.858	0.875	0.860	0.873	0.872	0.868	0.877	0.861	0.838	0.886	0.838	0.868	0.875	0.887	0.885	0.894	0.889	0.854	0.884	0.873	0.885	0.879	0.868	0.894	0.894	0.885	0.862	0.897	1.000									
39	0.814	0.824	0.837	0.809	0.814	0.837	0.829	0.843	0.875	0.862	0.867	0.886	0.877	0.864	0.885	0.864	0.863	0.821	0.889	0.825	0.869	0.866	0.896	0.886	0.888	0.883	0.867	0.876	0.875	0.895	0.877	0.869	0.883	0.895	0.883	0.843	0.924	0.900	1.000								
40	0.839	0.842	0.829	0.849	0.806	0.834	0.860	0.853	0.864	0.849	0.835	0.860	0.878	0.883	0.854	0.863	0.876	0.804	0.873	0.810	0.866	0.845	0.861	0.862	0.876	0.865	0.864	0.858	0.856	0.874	0.836	0.833	0.871	0.873	0.851	0.839	0.908	0.864	0.895	1.000							
41	0.839	0.861	0.867	0.856	0.824	0.863	0.870	0.862	0.895	0.888	0.861	0.877	0.896	0.895	0.884	0.884	0.892	0.844	0.904	0.836	0.894	0.884	0.902	0.882	0.902	0.894	0.860	0.881	0.891	0.897	0.874	0.866	0.890	0.904	0.887	0.861	0.936	0.886	0.921	0.916	1.000						
42	0.831	0.863	0.862	0.838	0.830	0.857	0.869	0.857	0.871	0.872	0.852	0.852	0.874	0.867	0.867	0.882	0.878	0.836	0.872	0.826	0.879	0.875	0.886	0.879	0.869	0.864	0.857	0.865	0.888	0.884	0.875	0.878	0.870	0.878	0.882	0.856	0.905	0.880	0.895	0.900	0.933	1.000					
43	0.831	0.858	0.874	0.840	0.803	0.879	0.874	0.868	0.880	0.881	0.854	0.848	0.870	0.866	0.874	0.910	0.909	0.866	0.878	0.860	0.885	0.897	0.876	0.872	0.876	0.866	0.833	0.864	0.897	0.883	0.876	0.876	0.904	0.884	0.872	0.865	0.881	0.885	0.873	0.863	0.916	0.908	1.000				
44	0.828	0.849	0.840	0.863	0.800	0.832	0.863	0.853	0.891	0.870	0.850	0.856	0.887	0.891	0.862	0.875	0.868	0.813	0.882	0.815	0.876	0.863	0.869	0.857	0.885	0.881	0.861	0.879	0.871	0.883	0.857	0.852	0.873	0.892	0.862	0.841	0.919	0.888	0.907	0.907	0.937	0.910	0.902	1.000			
45	0.844	0.850	0.831	0.857	0.792	0.842	0.868	0.850	0.841	0.846	0.816	0.843	0.859	0.869	0.840	0.881	0.879	0.810	0.869	0.824	0.865	0.848	0.852	0.845	0.874	0.864	0.856	0.851	0.860	0.857	0.833	0.830	0.864	0.861	0.835	0.830	0.874	0.859	0.858	0.896	0.893	0.875	0.874	0.886	1.000		
46	0.841	0.869	0.858	0.852	0.790	0.879	0.906	0.895	0.860	0.881	0.836	0.842	0.875	0.882	0.856	0.921	0.925	0.848	0.881	0.845	0.897	0.890	0.864	0.852	0.878	0.867	0.858	0.865	0.889	0.870	0.855	0.856	0.899	0.873	0.851	0.863	0.888	0.868	0.859	0.886	0.900	0.892	0.925	0.901	0.905	1.000	
47	0.836	0.874	0.848	0.871	0.795	0.860	0.895	0.881	0.871	0.883	0.843	0.849	0.900	0.906	0.860	0.913	0.911	0.838	0.883	0.845	0.883	0.886	0.867	0.859	0.883	0.872	0.851	0.887	0.883	0.874	0.847	0.852	0.889	0.879	0.857	0.850	0.877	0.868	0.856	0.880	0.896	0.888	0.917	0.902	0.890	0.946	1.000



ภาพที่ 4.13 การจัดกลุ่มของแตงกวาในลักษณะ phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e

บทที่ 5

สรุปผลของการศึกษาวิจัย

5.1 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแตงกวาจำนวน 47 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค AFLP จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แตงกวาได้ จำนวน 12 คู่

5.2 จากคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้จำนวน 12 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 912 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันจำนวน 575 แถบ เมื่อคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันโดยเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์ มีค่าเท่ากับ 63.05 เปอร์เซ็นต์

5.3 ค่าของดัชนีความเหมือนที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 0.785 – 0.975 โดยคู่ตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความเหมือนมากที่สุดคือตัวอย่างที่ 25 และ 26 และคู่ตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความเหมือนน้อยที่สุดคือตัวอย่างที่ 5 และ 27

5.4 เมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ตาม phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยทั้ง 4 กลุ่มมีความสัมพันธ์กันที่สัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.82 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มแตงกวาตัวอย่างมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างใกล้ชิดกัน

5.5 จากผลของ Phytlogenetic tree แสดงให้เห็นว่าแหล่งพันธุกรรมของกลุ่มแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูงนั้นแตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 นั้น คาดว่าน่าจะมีแหล่งพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกลุ่มอยู่ที่ 0.851 ส่วนกลุ่มที่ 4 ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างที่ 5 (PI 358814) เพียงตัวอย่างเดียว โดยเป็นตัวอย่างที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในประเทศมาเลเซีย และมีแหล่งพันธุกรรมที่แตกต่างออกมาจากกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อย่างชัดเจน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างอีก 2 กลุ่มอยู่ที่ 0.820

5.6 สามารถเลือกตัวอย่างแตงกวาในแต่ละกลุ่มที่มีค่าความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างมากที่สุดเป็นตัวแทนกลุ่ม (เนื่องจากภายในกลุ่มเดียวกันมีแหล่งพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก) นำไปผสมพันธุ์ระหว่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 4 เพื่อสร้างประชากรแตงกวาที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้มากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Rolf FJ. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Applies Biostatistic Inc.; 1997.
2. Sneath PHA, Sokal RR. The principals and practice of numerical classification. San Francisco: Rewwman, W.H. and Co.; 1973.
3. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Nat Acad Sci 1979; 76:5269-73.
4. FAO. Land use in horticulture and crop management. [อ้างเมื่อ 10 กุมภาพันธ์ 2551]. แหล่งที่มา: http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007.htm
5. กรมส่งเสริมการเกษตร. สถิติการปลูกพืชผักทั่วประเทศ 30/31-33/34. ฝ่ายวิเคราะห์ข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กองแผนงาน; 2536.
6. กมล เลิศรัตน์. ข้อมูลที่ควรทราบเกี่ยวกับเมล็ดพันธุ์ผักที่ใช้อยู่ในประเทศไทย. แก่นเกษตร. 2536;13(16):287-94.
7. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. ปริมาณการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม. [อ้างเมื่อ 12 ธันวาคม 2550]. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/ard/
8. Palti J, Cohen Y. Reviews of genes and linkage groups in cucumber. Hort Sci 1980; 25: 605–15.
9. จรัญ ดิษฐไชยวงศ์, รักชัย คุรุบรรเจิดจิต, สุธน สุวรรณบุตร, อเนก บางข่า, ไมตรี สุทธจิตต์, อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ. ทดสอบแตงกวาสายพันธุ์ดีต้านทานโรคราน้ำค้าง. ว. วิทย.กษ 2545; 334-5(พิเศษ): 27-30.
10. Smith OS, Lower RL, Moll RH. Estimate of heritabilities and variance components in picking cucumber. J. Am. Soc. Hort. Sci 1978; 103: 222-225.
11. เกรียงศักดิ์ สุวรรณธราดล. อุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์พืชกำลังถูกทำลาย. ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช. [อ้างเมื่อ 11 มิถุนายน 2550]. แหล่งที่มา: http://www.seed.or.th/SeedNews/vol92/9-208.htm
12. นิพนธ์ ไชยมงคล. แตงกวา. [อ้างเมื่อ 15 กุมภาพันธ์ 2550]. แหล่งที่มา http://www.agric-prod.mju.ac.th /vegetable/File_link/Cucumber.pdf

