

ภาคผนวก





ภาคผนวก ก

ข้อมูลแหล่งที่มาและฐานวิทยา
ของแตงกวาด้อย่างทั้ง 47 ตัวอย่าง

ตารางที่ ก1 ข้อมูลแหล่งที่มาของแตงกวาด้วย่างทั้งหมด 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 Azerbaijan	6	USDA	-	3.5
42	PI 227013	Iran	Khuzestan	14566	USDA	-	3
43	PI 321010	Taiwan	-	Nei Wu	USDA	-	4
44	PI 357857	Yugoslavia	-	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 ครั้ง

2; S7 หมายถึงการผสมตัวเองมาแล้ว 7 ครั้ง

ตารางที่ ก2 ข้อมูลลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของแตงกวาตัวอย่างทั้ง 47 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่าง	Accession	ความยาวผล (ซม.)	เพศของดอก			ใบ	มือเกาะ	กึ่งก้าน	ตา	ผลผลิต/ไร่ (ตัน)	ผลสี เขียว	ผลสี ขาว	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)	ผลสี เขียว	ผลสี ขาว	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)	ผลสี เขียว	ผลสี ขาว	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 = Monoecious plant

2; G = Gynoecious plant

3; A = Androecious 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 alcohol (24: 1)

วิธีการเตรียมในปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ตวงสาร	Chloroform	384.00	มิลลิลิตร
	Isoamyl alcohol	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 alcohol	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 เทสารละลายใส่ทิ้งไปและปล่อยให้ตะกอนที่ได้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 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

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

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

ซังสาร 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

ซังสาร 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 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บรักษาสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. 0.5 µg/ml Ethidium bromide

วิธีการเตรียมในปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ตัวสาร	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 (เพื่อใช้ในขั้นตอนการย้อมเจดต่อไป)

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 diseases of cucumbers have been reported, downy mildew caused by the fungus *Pseudoperonospora 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 phenotypic 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 (*EcoRI* and *MseI* primers) based on the protocol 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 calculate using 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 subsequently 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	Yugoslavia	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 ≤ 1 showed appearance of lesions less than 20% and score ≥ 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

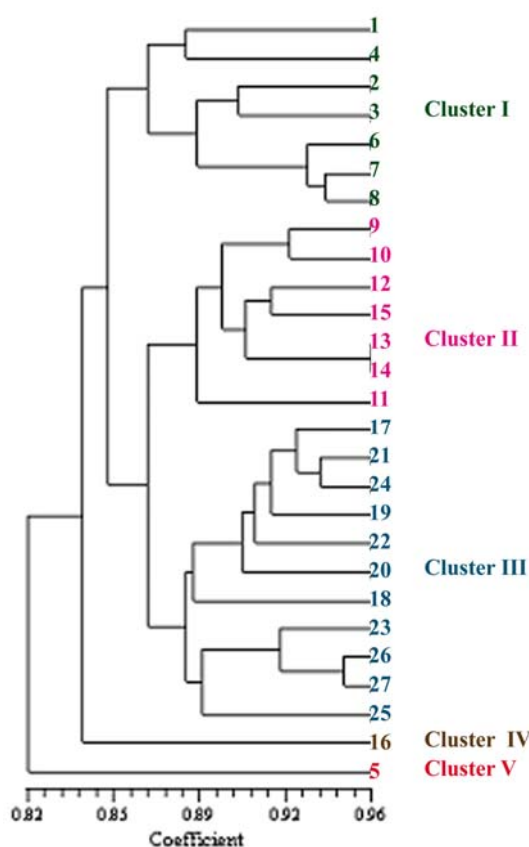


Figure 1 Phylogenetic tree of *C. sativus* cultivars based on UPGMA cluster analysis of AFLP data generated by 12 primers combinations.

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*. *Phytopathology*. 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 Hort.* 94: 231-239.
- 3) Robinson, R.W., and D.S. Decker-Walters. 1999. Cucurbits. CAB International, 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 oleracea* 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. Rerwwman & Co., San Francisco.