13. Jeffrey C. A review of the cucurbitaceae. Bot.T.Linnean Soc 1980; 81: 233-47.
14. Kirkbride Jr JH. Biosystematic monograph of genus *Cucumis* (Cucurbitaceae). North Carolina: Parkway Publishers; 1993.
15. สาวิตตรี ศรีพุทธา. การพัฒนาพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยเทคนิคทางด้านโรคพืชและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รายงานสหกิจศึกษาทางการเกษตร รายวิชาสหกิจศึกษาทางการเกษตร) สาขาวิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์: มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2547.
16. Weaver JE, Bruner WE. Root development of vegetable crops. New York: Mc Graw-Hill Co.,Inc; 1927.
17. Hundson TH, William J, Flooker M, Kofranek A. Plant science: growth, development, on utilization Cultivated plants. New Jersey USA: Engle wood cliffs; 1998.
18. ลำใย โกวิทยากร, การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). คณะเกษตรศาสตร์: มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2537.
19. Robinson RW, Decker-Walters DS. Cucurbits. New York: CAB International; 1999.
20. ขนิษฐา ไชยแก้ว, เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวา (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). คณะพืชสวน: มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2542.
21. จินันทา คงจิตต์, จานุลักษณ์ ขนบดี. ปฏิกิริยาการเป็นโรคราน้ำค้างของแตงกวา 4 ชุดทดสอบ (รายงานงานวิจัย). สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, 2531.
22. Van Vliet GJA, Meijsing WD. Inheritance of resistance to *Pseudoperonospora cubensis* Rost. In Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica 1974; 23: 251-55.
23. Van Vliet GJA, Meijsing WD. Relation in the inheritance of reisitance to *Pseudoperonospora cubensis* Rost and *Sphaerotheca Fuliginea* Poll. In cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica 1977; 26: 293-96.
24. Chupp C. Sherf AF. Vegetable disease and their control. New York: The Ronald press company; 1960.
25. Kucharek T. Downy mildew of cucurbits. [อ้างเมื่อ 11 ธันวาคม 2549]. แหล่งที่มา: http:// plantpath.ifas.ufl.edu/ takextpub/FactSheets/pp0002.pdf.
26. อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. ราน้ำค้าง...ผัก. [อ้างเมื่อ 25 ตุลาคม 2550]. แหล่งที่มา: http://www.doa.go. th/th/ShowArticles. aspx?id=2959

27. Shetty NV, Todd CW, Thomas CE, Dorcuchowshi RW, Shetty KPV. Evidance for downy mildew race in cucumber tested in Asia, Europe and North America. Sci Hortic-Amsterdam 2002; 94: 231-39.
28. Urban J. *Pseudoperonospora cubensis*. [อ้างเมื่อ 25 มิถุนายน 2550]. แหล่งที่มา: http://botany.upol.cz/ atlasy/system/ gallery.php?entry=Pseudoperonospora%20cubensis,
29. Rod J. *Pseudoperonospora cubensis*. [อ้างเมื่อ 25 กรกฎาคม 2550]. แหล่งที่มา: http://botany.upol.cz/atlasy/ system/gallery.php?entry=Pseudoperonospora%20cubensis
30. นพพร สายัมพล. การปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์; 2543.
31. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. สถานภาพการผลิต/การค้าและความต้องการเทคโนโลยีของธุรกิจเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทย กรณีศึกษาในกลุ่มเมล็ดพันธุ์พืชไร่และเมล็ดพันธุ์ผัก 1. ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช. 2547;1 (ม.ค.-ก.พ.):1.
32. วิสุทธ์ ใบไม้. สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.); 2538.
33. สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพคิดในระดับโลกและทำในระดับประเทศ. กรุงเทพฯ: ฝ่ายทรัพยากรชีวภาพ กองประสานการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและแผนสิ่งแวดล้อม; 2539.
34. Sudha KN, Prasannaa BM, Rathoreb RS, Settyc TAS, Kumara R, Singhd NN. Genetic analysis of resistance to sorghum downy mildew and Rajasthan downy mildew in maize (Zea mays L.). Field Crops Research, 2004; 89: 379–87.
35. สุทัศน์ ศรีวัฒนพงษ์. การปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์; 2539.
36. Holbrook CC, Noo JP, Gorbet DW, Stephenson MG. Evalution of peanut breeding lines with resistance to the peanut root-knot nematode. Crop Sci 1998; 28: 260-62.
37. Thompson JA, Nelson RL. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. Crop Sci 1998; 38:1356-62.
38. Horejsi T, Staub JE, Thomas C. Linkage of random amplified polymorphic DNA marker to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativas* L.). Euphytica 2000;115:115-13.

39. Serquen FC, Bacher J, Staub JE. Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random-amplified polymorphic DNA markers. Mol Breeding 1997; 3: 257-68.

40. Staub JE, Grumet R. Selection for multiple disease resistance reduces cucumber yield potential. Euphytica 1993; 67: 205-13.

41. วัลลภา อรุณไพโรจน์. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). [อ้างเมื่อ 20 กรกฎาคม 2550]. แหล่งที่มา: http//www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_ bc.asp?il=81 &i2=2

42. วิชัย โฆสิรัตน์. ดีเอ็นเอเครื่องหมายและลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับงานวิจัยด้านโรคพืช. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาพิเศษอณูชีววิทยาทางโรคพืช ครั้งที่ 2 เรื่องการใช้เครื่องหมายโมเลกุลและลายพิมพ์ดีเอสำหรับงานวิจัยด้านโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2541.

43. ศิราวุท กลิ่นบุหงา. Phylogenetics และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต. ชีวสารสนเทศน์. กรุงเทพฯ: สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2544.

44. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟเอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545.

45. Simth FSC, Sniyh OS. Fingerprinting crop varieties. Adv. Agron 1992; 47: 85-140.

46. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology 1991; 9: 553-7.

47. Nybom H. DNA (sic) fingerprint-A useful too in fruit breeding. Euphytica 1994; 77: 59-64.

48. Asen S. Flavonoid chemical markers in poinsettia bracts. J. Amer. Soc. Hort. Sci 1979; 104: 223-26.

49. Stewart RN, Asen S, Massie DR, Norris KH. The identification of poinsettia cultivars by HPLC analysis of their flavonoid content. Biochem Syst Ecol 1979; 8:119-25.

50. Stewart RN, Asen S, Massie DR, Norris KH. The identification of poinsettia cultivars by HPLC analysis of their anthocyanin content. Biochem Syst Ecol 1979; 7: 281-87.

51. Staub JE, Serquen FC, Horejsi T, Chen J. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.): IV. An evaluation of Chinese germplasm. Genet Resour Crop Ev 1999; 46: 297-310.

52. Staub JE, Box J, Vladimir M, Horejsi TF, McCreight JD. Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining intraspecific variation in *Cucumis*. Genet Resour Crop Ev 1997; 44: 257-69.

53. Meglic V, Serauen F, Staub JE. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.): I.A reevaluation of the U.S. germplasm collection. Genet Resour Crop Ev 1996; 43: 533-46.

54. Knerr LD, Staub JE, Holder DJ, May BP. Genetic diversity in *Cucumis sativus* L. assessed by variation at 18 allozyme coding loci. Theor appl Genet 1989; 78: 119-28.

55. สุปราณี สิทธิพรม. การจำแนกและการบ่งบอกสายพันธุ์ข้าวขึ้นน้ำและข้าวไร่ *(Oryza sativa var. indica L.)* ด้วยไอโซไซม์ (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). ภาควิชาชีววิทยา: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2538.

56. วีระสิทธิ กัลยากฤต, เมทินี มาเวียง, วาสนา วงศ์ใหญ่. การใช้ไอโซไซม์ในการวิเคราะห์สายพันธุ์บริสุทธิ์ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองกาฬสินธุ์. เอกสารประการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเศรษฐศาสตร์ สาขาบริหารธุรกิจ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2549.

57. สุลักษณ์ พุทธรักษ์. การบ่งบอกสายพันธุ์ข้าวขึ้นน้ำสี่สิบสายพันธุ์ด้วยไอโซไซม์ เจลอิเล็กไตรโฟรีซิส (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). ภาควิชาชีววิทยาศาสตร์: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2539.

58. พรทิพย์ ภูมิแกดำ. การศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดด้วยเทคนิคไอโซไซม์ (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง; 2546.

59. Grant D, Shoemaker R. Molecular hybridization. In: Caetano-Anolles G, Gresshaf PM, editor. DNA markers: protocols, applications and overviews. New York: Wiley-Liss, Inc; 1997. p. 15-26.

60. Dikhuizen A, Kennard WC, Havey MJ, Staub JE. RFLP variation and genetic relationships in cultivated cucumber. Euphytica 1996; 90: 79-87.

61. Kennard WC, Poetter K, Dijkhuizen A, Meglic V, Staub JE, Havey MJ. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morpholpgical markers in narrow and wide crossed of cucumber. Theor Appl Genet 1994; 89: 42-8.

62. Casas AM, Igartua E, Valles MP, Molina-Cano JL. Genetic diversity of barley cultivars grown in Spain, estimated by RFLP, similarity and coancestry coefficients. Plant Breeding 1998; 117(5): 429–35.

63. Backes G, Hatz B, Jahoor A, Fischbeck G. RFLP diversity within and between major groups of barley in Europe. Plant Breeding 2003; 112(4): 291–99.

64. De Koeyer DL, Phillips RL, Stuthman DD. Changes in genetic diversity during seven cycles of recurrent selection for grain yield in oat, *Avena sativa* L.. Plant Breeding 1999; 118(1): 37–43.

65. Bhattachrjee R, Bramel PJ, Hash CT, Kolesnikova-Allen MA, Khairwal IS. Assessment of genetic diversity within and between pearl millet landraces. Theor Appl Genet 2002; 105: 666-73.

66. Nalini E, Bhagwat SG, Jawali N. Identification and characterization of some ITS variants from hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Sci 2007; 173(2): 262-68.

67. Bertini L, Rossi I, Zambonelli A, Amicucci A, Sacchi A, Cecchini M, et al. Molecular identification of *Tuber magnatum* ectomycorrhizae in the field. Microbiol Res 2005; 161(1): 59-64.

68. Bian Y, Yazaki S, Inoue M, Cai H. QTLs for Sugar Content of Stalk in Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Agr Sci China 2006; 5(10): 736-44.

69. Dong Y, Ogawa T, Lin D, Koh H, Kamiunten H, Matsuo M, et al. Molecular mapping of quantitative trait loci for zinc toxicity tolerance in rice seedling (*Oryza sativa* L.). Field Crop Res 2006; 96(2-3): 420-25.

70. จิราพร นิลฉวี. การศึกษาสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล Pleurotus โดยเทคนิค PCR/RFLP (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง; 2546.

71. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2543.

72. Jeffrey AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariableminisatellite region in human DNA. Nature 1985; 314: 67-73.

73. Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W. DNA fingerprinting in plant and fungi. London: CRC Press; 1995.

74. Welsh J, McCelelland M. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res 1990; 18: 7213-18.

75. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KI, Rafalski JA, tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 1990; 18: 6231-35.

76. Waugh R, Powell W. using RAPD markers for crop improvement. Trend Biotech 1992; 10: 186-91.

77. Caetano-Anolles G. Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA fingerprint using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio. Technology 1991; 9: 553-57.

78. Zhuang FY, Chen JF, Staub JE, Qian CT. Assessment of genetic relstionships among *Cucumis* ssp. By SSR and RAPD marker analysis. Plant Breeding 2004; 123: 167-72.

79. Mliki A, Staub JE, Zhangyong S, Ghorbel A. Genetic diversity in African cucumber (*Cucumis sativus* L.) provides potential germplasm enhancement. Genet Resour Crop Ev 2003; 50: 461-8.

80. Bernet GP, Bramardi S, Calvache D, Carbonell EA, Asins M. Applicability of molecular markers in the of protection of new varieties of cucumber. Plant Breeding 2003; 122: 146-52.

81. Horejsi T, Stube JE. Genetic variation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as assessed by ramdom amplified polymorphic DNA. Genet. Res. Crop Evol 1999; 46: 337-50.

82. Vos RH, Marjo B, Martin R, Theo van de L, Miranda H, Adrie F, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 1995; 23(21): 4407-14.

83. Mueller UG, Wolfenbarger LL. AFLP genotyping and fingerprint. Tree 199; 14: 389-93.

84. Vos P, Kuiper M. AFLP analysis. In Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Editor. DNA Markers. Protocal, Application, and Overviews. Wiley-Liss, Inc. New York; 1997. p. 115-31.

85. Winflield MO, Aronold GM, Cooper F, Leray M, White J, Karp A, et al. Astudy of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betuliflia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. Mol Ecol 1998; 7: 3-10.

86. Sanz-Cortes F, Parfitt DE, Romero C, Struss D, Llacer G, Badenes ML. Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. Plant Breeding 2003; 122: 173-7.

87. Schnell RJ, Olano CT,Campbell RJ, Brown JS. AFLP analysis of genetic diversity within a Jackfruit gremplasm collection. Sci Hortic-Amsterdam 2001; 91: 261-74.

88. Schnell RJ, Olano CT,Campbell RJ, Brown JS. AFLP analysis of genetic diversity within a Jackfruit gremplasm collection. Sci Hortic-Amsterdam 2001; 91: 261-74.

89. Bayazit S, Kazan K, Gulbitti S,Cevik V, Ayanoglu H, Ergul A. AFLP analysis of diversity in low chill requiring walnut (*Juglans Regia* L.) genotypes from Hatay Tukey. Sci Hortic-Amsterdam 2007; 111: 394-8.

90. Muminovic J, Melchinger AE, Lubberstedt T. Genetic diversity in cornsalad (*Valerianella locusta*) and related species as determined by AFLP markers. Plant Breeding 2004; 123: 460-6.

91. Lamote V, Loose MD, Bockstaele EV, Roldan-Ruiz I. Evaluation of AFLP marker to reveal genetic diversity in *Typha*. Aquat Bot 2005; 83: 296-309.

92. วิไลพร น้อยบุรี. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลือง [Glycine max (L.) Merrill] โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิค RAPD และ AFLP (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). สาขาวิชาพืชไร่: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง; 2547.

93. กฤษณา โกวิทวณิช. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอาหารสัตว์บางชนิดและตรวจสอบพันธุ์กลายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยรังสีโดยเทคนิค AFLP (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). สาขาพันธุศาสตร์: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2546.