Assessment of genetic variability in downy mildew resistant cucumber by AFLP

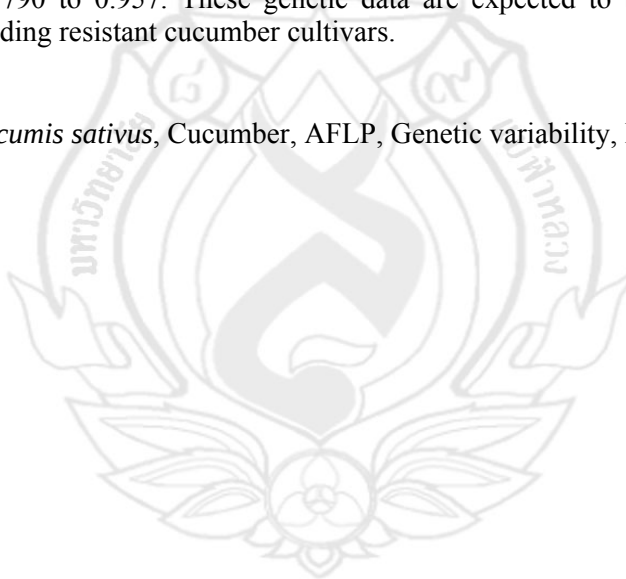
Nattawan Thongthod*, Ekachai Chukeatirote, Panom Winyayong, Siam Popluechai and
Somrudee Onto

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 *EcoRI-MseI* 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 *EcoRI-MseI* 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 phenotypic plasticity (3). In this study, amplified fragment length polymorphism (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 protocol of Vos et al. (4).



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

Table 1 Cucumber accessions used for examination of genetic diversity

No.	Accession	Country	Source ¹	Disease Rating ² (score 1-5)
1	PI 170703	India	USDA	1.0
2	PI 220009	Taiwan	USDA	0.0
3	PI 220018	Malaysia	USDA	0.0
4	PI 220019	Malaysia	USDA	0.0
5	PI 220014	Malaysia	USDA	0.0
6	PI 220015	Malaysia	USDA	0.0
7	PI 420176	China	USDA	0.0
8	PI 420176	China	USDA	0.0
9	PI 420176	China	USDA	0.0
10	PI 420176	China	USDA	0.0
11	CHL 00113	Thailand	LA-RTG	1.2
12	CHL 00113	Thailand	LA-RTG	1.2
13	CHL 00113	Thailand	LA-RTG	1.2
14	CHL 00113	Thailand	LA-RTG	0.0
15	CHL 00113	Thailand	LA-RTG	0.0
16	PI 160349	China	USDA	4
17	PI 167223	Taiwan	USDA	4.5
18	PI 170554	Taiwan	USDA	4.5
19	PI 211979	Iran	USDA	3.5
20	PI 227013	Iran	USDA	3
21	PI 220010	Taiwan	USDA	4
22	PI 220010	Taiwan	USDA	3.5
23	PI 220010	Taiwan	USDA	3.5
24	PI 220010	Taiwan	USDA	3.5
25	PI 220010	Taiwan	USDA	3.5
26	PI 220010	Taiwan	USDA	3.5
27	PI 220010	Taiwan	USDA	3.5

¹ USDA, United States Department of Agriculture; LA-RTG, Lumphong 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 5: 2-3 showed appearance of lesions more than 60-100%.

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.

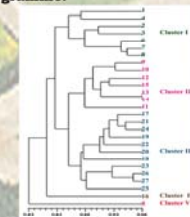


Figure 1. Phylogenetic tree of *C. sativus* cultivars based on UPGMA cluster analysis of AFLP data generated by 12 primers combinations.

References:

- Robinson, R.W., and D.B. Dickey-Walters. 1999. Cucurbits. CAB International, New York, NY.
- Cohen, Y. 1997. The combined effects of temperature, leaf wetness and inoculum concentration on infection of cucumber with *Pseudoperonospora cubensis*. *Crop J* 25: 1479-1487.
- Hempel, T., J.E. Heath, and C. Thomas. 2005. Linkage of random amplified polymorphic DNA markers to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Environ. 118*: 109-115.
- Vin, F., R. Rogers, M. Blocker, M. Rajana, T. Van de Lee, M. Benoit, A. Feller, J. Pa, J. Polman, M. Kasper, and M. Zebner. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4607-4614.