94. Volk GM, Henk AD, Richards CM. Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. J Amer Soc Hort Sci 2004; 129(4): 559-69.

95. Kim MS, Moore PH, Zee F, Fitch MMM, Steiger DL, Manshardt RM, et al. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. Genome 2002; 45: 503-12.

96. จานุลักษณ์ ขนบดี, ปัทมา ศิริธัญญา, ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, จินันทา จอมดวง, ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์, สมฤดี อ้มนโต และคณะ. การสร้างประชากรพื้นฐานของแตงกวาให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง. รายงานความก้าวหน้าโครงงานวิจัย พัฒนาและวิศวกรรมครั้งที่ 2 ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา. สิงหาคม 2549. รหัสโครงการ BT-B-01PG-66-4810. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

97. Onto S, Laosat N, Suksawat W, Popluechai S, Eungwanichayapant PD, Chukeatirote E. Phylogenetic analysis of *Cucumis sativus* using RAPD molecular markers. Plant Sciences 2008; 3(1): 105-10.

98. Witkowicz J, Urbanczyk-Wochniak E, Przybecki Z. AFLP marker polymorphism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) near isogenic lines differing in sex expression. Cell Mol Biol Lett 2003; 8: 375-381.

99. Su-qin Z, Xing-fang GU, Sheng-ping Z, Zhi-rong Z. Inheritance of powdery mildew resistance in cucumber (Cucumis sativua L.) and development of an AFLP marker for resistance detection. Agricultural Sciences in China 2007; 6(11): 1336-42.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลแหล่งที่มาและสัณฐานวิทยา
ของแตงกวาตัวอย่างทั้ง 47 ตัวอย่าง

ตารางที่ ก1 ข้อมูลแหล่งที่มาของแตงกวาตัวอย่างทั้งหมด 47 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่าง	Accession	Country	Province	Name	Source	Pedigree	Disease Rating (score 0-5)
1	PI 197088	India	Assam	11763	USDA	-	1
2	PI 321009	Taiwan	-	Nanchi White Spine	USDA	-	0.5
3	PI 330628	Pakistan	-	Kshira	USDA	-	0.8
4	PI 358813	Malaysia	Kuala Lumpur	-	USDA	-	1.2
5	PI 358814	Malaysia	Kuala Lumpur	-	USDA	-	0.8
6	PI 432875	China	-	San dong si gua 101; 458	USDA	-	0.8
7	PI 432876	China	-	San dong si gua 12; 459	USDA	-	0.8
8	PI 432878	China	-	San dong si gua 127; 461	USDA	-	0.5
9	PI 432886	China	-	San dong si gua 7156; 469	USDA	-	1.2
10	CSL 0013	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	1
11	CSL 0077	Thailand	-	-	LARTC	S6[1]	1.2
12	CSL 0088	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	1.2
13	CSL 0089	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	1.2
14	CSL 0096	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	0.8
15	CSL 0097	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	0.8
16	PI 279468	Japan	-	Ochiai-fushinari, Omoroved Strain II	USDA	-	1.5

ตารางที่ ก1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	Accession	Country	Province	Name	Source	Pedigree	Disease Rating (score 0-5)
17	PI 288238	Japan	-	Yomaki Plant Ii	USDA	-	1.5
18	CSL 0068	Thailand	-	-	LARTC	Open pollinate variety	1.5
19	CSL 0092	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	1.5
20	PI 114339	Japan	-	Manchuko Wonder	USDA	-	1.8
21	PI 234517	United State	South carolina	SC50	USDA	-	1.8
22	PI 390259	Japan	-	Sagami Hanjiro (A)	USDA	-	1.8
23	CSL 0014	Thailand	-	-	LARTC	Open pollinate variety	1.8
24	CSL 0044	Thailand	-	-	LARTC	S6	1.8
25	CSL 0076	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	1.8
26	CSL 0080	Thailand	-	-	LARTC	S6	1.8
27	PI 164173	India	Maharashtra	Khira;8886	USDA	-	2
28	CSL 0022	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	2
29	PI 426170	Philippines	Luzon	UPL-Cu-2; Ca-73-21	USDA	-	2.2
30	CSL 0043	Thailand	-	-	LARTC	Open pollinate variety	2.3
31	CSL 0012	Thailand	-	-	LARTC	$S7^2$	2.4
32	PI 426169	Philippines	Luzon	UPL-Cu-1; Ca-73-19	USDA	-	2.5

ตารางที่ ก1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	Accession	Country	Province	Name	Source	Pedigree	Disease Rating (score 0-5)
33	CSL 0015	Thailand	-	-	LARTC	F1 of unknown	2.5
34	CSL 0046	Thailand	-	-	LARTC	S7	2.5
35	CSL 0067	Thailand	-	-	LARTC	Open pollinate variety	2.8
36	PI 103049	China	Beijing	Kuai Huang Kua; 12	USDA	-	4
37	PI 167223	Turkey	Icel	Hiyar;417	USDA	-	4
38	PI 175121	India	Uttar Prade	Khira; No. 10382	USDA	-	4.5
39	PI 178886	Turkey	Cankiri	9662	USDA	-	4.5
40	PI 209067	United State	Ohi	M 20	USDA	-	3.8
41	PI 211979	Iran	Weat Azerbaijar	6	USDA	-	3.5
42	PI 227013	Iran	Khuzestan	14566	USDA	-	3
43	PI 321010	Taiwan	-	Nei Wu	USDA	-	4
44	PI 357857	Yogoslavia	-	Krupna; 704	USDA	-	3.5
45	PI 466922	Russian Federation	-	M-2C	USDA	-	3.2
46	PI 478366	China	Xinjang	O 106a	USDA	-	3
47	PI 483340	Korea	South, Seoul	H.N. Semiwhite F1	USDA	-	2.8

หมายเหตุ 1; S6 หมายถึงการผสมตัวเองมาแล้ว 6 ชั่ว

2; S7 หมายถึงการผสมตัวเองมาแล้ว 7 ชั่ว

ตารางที่ ก2 ข้อมูลลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของแตงกวาตัวอย่างทั้ง 47 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่าง	Accession	ความยาวผล (ซม.)	เพศของดอก			ใบ	มือเกาะ	กิ่งก้าน	ตา	ผลผลิต/ไร่ (ตัน)	ผลสีเขียว	ผลสีขาว	น้ำหนักผล (กรัม)	ความกว้างผล (ซม.)	ความยาวผล (ซม.)
1	PI 197088	6.7	M[1]	-	-	18	112	9	18	10	100		62.9	4	6.7
2	PI 321009	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	PI 330628	6.7	M	-	-	-	-	-	-	2	100	-	78.6	4.6	6.7
4	PI 358813	15.5	M	-	-	22	136	0	22	2.4	100	-	127.8	3.5	15.5
5	PI 358814	16.6	M	-	-	24	151	0	24	4	100	-	115.3	2.9	16.6
6	PI 432875	20.2	M	-	-	17	100	2	17	0.7	100	-	152.5	3	20.2
7	PI 432876	25.6	M	-	-	20	129	4	20	4.8	100	-	176.8	3	25.6
8	PI 432878	23.6	M	-	-	12	75	5	12	6.7	100	-	128.2	2.9	23.6
9	PI 432886	16.5	M	-	G[2]	13	133	12	23	5.8	81.1	18.9	105.1	3.3	16.5
10	CSL 0013	12.9	M	-	G	20	147	10	20	7.2	43.1	56.9	101.3	3.5	12.9
11	CSL 0077	9.6	M	-	G	25	147	14	25	5.5	100	-	76.4	3.8	9.6
12	CSL 0088	9	M	-	-	23	143	13	23	7	81.4	18.6	70.7	3.6	9
13	CSL 0089	9.3	M	-	G	22	160	11	22	3.7	100	-	78.8	3.9	9.3
14	CSL 0096	8.9	M	-	-	17	124	8	17	3.4	100	-	70.7	3.7	8.9
15	CSL 0097	9	M	-	-	25	144	13	25	7.9	42.6	57.4	60.9	3.4	8.6
16	PI 279468	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	PI 288238	14.6	M	-	-	20	112	8	20	2.9	100	-	93.6	3.7	14.6

ตารางที่ ก2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	Accession	ความยาวผล (ซม.)	เพศของดอก			ใบ	มือเกาะ	กิ่งก้าน	ตา	ผลผลิต/ไร่ (ตัน)	ผลสีเขียว	ผลสีขาว	น้ำหนักผล (กรัม)	ความกว้างผล (ซม.)	ความยาวผล (ซม.)
18	CSL 0068	7.9	M	-	-	22	119	8	22	6.8	100	-	67.9	3.7	7.9
19	CSL 0092	8.9	M	-	-	21	138	10	21	3.8	100	-	74	3.7	8.9
20	PI 114339	-	M	-	-	17	134	3	17	-	-	-	-	-	-
21	PI 234517	13.4	M	-	-	21	127	8	21	3.5	100	-	86.9	3.2	13.4
22	PI 390259	16	M	-	-	17	111	8	17	7	100	-	112.5	3.2	16
23	CSL 0014	14	M	-	G	22	148	9	22	9.1	100	-	101.4	3.6	14
24	CSL 0044	9.4	M	-	G	24	165	10	24	6.9	100	-	79.9	3.7	9.4
25	CSL 0076	8.3	M	-	G	22	136	13	22	7.4	81.8	18.2	64.4	3.6	8.3
26	CSL 0080	11.3	M	-	G	20	129	9	20	9.3	100	-	72.5	3.3	11.3
27	PI 164173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	CSL 0022	-	M	-	G	24	130	13	24	-	-	-	-	-	-
29	PI 426170	14.1	M	A[3]	G	19	140	7	19	2.1	100	-	107.7	3.4	14.1
30	CSL 0043	10.2	M	-	G	21	148	10	21	2.2	100	-	82.2	3.6	10.2
31	CSL 0012	8.9	M	A	-	23	134	14	23	3.9	48.8	51.2	72.9	3.6	8.9
32	PI 426169	14.4	M	-	G	20	129	10	20	4.3	100	-	106.6	3.5	14.4
33	CSL 0015	-	M	A	-	18	139	11	18	-	-	-	-	-	-
34	CSL 0046	9.2	M	-	G	16	94	7	16	4.3	100	-	66.7	3.5	9.2

ตารางที่ ก2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	Accession	ความยาวผล (ซม.)	เพศของดอก			ใบ	มือเกาะ	กิ่งก้าน	ตา	ผลผลิต/ไร่ (ตัน)	ผลสีเขียว	ผลสีขาว	น้ำหนักผล (กรัม)	ความกว้างผล (ซม.)	ความยาวผล (ซม.)
35	CSL 0067	7.5	M	-	G	24	124	9	24	8.5	39.4	60.6	67.9	3.9	7.5
36	PI 103049	13.2	M	-	-	16	108	2	16	8.2	100	-	97.3	3.7	13.2
37	PI 167223	-	M	A	-	25	119	12	25	-	-	-	-	-	-
38	PI 175121	-	M	-	-	10	64	4	10	-	-	-	-	-	-
39	PI 178886	8.5	M	A	-	26	129	10	26	1.4	100	-	66.3	3.7	8.5
40	PI 209067	10.4	M	-	-	24	154	9	24	5.6	100	-	73	3.5	10.4
41	PI 211979	13	M	-	-	29	148	13	29	19	100	-	84.4	3	13
42	PI 227013	14.7	M	A	-	28	167	14	28	2.3	100	-	121.8	3.7	14.7
43	PI 321010	10	M	A	G	20	131	10	20	6.8	100	-	75.2	3.5	10
44	PI 357857	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	PI 466922	12.2	M	A	G	14	68	1	14	1.9	100	-	92.2	3.7	12.2
46	PI 478366	31.9	M	-	-	18	118	5	18	3.6	100	-	161.3	2.7	31.9
47	PI 483340	16.3	M	-	G	20	156	7	20	5.4	100	-	111.7	3	16.3

หมายเหตุ 1; M = Monoeciuos plant

2; G = Gynoeciuos plant

3; A = Androeciuos plant

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและเทคนิค AFLP

1. 2X CTAB buffer

2% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (หรือ CTAB, cethyltrimethyl ammonium bromide)

1.4 M NaCl

20 mM EDTA pH 8.0

100 mM Tris-HCl pH 8.0

วิธีการเตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง สาร	CTAB	2.00	กรัม
	NaCl	8.18	กรัม
แล้วเติม	0.5 M EDTA pH 8.0	4.00	มิลลิลิตร
	1M Tris-HCl pH 8.0	10.00	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Chloroform: Isoamyl alchohol (24: 1)

วิธีการเตรียมในปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ตวงสาร	Chloroform	384.00	มิลลิลิตร
	Isoamyl alchohol	16.00	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในภาชนะที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25: 24: 1)

วิธีการเตรียมในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ตวงสาร	Phenol	5.00	มิลลิลิตร
	Chloroform	4.80	มิลลิลิตร
	Isoamyl alchohol	0.20	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในภาชนะที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บรักษาสารผสมที่ได้ไว้ภายใต้ 100 mM Tris-Cl (pH 8.0) ในภาชนะกันแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. Linear polyacrylamide

วิธีการเตรียมในปริมาตร 20 มิลลิลิตร

4.1 ละลาย acrylamide 0.05 กรัม ในบัฟเฟอร์ (40 mM Tris-HCl, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA pH 8.0) 1 มิลลิลิตร

4.2 เติม 10% ammonium persulfate 10 ไมโครลิตร และ TEMED 1 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 75 นาที

4.3 เติม absolute ethanol 2.53 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g นาน 2 นาที

4.4 เทสารละลายใสทิ้งไปและปล่อยให้ตะกอนที่ได้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4.5 เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนและตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน

4.6 เก็บสารละลายในภาชนะกันแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ต่อไป

5. RNase buffer

10 mM Tris-HCl pH 8.0

15 mM NaCl

วิธีการเตรียมในปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ตวงสาร	1 M Tris-HCl pH 8.0	5.00	มิลลิลิตร
	3 M NaCl	1.50	มิลลิลตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 500 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. 50X TAE buffer

2 M Tris-base

1 M acetic acid

50 mM EDTA pH 8.0

วิธีการเตรียมในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	Tris-base	242.0	กรัม
	1 M acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
	0.5 M EDTA pH 8.0	100.0	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. 10X Tris EDTA (TE buffer)

10 mM Tris-HCl pH 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

วิธีการเตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวงสาร	1 M Tris-HCl pH 8.0	1.00	มิลลิลิตร
	0.5 M EDTA pH 8.0	0.20	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. 5X TBE buffer

445 mM Tris-base

445 mM boric acid

10 mM 0.5 M EDTA (pH 8.0)

วิธีการเตรียมสารในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	Tris base	54.00	กรัม
	Boric acid	27.50	กรัม
	0.5 M EDTA (pH 8.0)	20.00	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. 6X loading buffer

0.25% bromophenol blue

0.25% xylene cyanol

30% glycerol

วิธีการเตรียมสารในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	bromophenol blue	0.025	กรัม
	xylene cyanol	0.025	กรัม
เติม	glycerol	3.00	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บรักษาสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. Formamide loading buffer

0.1% bromophenol blue

0.1% xylene cyanol

10 mM 0.5 M EDTA (pH 8.0)

98% formamide

วิธีการเตรียมสารในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	bromophenol blue	0.01	กรัม
	xylene cyanol	0.01	กรัม
เติม	0.5 M EDTA (pH 8.0)	200	ไมโครลิตร

จากนั้นเติม formamide ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บรักษาสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. 0.5 µg/ml Ethidium bromide

วิธีการเตรียมในปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ตวงสาร	Ethidium bromide (10mg/ml)	100	µl
	น้ำกลั่น	200	ml

ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในภาชนะทึบแสงหรือภาชนะที่หุ้มด้วยแผ่นฟลอยด์อะลูมิเนียมแล้วเก็บให้พ้นแสงในอุณหภูมิห้อง

12. Silver Nitrate solution

วิธีการเตรียมในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	silver nitrate	1.60	กรัม	
เติม	น้ำกลั่น	994	มิลลิลิตร	คนจนสารละลายเข้ากัน
จากนั้นเติม	1M NaCl	4.00	มิลลิลิตร	คนจนได้สารละลายสีน้ำตาลขุ่น

ค่อยๆ เติม liquid ammonia (25%) ทีละหยด (ประมาณ 2 – 2.4 มิลลิลิตร) จนได้สารละลายใส จึงใส่เพิ่มอีก 2 หยด ผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ในภาชนะทึบแสงหรือภาชนะที่หุ้มด้วยแผ่นฟลอยด์อะลูมิเนียมแล้วเก็บให้พ้นแสงในอุณหภูมิห้อง

13. Developer

2% sodium carbonate

0.02% formaldehyde (37%)

วิธีการเตรียมในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	sodium carbonate	20.00	กรัม
เติม	formaldehyde (37%)	600	ไมโครลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แช่เย็นสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เพื่อใช้ในขั้นตอนการย้อมเจลต่อไป)

ภาคผนวก ค

การนำเสนอผลงาน

Genetic Diversity of Downy Mildew Resistant Cucumber Using the AFLP Technique.

Nattawan Thongthod, Panom Winyayong, Siam Popluechai, Ekachai Chukeatirote and Somrudee Onto

School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100 Thailand

Abstract

The genetic diversity of 27 downy mildew resistant cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars was determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. To perform the AFLP analysis, sixty four combinations of primers were used and the results were interpreted based on total and polymorphic scores. For *Cucumis sativus*, the total of 889 AFLP bands were detected using twelve combinations of primers. Nei and Li's similarity coefficients were calculated and a phylogenetic tree was then constructed using the UPGMA analysis to trace their phylogenetic relationship. According to the results, these *C. sativus* plants were highly polymorphic and can be divided into 3 clusters of downy mildew resistant cucumber and 2 clusters of susceptible with the similarity values in the range of 0.790 – 0.957.

Keywords: *Cucumis sativus*, cucumber, AFLP, genetic diversity

1. Introduction

Cucumber is one of the most cultivated crops in Thailand. Although, many dieases of cucumbers have been reported, downy mildew caused by the fungus *Psudoperonospora cubensis* is regarded as one of the most serious causes affecting the cucumber yields (1,2). Especially in raining and winter seasons, cucumbers are often sensitive and can be tremendously destroyed by downy mildew. At present, control of downy mildew can be done through the use of resistant cultivars derived from traditional plant breeding (3). Successful identification of resistant cucumber cultivars is achieved by using molecular markers which can be used as additional tools for variety description (4,5,6). In addition, the use of molecular markers has been shown to reduce the errors that may arise from phonotypic plasticity (7,8,9). In the course of downy mildew resistant cucumber breeding programme, the AFLP technique was introduced to determine if there is genetic diversity among downy mildew resistant cucumber cultivars preserved.

2. Methodology

Twenty seven cultivars (15 resistant and 12 susceptible) of cucumber obtained as seeds from United States Department of Agriculture (USDA) and Lampang Agriculture Research and Training Center (LARTC) were grown in the experimental field of Mae Fah Luang University during November 2005 to January 2006 (Table 1). Genomic DNA extracted from young leaf tissue of cucumber using a CTAB extraction procedure (10) and AFLP analysis were then carried out using sixty four primer combinations (*Eco*RI and *Mse*I primers) based on the protocal of Vos *et al*. (11). The results were then interpreted based on total and polymorphic scores. The DNA profiles generated were determined based on the absence and / or the presence of each band (score 0 and 1). The data recorded were eventually used to calculateusing the NTSYS-pc programme version 2.01e (12). A phylogenetic tree was constructed using

the unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA) as described by Sneath and Sokal (13).

3. Results, Discussion and Conclusion

In this analysis, only twelve combinations of primers gave polymorphic bands in all genomic DNA samples. A total of 889 AFLP bands, ranging in size from 500 bp to 125 bp, were identified, in which 523 bands (~58.83%) were polymorphic. The number of fragments detected by an individual primer combinations ranged from 47 to 117 bands. These data were sub- sequently used to calculate the similarity index which were between 0.790 - 0.957 (table 2). Additionally, based on the phylogenetic tree constructed by the UPGMA cluster analysis and disease rating of downy mildew in each accessions, our results showed that there were five clusters: cluster I and II contained 7 accessions of downy mildew resistant cucumber cultivars; cluster III and IV contained 11 and 1 accession of susceptible, respectively; and cluster V contained solely 1 accession of downy mildew resistant cucumber (Figure 1). These data presented in this study were shown to confirm the existence of genetic diversity among these cucumber cultivars. Such information obtained from this analysis is expected to be important as genetic markers and useful for downy mildew resistant cucumber cultivars breeding programme.

Table 1 Cucumber accessions used for examination of genetic diversity

No.	Accession	Country	Source[1]	Disease Rating[2] (score 1-5)
1	PI 197088	India	USDA	1
2	PI 321009	Taiwan	USDA	0.5
3	PI 330628	Pakistan	USDA	0.8
4	PI 358813	Malaysia	USDA	1.2
5	PI 358814	Malaysia	USDA	0.8
6	PI 432875	China	USDA	0.8
7	PI 432876	China	USDA	0.8
8	PI 432878	China	USDA	0.5
9	PI 432886	China	USDA	1.2
10	CSL 0013	Thailand	LARTC	1
11	CSL 0077	Thailand	LARTC	1.2
12	CSL 0088	Thailand	LARTC	1.2
13	CSL 0089	Thailand	LARTC	1.2
14	CSL 0096	Thailand	LARTC	0.8
15	CSL 0097	Thailand	LARTC	0.8
16	PI 103049	China	USDA	4
17	PI 167223	Turkey	USDA	4
18	PI 175121	India	USDA	4.5
19	PI 178886	Turkey	USDA	4.5
20	PI 209067	United State	USDA	3.8
21	PI 211979	Iran	USDA	3.5
22	PI 227013	Iran	USDA	3
23	PI 321010	Taiwan	USDA	4
24	PI 357857	Yogoslavia	USDA	3.5
25	PI 466922	Russian Federation	USDA	3.2
26	PI 478366	China	USDA	3
27	PI 483340	Korea	USDA	2.8

[1] **USDA**, United States Department of Agriculture; LARTC, Lampang Agriculture Research and Training Center

[2] **Disease Rating**, visual rating system based on the appearance of lesions where: score $\leq$ 1 showed appearance of lesions less than 20% and score $\geq$ 3.5 showed appearance of lesions more than 60 - 80%

Table 2 similarity matrix from 27 cultivars of *C. sativus* generated from Nei's method (14)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	1.000																										
2	0.857	1.000																									
3	0.895	0.904	1.000																								
4	0.883	0.888	0.863	1.000																							
5	0.843	0.846	0.860	0.818	1.000																						
6	0.864	0.883	0.908	0.842	0.846	1.000																					
7	0.866	0.903	0.885	0.882	0.835	0.937	1.000																				
8	0.869	0.863	0.880	0.852	0.822	0.926	0.938	1.000																			
9	0.849	0.853	0.883	0.864	0.834	0.866	0.868	0.896	1.000																		
10	0.855	0.853	0.879	0.848	0.826	0.879	0.873	0.895	0.924	1.000																	
11	0.820	0.837	0.841	0.826	0.828	0.820	0.826	0.823	0.885	0.884	1.000																
12	0.854	0.842	0.869	0.830	0.844	0.850	0.840	0.857	0.904	0.903	0.893	1.000															
13	0.836	0.866	0.857	0.877	0.815	0.842	0.875	0.857	0.893	0.897	0.889	0.922	1.000														
14	0.845	0.868	0.860	0.893	0.808	0.839	0.880	0.862	0.894	0.895	0.876	0.909	0.957	1.000													
15	0.841	0.838	0.872	0.822	0.843	0.848	0.838	0.850	0.894	0.899	0.897	0.917	0.907	0.891	1.000												
16	0.824	0.822	0.832	0.796	0.800	0.845	0.836	0.845	0.832	0.857	0.830	0.838	0.831	0.830	0.856	1.000											
17	0.849	0.840	0.853	0.847	0.804	0.854	0.851	0.868	0.898	0.883	0.860	0.885	0.875	0.877	0.877	0.865	1.000										
18	0.821	0.830	0.838	0.830	0.794	0.826	0.837	0.837	0.866	0.858	0.875	0.860	0.873	0.872	0.868	0.862	0.897	1.000									
19	0.814	0.824	0.837	0.809	0.814	0.837	0.829	0.843	0.875	0.862	0.867	0.886	0.877	0.864	0.885	0.843	0.924	0.900	1.000								
20	0.839	0.842	0.829	0.849	0.806	0.834	0.860	0.853	0.864	0.849	0.835	0.860	0.878	0.883	0.854	0.839	0.908	0.864	0.895	1.000							
21	0.839	0.861	0.867	0.856	0.824	0.863	0.870	0.862	0.895	0.888	0.861	0.877	0.896	0.895	0.884	0.861	0.936	0.886	0.921	0.916	1.000						
22	0.831	0.863	0.862	0.838	0.830	0.857	0.869	0.857	0.871	0.872	0.852	0.852	0.874	0.867	0.867	0.856	0.905	0.880	0.895	0.900	0.933	1.000					
23	0.831	0.858	0.874	0.840	0.803	0.879	0.874	0.868	0.880	0.881	0.854	0.848	0.870	0.866	0.874	0.865	0.881	0.885	0.873	0.863	0.916	0.908	1.000				
24	0.828	0.849	0.840	0.863	0.800	0.832	0.863	0.853	0.891	0.870	0.850	0.856	0.887	0.891	0.862	0.841	0.919	0.888	0.907	0.907	0.937	0.910	0.902	1.000			
25	0.844	0.850	0.831	0.857	0.792	0.842	0.868	0.850	0.841	0.846	0.816	0.843	0.859	0.869	0.840	0.830	0.874	0.859	0.858	0.896	0.893	0.875	0.874	0.886	1.000		
26	0.841	0.869	0.858	0.852	0.790	0.879	0.906	0.895	0.860	0.881	0.836	0.842	0.875	0.882	0.856	0.863	0.888	0.868	0.859	0.886	0.900	0.892	0.925	0.901	0.905	1.000	
27	0.836	0.874	0.848	0.871	0.795	0.860	0.895	0.881	0.871	0.883	0.843	0.849	0.900	0.906	0.860	0.850	0.877	0.868	0.856	0.880	0.896	0.888	0.917	0.902	0.890	0.946	1.000

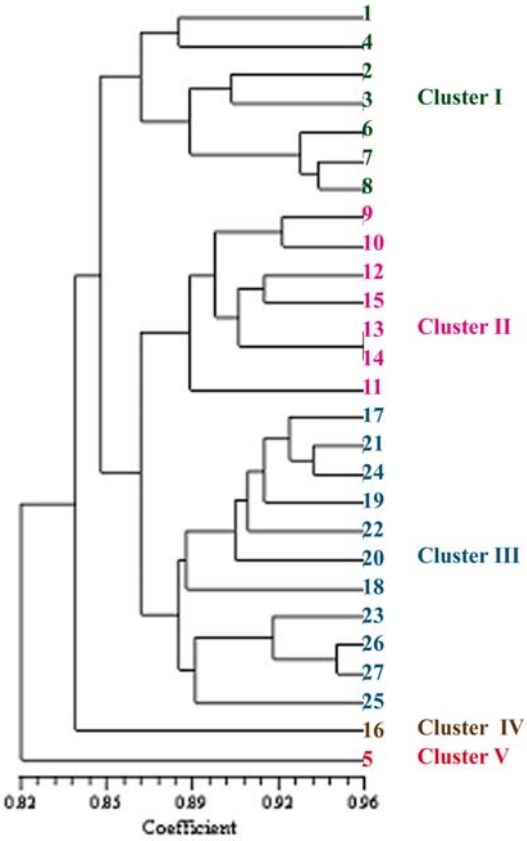


Figure 1 Phylogenetic tree of *C. sativus* cultivars based on UPGMA cluster analysis of AFLP data generated by 12 primers combinations.

Acknowledgement

The authors thank USDA and LARTC for cucumber seeds supply, We also acknowledge Assoc. Prof. Somsak Apisitwanich for his help in AFLP data analysis. This work was financially supported by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).

References

1) Thomas, C.E., T. Inaba, and Y. Cohen. 1987. Physiological specialization in *Pseudoperonospora Cubensis*. Phyto-pathology. 77: 1621-1624.
2) Shetty, N.V., T.C. Wehner, C.E. Thomas, R.W. Doruchowski, and K.P.V. Shtty. 2002. Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe and North America. Scientia Hortic. 94: 231-239.
3) Robinson, R.W., and D.S. Decker-Walters. 1999. Cucurbits. CAB Interna- tional, New York, NY.
4) Soller, M., and J.S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet. 67: 25-33.
5) Virk, P. S., H.J. Newbury, M.T. Jackson, and B.V. Ford-Lloyd. 1995. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 90: 1049-1055.
6) Kressovich, S., J.G.K. Williams, J.R. McFerson, E.J. Routman, and B.A. schaal. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleraces* L.via random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85: 190-196.
7) Horejsi, T., J.E. Staub, and C. Thomas. 2000. Linkage of random amplified polymorphic DNA markers to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica. 115: 105-113.
8) Staub, J.E., F.C. Sequen, and M. Gupta. 1996. Genetic marker, map construction, and their application in plant breeding. HortScience. 31: 729-741.
9) Zhuang, F.Y., J.F. Chen, J.E. Staub, and C.T. Qian. 2004. Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. By SSR and RAPD marker analysis. Plant Breeding. 123: 167-172.
10) Agrawal. G.R., R.N. Pandey, and V.P.A. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from Choerospondias asillaris. Biotech Biodiv Lett. 2: 19-24.
11) 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: 4407-4414.
12) Rohlf, F. J. 1990. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics Inc., New York.
13) Sneath, P.H.A., and R.R. Sokal. 1973. The Principals and Practice of Numerical Classification, W.H. Rewwman & Co., San Francisco.

Assessment of genetic variability in downy mildew resistant cucumber by AFLP

Nattawan Thongthod*, Ekachai Chukeatirote, Panom Winyayong, Siam Popluechai and Somrudee Onto

School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100 Thailand

Abstract

Downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* is found annually on cucurbits such as cucumbers, pumpkins and squash. The disease, when infected greatly reduces yield, fruit quality and harvesting time. Control the downy mildew can be achieved by the use of resistant varieties and/or fungicide chemicals. Fortunately, especially in cucumber, several resistant varieties have been presently available through the extensive breeding programme. In this study, twenty seven downy mildew resistant cucumber cultivars were collected and assessed for their genetic diversity. Initially, the genomic DNA samples were extracted from young leaf tissue of cucumbers using a CTAB extraction procedure. The AFLP analysis was then performed with twelve *Eco*RI-*Mse*I primer combinations. A total of 889 AFLP markers was generated and analysed. Cluster analysis revealed genetic variation in these cucumbers. Based on the results, there were 5 clusters in which the similarity values ranged from 0.790 to 0.957. These genetic data are expected to be useful as an efficient marker for breeding resistant cucumber cultivars.

Keywords: *Cucumis sativus*, Cucumber, AFLP, Genetic variability, Downy mildew

Assessment of genetic variability in downy mildew resistant cucumber by AFLP

Nattawan Thongthod*, Ekachai Chukeatirote, Panom Winyayong, Siam Popluechai and Somrudee Onto

School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100 Thailand

Abstract : Downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* is found annually on cucurbits such as cucumbers, pumpkins and squash. The disease, when infected greatly reduces yield, fruit quality and harvesting time. Control the downy mildew can be achieved by the use of resistant varieties and/or fungicide chemicals. Fortunately, especially in cucumber, several resistant varieties have been presently available through the extensive breeding programme. In this study, twenty seven downy mildew resistant cucumber cultivars were collected and assessed for their genetic diversity. Initially, the genomic DNA samples were extracted from young leaf tissue of cucumbers using a CTAB extraction procedure. The AFLP analysis was then performed with twelve *Eco*RI-*Mse*I primer combinations. A total of 889 AFLP markers was generated and analysed. Cluster analysis revealed genetic variation in these cucumbers. Based on the results, there were 5 clusters in which the similarity values ranged from 0.790 to 0.957. These genetic data are expected to be useful as an efficient marker for breeding resistant cucumber cultivars.

Keywords : *Cucumis sativus*, Cucumber, AFLP, Genetic variability, Downy mildew

Introduction

Cucumber (*Cucumis sativus*) is of Asiatic origin. It is one of the most cultivated crops in Thailand. It uses short time to grow before harvesting (35-45 days). Although the cucumber can grow and make the revenue throughout the year, it is always attacked by many diseases at every stages of development. Especially in rainy and winter seasons, cucumbers are often sensitive and can be tremendously destroyed by downy mildew. At present, control of downy mildew can be done through the use of resistant cultivars derived from traditional plant breeding (1). However, phenotypic selection for downy mildew resistance is difficult due to the large influence of environmental factors on the disease's development (2). From these difficulties, the use of molecular markers has been shown to reduce the errors that may arise from phonotypic plasticity (3). In this study, amplified fragment length polymorephism (AFLP) technique was introduced to analyze the genetic diversity of downy mildew resistant cucumbers for improve the efficiency of downy mildew resistant cucumber breeding programme.

Materials and Methods

27 cucumber cultivars (15 resistant and 12 susceptible) (Table 1) were grown in the experimental field of Mae Fah Luang University.

Genomic DNA extracted from young leaf tissue of cucumber using a CTAB extraction procedure.

AFLP analysis were then carried out using sixty four primer combinations (EcoRI and MseI primers) based on the protocal of Vos *et al.* (4).

The data recorded were eventually used to calculate using the NTSYS-pc programme version 2.01e.

Table 1 Cucumber accessions used for examination of genetic diversity

No.	Accession	Country	Source[1]	Disease Rating[2] (score 1-5)
1	PI 197088	India	USDA	1
2	PI 321009	Taiwan	USDA	0.5
3	PI 339628	Pakistan	USDA	0.5
4	PI 358813	Malaysia	USDA	1.2
5	PI 358814	Malaysia	USDA	0.5
6	PI 432875	China	USDA	0.5
7	PI 432876	China	USDA	0.5
8	PI 432878	China	USDA	0.5
9	PI 439084	China	USDA	1.5
10	CSL 0013	Thailand	LARTC	1
11	CSL 0077	Thailand	LARTC	1.2
12	CSL 0088	Thailand	LARTC	1.2
13	CSL 0089	Thailand	LARTC	1.2
14	CSL 0096	Thailand	LARTC	0.5
15	CSL 0097	Thailand	LARTC	0.5
16	PI 183048	China	USDA	4
17	PI 167223	Turkey	USDA	4
18	PI 175121	India	USDA	4.5
19	PI 178886	Turkey	USDA	4.5
20	PI 209067	United States	USDA	3.5
21	PI 211979	Iran	USDA	3.5
22	PI 227013	Iran	USDA	3
23	PI 321010	Taiwan	USDA	4
24	PI 357527	Yugoslavia	USDA	3.5
25	PI 464922	Russian Federation	USDA	3.2
26	PI 478266	China	USDA	2
27	PI 483240	Korea	USDA	2.5

[1] USDA, United States Department of Agriculture; LARTC, Lampang Agriculture Research and Training Center

[2] **Disease Rating**, visual rating system based on the appearance of lesions where: score ≤ 1 showed appearance of lesions less than 20% and score ≥ 3.5 showed appearance of lesions more than 60 - 80%

Results and Conclusion

The AFLP analysis of 27 accessions with 12 primer combinations generated 889 bands, of which 523 (~58.83%) were polymorphic, for an average of 74.08 markers per primer-enzyme combination. These bands ranging between 500 bp to 125 bp, were identified. These data were sub-sequently used to calculate the similarity index which were between 0.790 - 0.957 (data not show). based on the phylogenetic tree constructed by the UPGMA cluster analysis and disease rating of downy mildew in each accessions, our results showed that there were five clusters: cluster I and II contained 7 accessions of downy mildew resistant cucumber cultivars; cluster III and IV contained 11 and 1 accession of susceptible, respectively; and cluster V contained solely 1 accession of downy mildew resistant cucumber (Figure 1). The data presented in this study were shown to confirm the existence of genetic diversity among these cucumber cultivars. Such information obtained from this analysis is expected to be important as genetic markers and useful for downy mildew resistant cucumber cultivars breeding programme.

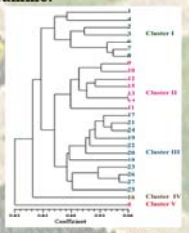


Figure 1. Phylogenetic tree of *C. sativus* cultivars based on UPGMA cluster analysis of AFLP data generated by 12 primers combinations.

References:

1) Robinson, R.W., and D.S. Decker-Walters. 1999. Cucurbits. CAB International, New York, NY.

2) Cohen, Y. 1997. The combined effects of temperature, leaf wetness and inoculum concentration on infection of cucumber with *Pseudoperonospora cubensis*. Can J bot. 55: 1478-1487.

3) Horejsi, T., J.E. Staub, and C. Thomas. 2005. Linkage of random amplified polymorphic DNA markers to downy mildew resistance in cucumber (Cucumis sativus L.). Euphytica. 115: 105-113.

4) 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: 4407-4414.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาว ณัฐวรรณ ทองทศ
วัน เดือน ปี เกิด	25 เมษายน 2526

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง พ.ศ. 2547

ประวัติการฝึกงาน/ ฝึกอบรม

27 – 29 มิ.ย. 2550	อบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทางด้านการเกษตร ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
15 มี.ค. – 31 พ.ค. 2547	ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย ห้องปฏิบัติการจุลชีวทางอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ประวัติการนำเสนอผลงาน

26 – 28 มี.ค. 2551	นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในงานการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 2 ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
9 – 12 ต.ค. 2550	นำเสนอผลงานในรูปแบบปากเปล่าในงานการประชุมวิชาการนานาชาติประจำปีของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19 ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต