การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ในมะระ (*Momordica charantia* L.)

ศิวาพร แก้วคำฟู

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ในมะระ (*Momordica charantia* L.)

ศิวาพร แก้วคำฟู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง
(*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ในมะระ
(*Momordica charantia* L.)

ศิวาพร แก้วคำฟู

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ)
วันที่...................เดือน..................พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี)
วันที่...................เดือน..................พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....
(Dr.Darush Struss)
วันที่...................เดือน..................พ.ศ. ....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร ....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรนุช เจริญกิจ)
วันที่...................เดือน..................พ.ศ. ....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว ....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่...................เดือน..................พ.ศ. ....

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ในมะระ (*Momordica charantia* L.)
ชื่อผู้เขียน	นางสาวศิวาพร แก้วคำฟู
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ

บทคัดย่อ

โรคเหี่ยวเหลืองในมะระเกิดจากเชื้อสาเหตุ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* (FOM) ซึ่งเชื้อสาเหตุสามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน (soil-borne disease) ทำให้การป้องกันกำจัดโรคเป็นไปได้ยาก และส่งผลต่อปริมาณผลผลิตของมะระลดลง การปรับปรุงพันธุ์มะระให้มีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองจึงเป็นวิธีการช่วยแก้ปัญหาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลือง ปัจจุบันจึงมีการนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ของประชากรลูกรุ่นที่ 2 ในมะระ โดยศึกษาการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในประชากรลูกรุ่นที่ 2 ของมะระ จำนวน 235 ตัวอย่าง ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างมะระสายพันธุ์พ่อ “EW-000254” ที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองกับมะระสายพันธุ์แม่ที่มีความอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลือง “EW-000256” โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ในการแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม ความต้านทานตามสายพันธุ์พ่อ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 0-10.5 และกลุ่มอ่อนแอตามสายพันธุ์แม่ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 28-42 พบว่าประชากรลูกรุ่นที่ 1 แสดงลักษณะความอ่อนแอต่อโรคทั้งหมด มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 31.5-42 ดังนั้น จึงมีการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมเป็นแบบลักษณะด้อย (recessive trait) ผลการศึกษาการกระจายตัวในประชากรรุ่นที่ 2 จากการวิเคราะห์ค่า Chi-square test โดยพบต้นที่ต้านทานและต้นอ่อนแอต่อโรคเป็น 75 และ 160 ซึ่งอัตราส่วนที่คาดหมายไม่เท่ากับ 1:3 จากผลการศึกษาแสดงว่าลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระจึงถูกควบคุมด้วยยีนด้อยและอาจถูกควบคุมโดยยีนมากกว่า 1 ยีนขึ้นไป

นำเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 282 ไพรเมอร์ SNP มาสร้างแผนที่พันธุกรรมได้จำนวน 13 กลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups) จากนั้นใช้ค่า AUDPC ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธี MQM analysis พบ QTL หลักเพียง 1 ตำแหน่งที่สัมพันธ์กับลักษณะความ

ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองไอโซเลตพิษณุโลกอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย ได้แก่ MOMCH358328_577 ซึ่งมีค่า LOD เท่ากับ 32.85 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 47.5 และ MOMCH365273_2290 มีค่า LOD เท่ากับ 24.57 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 38.2 จากผลการศึกษาที่ได้นี้ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล MOMCH358328_577 ให้ค่า LOD และค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) ที่สูงกว่า จึงสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์มะระที่มีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์มะระได้

คำสำคัญ : โรคเหี่ยวเหลือง, มะระ, AUDPC, QTL, เครื่งหมายโมเลกุล SNP

Title DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH FUSARIUM WILT (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) RESISTANCE GENE IN BITTER GOURD (*Momordica charantia* L.)

Author Miss Siwaporn Kaewkumfu

Degree Master of Science in Horticulture

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr. Orapin Saritnum

ABSTRACT

Fusarium wilt is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* (FOM). It is a most devastating soil borne disease which is difficult to control and causes severe yield loss. The development of cultivars resistant shows to be an effective approach to control fusarium wilt. Technologies advances in marker-assisted selection (MAS) can be used as an alternative to assist the selection of plant in breeding programs. The objective was to develop the molecular markers linked to fusarium wilt resistance in F2 population of bitter gourd. The segregation of fusarium wilt resistance trait was performed in F2 population in bitter gourd; 235 samples were studied. The parental line was crossed between the resistance male parent "EW-000254" and the susceptible female parent "EW-000256". The disease severity was analyzed base on the area under the disease progress curve (AUDPC). The cluster of AUDPC can be distinguished into 2 groups. According to the parental line; resistance group had AUDPC range 0-10.5 and susceptible group had AUDPC range 28-42. These criteria of disease resistance were found all susceptible to fusarium wilt in F1 samples which had AUDPC range 31.5-42, therefore the segregation of fusarium wilt resistance was a recessive trait. The segregation of fusarium wilt resistance in F2 population were analyzed by chi-square. The plants ratio of resistance to susceptible was 75:160 which did not fitted to the expected ratio 1:3. The study concluded that the gene controlling the fusarium

wilt resistance is controlled by more than one recessive gene and is possibly a polygenic resistance.

The 282 SNP markers were mapped and distributed into 13 linkage groups. The AUDPC data of the F2 population were analyzed for QTL mapping analysis by MQM analysis. The major QTL associated with resistance to fusarium wilt from Phitsanulok isolate was located on linkage group 5 with 2 SNP markers MOMCH358328_577 in LOD score 32.85 and phenotypic variance explained 47.5% and MOMCH365273_2290 in LOD score 24.57 and phenotypic variance explained 38.2%. Therefore, SNP marker named MOMCH358328_577 was considered as the marker closely linked to QTL fusarium wilt resistance. The marker identification in this study can be used for marker-assisted selection of fusarium resistance breeding program in bitter gourd.

Keywords : fusarium wilt, bitter gourd, AUDPC, QTL, SNP marker

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ตามเป้าหมายเพราะได้รับความร่วมมือช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าอย่างยิ่ง เนื่องด้วยความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี และ Dr. Darush Struss ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ สนับสนุน และคำแนะนำในการแก้ไขตลอดระยะเวลาในการดำเนินงานทดลอง อีกทั้งยังสละเวลาในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งคอยให้กำลังใจและโอกาสแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีณัน บัณฑิตย์ ประธานกรรมการสอบ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าให้ข้อเสนอแนะพร้อมทั้งตรวจทาน แก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆในการพัฒนางานให้ดีขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณบริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ที่ให้การสนับสนุนในด้านพันธุ์มะระในการทดสอบความต้านทาน ห้องปฏิบัติการ Molecular Genetics Lab ที่สนับสนุนอุปกรณ์ และสารเคมี และทีมงานห้องปฏิบัติการโรคพืช ที่ช่วยสอนและอำนวยความสะดวกในการทดสอบในการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณทีมงานฝ่าย Genomics Research และทีมงานฝ่ายTrait introgression ที่ให้คำแนะนำในด้านการวิเคราะห์ต่างๆ และให้กำลังใจในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุพล คุณแม่แสงเดือน แก้วคำฟู และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่มอบโอกาสที่ดีในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆในห้องเรียนสาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทุกคนที่ให้กำลังใจและคอยให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ ได้นำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ไม่มากก็น้อย

ศิวาพร แก้วคำฟู

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.......... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.......... จ

กิตติกรรมประกาศ.......... ช

สารบัญ.......... ซ

สารบัญภาพ .... ญ

สารบัญตาราง.......... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความสำคัญของปัญหา.......... 1

วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

ขอบเขตการศึกษา 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.......... 2

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร 3

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับมะระ 3

ชนิดของมะระในประเทศไทยออกเป็น 4 ชนิด.......... 4

ลักษณะทั่วไปของมะระ 4

สรรพคุณของมะระทางการแพทย์.......... 4

ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt).......... 5

สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Schl.).......... 5

ลักษณะต้านทานต่อโรคของพืช 6

เครื่องหมายโมเลกุล.......... 7

แผนที่จีโนมแบบต่างๆ.......... 9

การสร้างแผนที่พันธุกรรม (genetic mapping หรือ linkage map) 10
การวิเคราะห์ QTL 12
การตรวจสอบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ (SNP) โดยการใช้หลักการ competitive allelic specific primer 13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 19
บทที่ 4 ผลการทดลอง 30
1. การวิเคราะห์ข้อมูลด้านฟีโนไทป์ 30
2. การวิเคราะห์ข้อมูลด้านจีโนไทป์ 37
3. การวิเคราะห์ QTL ของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์โดยวิธี Interval mapping และ MQM analysis 45
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 48
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 52
ภาคผนวก 54
บรรณานุกรม 75
ประวัติผู้วิจัย 81

MAEJO UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา 13

ภาพที่ 2 การประยุกต์ใช้หลักการของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) เพื่อใช้ในการตรวจวัดสัญญาณของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP 14

ภาพที่ 3 ลักษณะกราฟจุดจากการอ่านค่าการเรืองแสงของ fluorescence โปรแกรมสำเร็จรูป Araya สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลของบริษัท East-West Seed Company Limited 15

ภาพที่ 4 แสดงการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ในมะระ 23

ภาพที่ 5 ระดับความรุนแรงของโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ เป็น 5 ระดับ 24

ภาพที่ 6 แสดงระบบการทำงานของ Ultra High Throughput Technology for SNPs (Douglas Scientific) ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา PCR และการทำ PCR 28

ภาพที่ 7 แสดงการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ในมะระจำนวน 4 สายพันธุ์ 21 วัน หลังจากวันที่ได้รับเชื้อ 32

ภาพที่ 8 ลักษณะของผลมะระที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ในมะระจำนวน 4 สายพันธุ์ 33

ภาพที่ 9 การกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ระหว่างสายพันธุ์พ่อ (EW-000254) ที่มีความต้านทาน และสายพันธุ์แม่ (EW-000256) ที่อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลือง 34

ภาพที่ 10 การกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 35

ภาพที่ 11 การกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) 37

ภาพที่ 12 ตัวอย่างผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SNP : BGSNP-1214 ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างสายพันธุ์พ่อ EW-000254 และสายพันธุ์แม่ EW-000256 38

ภาพที่ 13 ตัวอย่างผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SNP : BGSNP-1103 ที่สามารถแยกความไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างสายพันธุ์พ่อ EW-000254 และสายพันธุ์แม่ EW-000256 39

ภาพที่ 14 แสดงผลการสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups : LG) ในมะระจำนวน 13 กลุ่มลิงค์เกจ 44

ภาพที่ 15 การวิเคราะห์ QTL ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 ด้วยวิธีการ Interval mapping และวิธีการ MQM analysis ซึ่งเป็นตำแหน่ง major QTL. ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ 46

ภาพที่ 16 การวิเคราะห์ QTL ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 ด้วยวิธีการ Interval mapping และวิธีการ MQM analysis.. 47

ภาพที่ 17 ไพรเมอร์ SNP ชื่อ MOMCH358328_577 ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ 47

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของผลมะระ 3

ตารางที่ 2 อัตราส่วนค่าคาดหมายการกระจายตัวของอัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรชนิดต่างๆ 11

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการคำนวณค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แม่ โดยใช้ค่าเฉลี่ย AUDPC 20

ตารางที่ 4 แสดงระดับความรุนแรงของโรค (disease score) ที่กำหนดไว้ 5 ระดับ 24

ตารางที่ 5 การเตรียมชุดไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร100 µl 26

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารใน 1 ปฏิกิริยา PCR 26

ตารางที่ 7 ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR 27

ตารางที่ 8 วิเคราะห์ความแปรปรวนความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของมะระจำนวน 4 สายพันธุ์ จากการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง 30

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ของมะระที่ทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง จำนวน 4 สายพันธุ์โดยใช้ วิธี Least Significant Different (LSD) 31

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบค่า Chi-square test (χ^2) ของการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ในมะระ 36

ตารางที่ 11 จำนวนไพรเมอร์ SNP ที่ตรวจสอบและจำนวนไพรเมอร์ SNP ที่ถูกคัดเลือกเพื่อทดสอบกับประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ในมะระ 38

ตารางที่ 12 แสดงไพรเมอร์ SNP ที่ให้ผลจีโนไทป์เหมือนกันและมีความเหมือนกัน (similarity)..... 41

ตารางที่ 13 แสดงไพรเมอร์ SNP ที่มีการกระจายตัวผิดรูปแบบ (segregation distortion) จำนวน 47 ไพรเมอร์ SNP 41

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธี Interval mapping และ MQM analysis กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ 46

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

มะระ (*Momordica charantia* L.) เป็นพืชไม้เลื้อยเขตร้อนในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ชื่อสามัญคือ bitter gourd (ศศิวิมล และคณะ, 2546) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปเอเชียและแอฟริกา นิยมปลูกกันมากในประเทศจีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์และอินเดีย ในประเทศอินเดียเรียกว่า "Karela" (AgriFarming, 2015) ในปี 2557 ปริมาณผลผลิตของมะระในทวีปเอเชียทั้งหมด 320,000 เฮกตาร์ แบ่งออกเป็น อินเดีย 31% จีน 22% ปากีสถาน 9% เวียดนาม 6% ฟิลิปปินส์ 4% อินโดนีเซีย 2% ไทย 1% และประเทศอื่นๆ 25% (Reyes, 2014) ในทางการแพทย์มะระมีสารต้านอนุมูลอิสระ ลดกระบวนการสร้างเซลล์ไขมันและภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) อีกทั้งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน ช่วยลดน้ำตาลในเลือด รวมไปถึงเป็นยารักษามะเร็งและยาต้านจุลชีพ (Singh et al., 2015) แพทย์พื้นบ้านในทวีปเอเชียจึงใช้มะระเพื่อเป็นยารักษาโรค ในประเทศปานามาและโคลัมเบีย ใช้ชาใบมะระป้องกันและรักษาโรคมาลาเรีย อีกทั้งความขมของมะระมีฤทธิ์กระตุ้นในการย่อยอาหารและรักษาแผลในกระเพาะอาหาร (กรณ์กาญจน์, 2552) มะระจึงเป็นพืชสำคัญและนิยมปลูก แต่สาเหตุหลักที่ทำให้คุณภาพและผลผลิตของมะระลดลงร้อยละ 30 – 50 คือ โรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) (Tamilselvi and Pugalendhi, 2015) มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* พบครั้งแรกที่เมืองซีฮู ประเทศไต้หวัน ในปีค.ศ. 1985 (Sun and Huang, 1983) โดยเชื้อสาเหตุของโรคจะอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน (soil borne disease) ทำให้การป้องกันและกำจัดโรคเป็นไปได้ยาก พืชจะแสดงอาการเหี่ยวเฉา ใบแก่มีเส้นใบเหลืองและตายในที่สุด เมื่อตัดดูส่วนของลำต้นจะพบว่า ท่อน้ำเลี้ยงมีสีน้ำตาล แนวทางการป้องกันการระบาด คือ ใช้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคหรือใช้การปลูกพืชหมุนเวียน ในประเทศไต้หวันจึงใช้เทคโนโลยีการต่อยอด (grafting) ในการผลิตมะระโดยใช้ต้นตอที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลือง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ลดการใช้สารเคมีและช่วยเพิ่มผลผลิตถึง 82-127 ตันต่อเฮกตาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับมะระที่ไม่ต่อยอดที่ให้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 16 ตันต่อเฮกตาร์ (Lin, 2008) แต่วิธีการนี้ต้องใช้ความชำนาญและความสามารถในการเข้ากันได้ (compatibility) ระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ อีกทั้งเกษตรกรต้องแบกรับต้นทุนการผลิตในการซื้อเมล็ดพันธุ์ทั้งของต้นตอและกิ่งพันธุ์อีกด้วย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้การปรับปรุงพันธุ์ให้มะระมีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลือง ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้มีสายพันธุ์ลักษณะที่ดีตรงตามความต้องการ สามารถให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพ ต้านทานต่อโรคและแมลงนั้นใช้วิธีการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological character) หรือลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) และสิ่งแวดล้อมมีผลต่อ

การเจริญเติบโตในช่วงเวลานั้น โดยส่วนใหญ่ลักษณะเหล่านี้ มีการแสดงออกไม่สม่ำเสมอ เพราะผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป ทำให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะเหล่านี้ผิดพลาด โดยลักษณะที่จัดว่าเป็นลักษณะที่คัดเลือกยาก ได้แก่ ความต้านทานโรคต่างๆหรือแมลง (อรรัตน์, 2548) ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เข้ามามีบทบาทสำคัญในด้านการปรับปรุงพันธุ์มากขึ้น เพราะทำให้ทราบพันธุกรรมของความต้านทานที่เป็นผลกับยีนบนโครโมโซมที่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้และเพื่อช่วยในการคัดเลือกพืชจากจีโนไทป์ (genotype) โดยตรง มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างได้ในระดับโมเลกุล ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว (สุรีพร, 2546) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP (single nucleotide polymorphism) ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างได้เพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ SNP จึงเป็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการแทนที่ของคู่เบส (base pair substitution) ที่เป็นความผันแปรทางพันธุกรรมประเภทหนึ่งที่พบได้บ่อยและสามารถเกิดขึ้นได้ทุก 300-500 เบส ตลอดจีโนมของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จึงเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแม่นยำสูงและสามารถเข้ามาช่วยคัดเลือกยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ อีกทั้งสามารถนำไปใช้ในงานด้านปรับปรุงพันธุ์มะระได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล single nucleotide polymorphism (SNP) ที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ในมะระ

ขอบเขตการศึกษา

เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระจากประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับมะระ

มะระ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Momordica charantia* L. ชื่อสามัญคือ bitter gourd, bitter squash, goya melon, karela และ balsam pare มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 เป็นพืชไม้เลื้อย เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ปลูกกันมากในทวีปเอเชีย แอฟริกา และแถบแคริเบียน เป็นพืชผักที่นิยมปลูกในประเทศจีน อินเดีย ไทย ฟิลิปปินส์และเวียดนาม เพราะมะระสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพภูมิอากาศร้อนและชื้น (Stephens, 1994) ตามรายงานของ USDA-ARS National Nutrient Database มะระมีคุณค่าทางอาหารสูงเพราะอุดมไปด้วยวิตามินซี โฟเลต (วิตามิน B9) และธาตุเหล็ก (Singh et al., 2015) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของผลมะระ

องค์ประกอบ	ปริมาณ	หน่วย
น้ำ	83.20	กรัม ต่อ 100 กรัม
คาร์โบไฮเดรต	10.60	กรัม ต่อ 100 กรัม
โปรตีน	2.10	กรัม ต่อ 100 กรัม
ไฟเบอร์	1.70	กรัม ต่อ 100 กรัม
แคลเซียม	23.00	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
ฟอสฟอรัส	38.00	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
โพแทสเซียม	171.00	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
โซเดียม	2.40	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
เหล็ก	2.00	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
ทองแดง	0.19	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
แมงกานีส	0.08	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
สังกะสี	0.46	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
เบตาแคโรทีน	126.00	
วิตามินซี	96.00	

ชนิดของมะระในประเทศไทยออกเป็น 4 ชนิด

1. มะระพันธุ์ขี้นก เป็นมะระพันธุ์ป่า ผลเล็ก รูปร่างป้อมเรียว ผิวขรุขระเป็นหนามแหลม มีรสขมจัด เนื้อบาง ชอบขึ้นตามรั้วบ้านหรือชายป่า

2. มะระพันธุ์จีน มีลักษณะผลโต ยาว ขนาดประมาณ 15-30 เซนติเมตร ผิวสีเขียวอ่อน รสขมน้อยกว่ามะระพันธุ์ขี้นก นิยมปลูกและรับประทานกันมาก

3. มะระพันธุ์สองพี่น้อง เป็นมะระที่เก็บเมล็ดมาจากมะระจีนและกลายพันธุ์เป็นมะระสองพี่น้องมีลักษณะผลโต

4. มะระพันธุ์ย่างกุ้ง ลักษณะผลเล็ก ผลยาว ผิวขรุขระเป็นหนามแหลม ปลายผลและหัวผลมีรสชาติดีและขมน้อย (อุดม, 2541)

ลักษณะทั่วไปของมะระ

มะระเป็นไม้เลื้อยล้มลุก มีมือยึดเกาะ (tendril) ต้นหรือเถามีลักษณะเป็นเหลี่ยมสัน มีขน ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบกว้างเป็นรูปไต คล้ายทรงกลม ยาว 2.5-10 เซนติเมตร ใบมีขนทั้ง 2 ด้าน โคนใบมีลักษณะเว้าคล้ายรูปหัวใจ ใบหยักลึกเป็นรูปมือ 5-9 หยัก ปลายโคนใบแหลม ติ่งขอบใบเว้าเป็นรูปคลื่นคล้ายซี่ฟัน ก้านใบยาว 1-7 เซนติเมตร ดอกมีสีเหลือง แยกเพศ แต่ละกลีบมี 5 กลีบ ดอกจะออกตามซอกใบ มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบสีเขียวอ่อน เกสรตัวผู้มี 3 อับเรณูอยู่ชิดกันตรงกลางดอก ดอกตัวเมียมีก้านดอกยาว 2-50 มิลลิเมตร มีใบประดับอยู่ทางด้านฐานดอก กลีบดอกยาว 7-12 มิลลิเมตร กว้าง 3-6 มิลลิเมตร ทรงผลมีรูปร่างคล้ายกระสวย ผิวขรุขระมาก ห้อยลงเป็นรูปไข่กว้างสอบเรียวลงเป็นจงอยยาว 3.5-11 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร มีเส้นใบแถวไม่เรียบตามยาว 8-9 แถว ระหว่างแถวมีตุ้มเล็กๆ ขนาดไม่เท่ากัน (สถาบันวิจัยและพัฒนาที่สูง, 2553) ผลอ่อนมีสีเขียวไปจนถึงสีขาว เมื่อแก่จะมีสีเหลืองอมแดง ปลายผลจะแตกเป็น 3 แฉก รก (placenta) มีสีแดงสด ภายในผลจะมีเนื้อเยื่อผล (aril) มีสีแดงหุ้มเมล็ด (กรณ์กาญจน์, 2552)

สรรพคุณของมะระทางการแพทย์

มะระเป็นพืชสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้กันมานาน เนื่องจากมะระเป็นยาอายุรเวท ผลมะระใช้รักษาโรคเบาหวาน โรคตับ ในตำรับยาไทยใช้ใบมะระเพื่อลดไข้ รากใช้แก้โลหิตเป็นพิษและตับ ในปี ค.ศ.1962 มีการศึกษาค้นพบ สารซาแรนติน (charatin) ในผลมะระมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง ในมะระขี้นกมีสารที่ต้านอาการของโรคเบาหวานและมีหลายกลไกที่ออกฤทธิ์ต้านเบาหวาน ได้แก่ ช่วยเสริมการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ลดการสร้างน้ำตาลจากตับ ส่งเสริมการเผาผลาญน้ำตาล เพิ่มความไวต่ออินซูลิน เพิ่มความทนต่อกลูโคส (glucose tolerance) นอกจากนี้ยังยับยั้งการหลั่งกลูโคสในลำไส้เล็ก รวมไปถึงยับยั้งเอนไซม์กลูโคไซเดส ผลมะระขี้นก

สีเขียว มีคุณค่าทางอาหาร คือ วิตามินเอ (2,924 IU) ไนอะซิน (190 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม) และมีคุณสมบัติสามารถต้านอนุมูลอิสระ (วีณา, 2555)

ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt)

ปัญหาหลักของพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) คือ โรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* ทำให้มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจในด้านการเกษตร เมื่อเกิดการระบาดขึ้น จะลุกลามอย่างรวดเร็ว เชื้อ *Fusarium* spp. ในตระกูลแตงมีหลายชนิด (6-8 species) ซึ่งแต่ละชนิดจะเข้าทำลายพืชตระกูลแตงแตกต่างชนิดกัน เช่น แตงกวาและแตงร้าน *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinun* แตงโม *F. oxysporum* f.sp. *niveum* แคนตาลูป *F. oxysporum* f.sp. *melonis* ในฟักทองและสควอซท์ *F. solani* f.sp. *cucurbitae* เป็นต้น โดยเชื้อจะเข้าทำลายพืชทุกระยะของการเจริญเติบโต ในระยะกล้ามีอาการคล้ายกันคือ ทำให้ต้นกล้าหักพับล้มและแห้งตาย (dumping off) ในต้นโตจะมีอาการเหลือง เหี่ยวเฉาและแห้งตายทั้งต้น อีกทั้งเชื้อจะเข้าทำลายส่วนโคนและเชื้อราจะเจริญภายในท่อน้ำ (xylem) โดยอาการของโรคจะค่อยๆรุนแรงขึ้น ใบเหี่ยว เนื้อใบที่เขียวจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยวอย่างถาวรจนตายทั้งต้น เมื่อผ่าดูลำต้นจะเห็นเชื้อรา Fusarium เจริญอุดตันในท่อลำเลียงน้ำ (ศักดิ์, 2537)

โรคเหี่ยวเหลืองในมะระเกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f sp. *momordica* แพร่ระบาดได้ดีในสภาพดินที่การระบายน้ำไม่ดี แปลงมีน้ำขัง ดินมีสภาพเป็นกรดและอุณหภูมิประมาณ 25-34 องศาเซลเซียส (วัลลา, 2550) อาการของโรคแสดงชัดเจนที่ใบ โดยจะแสดงอาการใบล่างก่อน ใบจะกลายเป็นสีเหลืองเหี่ยว ร่วง มีรอยช้ำสีน้ำตาลและเหี่ยวตายทั้งเถา เมื่อตัดดูส่วนของลำต้นจะพบว่าท่อน้ำเลี้ยงจะมีสีน้ำตาล อีกทั้งเชื้อสาเหตุของโรคจะอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลานาน (soil-borne disease) ทำให้การป้องกันและกำจัดโรคเป็นไปได้ยาก (Tamilselvi et al., 2016)

สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Schl.)

F. oxysporum จัดอยู่ในประเภทรา อยู่ในไฟลัม Ascomycota (Alexopoulus and Blackwell, 2002) โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Schl.) เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PAD (Potato Dextrose Agar) จะมีลักษณะของเส้นใยเป็นสีครีมหรือสีชมพู สามารถตรวจสอบลักษณะของสปอร์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ พบก้านชูสปอร์ (conidiophore) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส (hyaline) ลักษณะของเส้นใยสั้น (hyphae) สามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศได้ 3 รูปแบบ คือ

1. macroconidia เป็นสปอร์ที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างคล้ายลำเรือ ปลายเซลล์เรียวบางและงอคล้ายตะขอ ประกอบด้วย 4 เซลล์ สปอร์มีขนาด (26.2-) 31.5-59.4 x 4.6-6.2 (-6.8) ไมโครเมตร

2. microconidia สปอร์ขนาดเล็กเซลล์เดียว สปอร์มีขนาด 7.2-15 (-17.5) x 2.4-3.9 (-6.3) ไมโครเมตร

3. chlamydospore สปอร์ขนาด 6-7.3 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาล เกิดจากเซลล์ปกติของเส้นใยและสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้นเพื่อให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป จึงทำให้สามารถงอกเส้นใยใหม่ได้เป็นสาเหตุทำให้เชื้อ Fusarium สามารถอยู่รอดในดินและข้ามฤดูได้ (Watanabe, 2010)

ลักษณะต้านทานต่อโรคของพืช

ลักษณะความต้านทานต่อโรคของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ประสิทธิภาพของยีนต้านทาน ระดับความรุนแรงของเชื้อ พันธุกรรมของพืชและพันธุกรรมของเชื้อโรค ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับพืช และสภาพแวดล้อมล้วนมีอิทธิพลต่อการแสดงออกความต้านทานต่อโรค ลักษณะความต้านทานโรค (resistance) หมายถึง ความสามารถของพืชที่จะคงสภาพจากการเข้าทำลายของโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย หรือเมื่อเข้าทำลายแล้วจะทำให้พืชเป็นโรคไม่รุนแรง ในส่วนลักษณะไม่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรค (susceptible) หมายถึง พืชแสดงอาการเป็นโรคอย่างรุนแรง เมื่อถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย สามารถแบ่งลักษณะความต้านทานโรคของพืชออกเป็น 5 แบบ (กฤษฎา, 2546) ดังนี้

1. แบ่งตามลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ควบคุมโรค แบ่งย่อยออกเป็น 3 แบบคือ 1) ความต้านทานเนื่องจากยีนหลัก (oligogenic) แสดงผลของลักษณะต้านทานโรค เรียกว่าเป็นยีนหลัก (major gene) 2) ความต้านทานเนื่องจากยีนย่อย (polygenic) ลักษณะความต้านทานโรคจะถูกควบคุมด้วยยีนหลายตัว ยีนแต่ละตัวจะมีผลต่อการแสดงออกเพียงเล็กน้อย เรียกว่า เป็นยีนรอง (minor gene) 3) ความต้านทานเนื่องจากยีนในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic)

2. แบ่งตามการแสดงออกในระดับความต้านทาน แบ่งเป็น 2 ระดับ คือ ความต้านทานในแนวตั้ง (vertical resistance) คือ ความต้านทานจำเพาะต่อเชื่อใดเชื้อหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดโรค หรือเรียกว่า race specific resistance และความต้านทานในแนวนอน (horizontal resistance) คือ มีความต้านทานแบบไม่จำเพาะ หรือเรียกว่า nonspecific resistance, general resistance, field resistance, partial resistance, และ minor gene resistance

3. แบ่งโดยอาศัยกลไก (mechanism) ความต้านทานของพืช แบ่งเป็น 2 แบบ คือ ความต้านทานโรคหลังจากเชื้อเข้าสู่พืชแล้ว (active resistance) และความต้านทานโรคที่พืชมีอยู่แล้วก่อนเชื้อโรคจะเข้าทำลาย (passive resistance)

4. แบ่งโดยอาศัยการแสดงออกในระยะต่างๆของการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ลักษณะความต้านทานที่แสดงออกในระยะต้นกล้า (seeding resistance) และลักษณะความต้านทานที่เกิดขึ้นเมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่เท่านั้น (adult plant resistance)

5. แบ่งโดยอาศัยการกระจายตัวของลักษณะประชากรในพืช ได้แก่ ลักษณะความต้านทานที่มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคในประชากรแบบไม่ต่อเนื่อง (qualitative resistance) และลักษณะความต้านทานที่มีการกระจายตัวของลักษณะในประชากรแบบต่อเนื่อง (quantitative resistance) โดยประชากรจะมีความต้านทานต่อโรคหลายระดับตั้งแต่ความต้านทานต่อโรคมากไปจนถึงอ่อนแอต่อโรค

เครื่องหมายโมเลกุล

อรรัตน์ (2548) ให้ความหมายทั่วไปของคำว่า “เครื่องหมาย” คือ ตัวบ่งบอกที่มีความจำเพาะเจาะจง สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) คือ ตัวบ่งวัดลักษณะของสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุล ซึ่งโดยทั่วไปสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตคนละชนิดหรือพันธุ์ได้

เครื่องหมายโมเลกุลแบ่งออกเป็น 3 ประเภท (Mondini et al., 2009; อรรัตน์, 2548) คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) คือ การบอกลักษณะของสิ่งมีชีวิตโดยการใช้ลักษณะภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ทางสรีรวิทยาโดยใช้การเปรียบเทียบ เช่น ลักษณะของสีกลีบดอก ความสูง ขนาด รูปร่าง สีผล อายุวันเก็บเกี่ยว เป็นต้น แต่ลักษณะที่แสดงออกทางสัณฐานวิทยานี้มักจะมีข้อจำกัดเพราะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จำเป็นต้องใช้ความชำนาญในการจำแนกเป็นพิเศษ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยานี้ถือว่าเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมากในงานปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากสามารถใช้วิธีการสังเกตด้วยตาเปล่า หรือใช้เครื่องมือวัดแบบง่ายๆ ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์จะใช้วิธีการอื่นๆเข้ามาช่วยในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแยกความแตกต่างได้

2. เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) คือ เครื่องหมายที่ใช้ศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี โดยใช้วิธีการแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส และใช้สีย้อมดูแถบโปรตีนที่จำเพาะ เช่น โปรตีนที่สะสมในเมล็ด เป็นต้น วิธีการนี้ค่อนข้างง่ายค่าใช้จ่ายไม่ค่อยสูง แต่เครื่องหมายทางชีวเคมีจะมีข้อจำกัดในการตรวจสอบโปรตีนหรือเอนไซม์ที่จำนวนยีนที่ตรวจสอบที่มีไม่มากและไม่ครอบคลุมทั้งจีโนม อีกทั้งต้องมีการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษารวมไปถึงการแสดงออกของเอนไซม์นั้นจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เช่น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ง่ายและระยะการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้มียังมีความจำเพาะเจาะจงต่ำ

หากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเล็กน้อย อาจไม่เกิดกับการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโน

3. เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) เป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดี คือ ดีเอ็นเอจะมีความเสถียรมากกว่าการตรวจสอบแบบทางชีวเคมี เนื่องจากดีเอ็นเอมีองค์ประกอบที่เหมือนกันอยู่ในเซลล์ทุกเซลล์ จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ในทุกๆระยะของการเจริญเติบโต โดยสิ่งแวดล้อมจะไม่มีผลกับดีเอ็นเอ ดังนั้นเครื่องหมายพันธุกรรมจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาระดับจีโนมและงานปรับปรุงพันธุ์พืช อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้กับงานด้านต่างๆได้

ประเภทของเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรมสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในระบบดั้งเดิม โดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอและตรวจสอบโพรบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ วิธีการคือ สกัดดีเอ็นเอแล้วนำมาตัดกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีสและถ่ายดีเอ็นเอลงบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ แล้วทำการไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลากหรือดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบด้วยสารกัมมันตรังสีและผลการตรวจสอบจะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอหลายๆแถบที่มีลักษณะจำเพาะ Hybridization-based marker ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker)

2. PCR-based marker ถูกคิดค้นโดย Kary Banks และ Michael Smith ต่อมาในปี ค.ศ.1993 ทั้งสองท่านได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมี (Shampo and Kyle, 2002) เรียกปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase chain reaction (PCR) อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบหลักคือ 1. ไพรเมอร์ (primer) มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเล็กประมาณ 15-30 คู่เบส ที่ออกแบบให้มีลำดับเบสที่สามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณ 2. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ 3. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เช่น ดีเอ็นเอทั้งจีโนม (genomic DNA) หรือพลาสมิก (plasmid) 4. นิวคลีโอไทด์ ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้เทคนิค PCR ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟเอลพี (Hybridization-based markers ; RFLP) เครื่องหมายอาร์เอพีดี (Randomly amplified polymorphic DNA ; RAPD) เครื่องหมายเอเอฟเอลพี (Amplified fragment length polymorphism; AFLP) เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (Simple sequence repeats :SSRs หรือ microsatellites) และเครื่องหมาย Sequence based markers เช่น SNP (Single nucleotide polymorphism) (Nadeem et al., 2018) SNP คือ เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยก

ความแตกต่างของลำดับเบสเพียงลำดับเดียว (substitution , deletion หรือ insertion) SNP ส่วนมากจะอยู่ในจีโนมส่วนของ non coding แต่มีความสำคัญที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ (mutation) ในยีนที่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของลักษณะที่สนใจและการเกิดโรค (Grover and Sharma, 2016)

แผนที่จีโนมแบบต่างๆ

แบ่งตามระดับความละเอียดจากน้อยไปจนถึงมีความละเอียดมากที่สุด 4 ระดับ (Hartwell et al., 2014; สุรินทร์, 2552; อรรัตน์, 2548) คือ

1. Karyotypic map หรือ cytogenetic map เป็นแผนที่ค่อนข้างหยาบจากการศึกษาแคริโอไทป์ รูปร่าง ขนาดและการจัดเรียงของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ ด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์จากการย้อมสีโครโมโซมที่ได้จากเซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์ในระยะ mitosis ทำให้เกิดเป็นแถบสี มีการกำหนดเลขประจำตำแหน่งของโครโมโซมนั้นๆชัดเจนและเป็นระบบ

2. Genetic mapping หรือ linkage map เป็นแผนที่ที่ได้จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ที่ละเอียดมากกว่า karyotypic map โดยมีการจัดเรียงลำดับของยีนหรือเครื่องหมายโมเลกุลบนโครโมโซม โดยระยะห่างระหว่างยีนหรือเครื่องหมายโมเลกุลจะได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชั่น (recombination) มีหน่วยแผนที่ (map unit) เป็นเซนติมอร์แกน (centiMorgan; cM)

3. Physical map หรือ แผนที่ทางกายภาพ ได้จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลแสดงการจัดเรียงลำดับของยีนหรือเครื่องหมายโมเลกุลหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนในเวคเตอร์ชนิดต่างๆที่ละเอียดและถูกต้องตามระยะทางที่แท้จริง มีหน่วยระยะทางเป็นกิโลเบส (kilobase; kb)

4. Sequence map หรือ แผนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสจากการทำ physical map ซึ่งเป็นแผนที่ที่ละเอียดที่สุด

การสร้างแผนที่พันธุกรรม (genetic mapping หรือ linkage map)

แผนที่พันธุกรรมเปรียบเสมือนกับเส้นทางบนโครโมโซมที่เกิดจากพ่อและแม่ที่มีความแตกต่างกัน สามารถบ่งชี้ตำแหน่งและระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายได้และแสดงการจัดเรียงลำดับของเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆบนโครโมโซม ซึ่งใช้หลักการของยีนและเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวในรูปแบบต่างๆผ่านการเกิด crossing over ในกระบวนการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้สามารถตรวจสอบการกระจายตัวในรุ่นลูกได้ โดยยีนหรือเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ห่างกัน จะมีการกระจายตัวแยกจากกันขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างกัน ความถี่ในการเกิดรีคอมบิเนชั่น (recombination) สามารถนำมาใช้คำนวณ genetic distance ระหว่างยีนหรือเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากเปอร์เซ็นการเกิดรีคอมบิเนชั่น โดยความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นจะมีน้อย เมื่อยีนหรือเครื่องหมายอยู่ใกล้กันบนโครโมโซมและจะมีความถี่ของการเกิดมากเมื่ออยู่ห่างกัน ซึ่งเมื่อยีนหรือเครื่องหมายทั้งสองมีความถี่มากกว่าหรือการเกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 50 % แสดงว่าเครื่องหมายทั้งสองนั้น อาจอยู่ห่างกันมากซึ่งอาจจะอยู่บนโครโมโซมเดียวกันหรืออยู่คนละโครโมโซม (unlink) มีหน่วยทางพันธุกรรมเป็นเซนติมอร์แกน (centiMorgan; cM) (Rajpal et al., 2016) โดยมีขั้นตอนในการสร้างแผนที่พันธุกรรมดังนี้

1. เลือกสายพันธุ์พ่อแม่เพื่อทำแผนที่ จะต้องมีลักษณะที่มีคุณค่าทางการเกษตรและพันธุ์ที่ใช้จะต้องมีลักษณะที่สนใจที่แตกต่างกัน 1 หรือหลายลักษณะทั้งลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนเพียง 1 คู่ (monogenic trait) หรือควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenic trait หรือ quantitative trait) (สุรินทร์, 2552) ประชากรที่เหมาะสำหรับทำแผนที่ ได้แก่ ประชากร double haploid (DHLs) จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม ประชากรผสมกลับไปยังพ่อหรือแม่ (backcross ; BC) จากลูกผสมชั่วที่ 1 ผสมกลับไปยังพ่อหรือแม่ ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จากการผสมตัวเองของลูกชั่วที่ 1 มีข้อดีคือ ใช้เวลาในการสร้างประชากรสั้นแต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถทำซ้ำหรือขยายเพิ่มปริมาณประชากรได้และประชากร recombinant inbred line (RILs) โดยส่วนมากนิยมใช้ประชากร RILs มากที่สุด เพราะสามารถทำซ้ำหรือขยายเพิ่มปริมาณประชากรได้ (Chandra and Pandey, 2017)

2. ตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่จำแนกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ (polymorphic marker) เพื่อนำมาใช้ทดสอบการกระจายตัวของประชากรแต่ละต้น เรียกขั้นตอนนี้ว่า genotyping โดยนำประชากรแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอและทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ codominance หรือ dominance ที่คัดเลือกไว้แต่ละชนิดของประชากรที่มีการกระจายตัวของอัลลีลที่แตกต่างกัน (Rajpal et al., 2016) (ตารางที่ 2) (Collard, B. et al., 2005)

ตารางที่ 2 อัตราส่วนค่าคาดหมายการกระจายตัวของอัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรชนิดต่างๆ

ชนิดประชากร	codominant markers	Dominant markers
F2	1:2:1 (AA:Aa:aa)	3:1 (B_:bb)
Backcross	1:1 (Cc:cc)	1:1 (Dd:dd)
RILs หรือ DHLs	1:1 (EE: ee)	1:1 (FF:ff)

3. การสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups) โดยการแปลงข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ทดสอบให้เป็นข้อมูลสำหรับโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อช่วยในการคำนวณ การสร้างกลุ่มลิงค์เกจอาศัยหลักการของ odds ratio ในการเปรียบเทียบระหว่างอัตราส่วนของการเกาะกลุ่มและการแยกกลุ่ม ค่าที่ได้แสดงเป็นค่า logarithm โดยพิจารณาจากคะแนน logarithm of odd ratio (LOD) และความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (percentage of phenotypic variation explained; PVE) ค่า LOD คือ ค่า logarithm (base 10) of odd ratio หรือ logarithm (base 10) of the likelihood ratio ซึ่งค่า likelihood ratio คือ โอกาสที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ศึกษาจะเชื่อมโยงกันในรูปเลขยกกำลัง ค่า LOD จึงเป็นค่าทางสถิติที่ใช้บ่งชี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ศึกษาสัมพันธ์กันหรือไม่ เช่น ค่า LOD เป็น 3 แสดงว่าโอกาสที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ศึกษาเชื่อมโยงกันเป็น 10^3 โดยค่า LOD ที่มีค่าตั้งแต่ 3 ขึ้นไปจะใช้เป็นค่ามาตรฐานในการสร้างแผนที่พันธุกรรมและมีความน่าเชื่อถือของข้อมูล ดังนั้นค่า LOD จึงเป็นค่า logarithm (base 10) ของอัตราส่วนของความน่าจะเป็นระหว่างโอกาสที่เครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่มีความเชื่อมโยงกัน (linkage) ต่อโอกาสเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ไม่มีความเชื่อมโยงกัน (non linkage) ระยะห่างระหว่างแต่ละเครื่องโมเลกุลเกิดจากการประเมินจากความถี่ในการเกิดรีคอมบิเนชั่น ดังแสดงในสูตร (Morton, 1955)

$$\text{LOD} = Z = \log_{10} \frac{\text{probability of birth sequence with a given linkage value}}{\text{probability of birth sequence with no linkage)}}$$

$$= \log_{10} \frac{(1-\theta)^{NR} \times \theta^{R}}{0.5^{(NR+R)}}$$

เมื่อ NR คือ จำนวนลูกที่มีจีโนไทป์อยู่ในรูป non-recombinant type (parental type)

R คือ จำนวนลูกที่มีจีโนไทป์อยู่ในรูป recombinant type

และ θ คือ recombination fraction คำนวณได้ดังนี้

% recombinant (θ) = (จำนวนลูกที่อยู่ในรูป recombinant type / จำนวนลูกทั้งหมด) x 100

ในส่วนของ mapping function ที่ใช้ในการเปลี่ยนค่ารีคอมบิเนชั่น เป็นเซนติมอร์แกน (centiMorgan; cM) ซึ่ง mapping function มี 2 แบบ คือ Kosambi mapping function ที่มีสมมุติฐานว่าการเกิดรีคอมบิเนชั่นที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อการเกิดรีคอมบิเนชั่นในตำแหน่งที่อยู่ใกล้กัน ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมในพืชและสัตว์ แต่เนื่องจากความถี่ในการเกิด crossing-over ที่ไม่ได้มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เมื่อระยะห่างน้อยกว่า 10 cM ระยะทางของแผนที่จะเท่ากับความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น แต่ถ้าระยะห่างที่มากกว่า 10 cM จะใช้ Haldene mapping function (Rajpal et al., 2016) โปรแกรมที่ใช้สำหรับใช้ในการสร้างกลุ่มลิงค์เกจ เช่น Mapmarker/EXP (Lincoln et al., 1993) MapManager QTX (Manly et al., 2001) THREa Mappper Studio (Cheema et al., 2010) และ JoinMap (Van Ooijen, 2006)

การวิเคราะห์ QTL

สามารถแบ่งการวิเคราะห์ได้เป็น 4 วิธีการ (Rajpal et al., 2016) คือ

1. Single Marker Analysis (point analysis) เป็นวิธีใช้ในการหา QTL ที่มีความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลจากความสัมพันธ์กับลักษณะทีละหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตำแหน่งอย่างอิสระ ใช้สถิติอย่างง่ายในการวิเคราะห์ ได้แก่ t-test หรือ F-test โดยค่านัยสำคัญ (significant value) สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่สนใจ แต่วิธีการนี้ไม่สามารถประมาณตำแหน่งและผลของ QTL ได้

2. Interval mapping by maximum likelihood เป็นวิธีการหา QTL โดยการเปรียบเทียบตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล 2 ตำแหน่งในโครโมโซม จากนั้นทดสอบด้วยวิธี maximum likelihood ร่วมกับแผนที่พันธุกรรมในการวิเคราะห์ จึงทำให้มีความแม่นยำในการตรวจสอบหา QTL

3. Composite Interval mapping (CIM) วิธีการนี้ต้องมีแผนที่พันธุกรรมใช้ร่วมกับการวิเคราะห์และใช้โคแฟคเตอร์ (cofactors) คือ เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ทั้งจีโนมเป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบแล้วจะมี QTL สูงในการวิเคราะห์

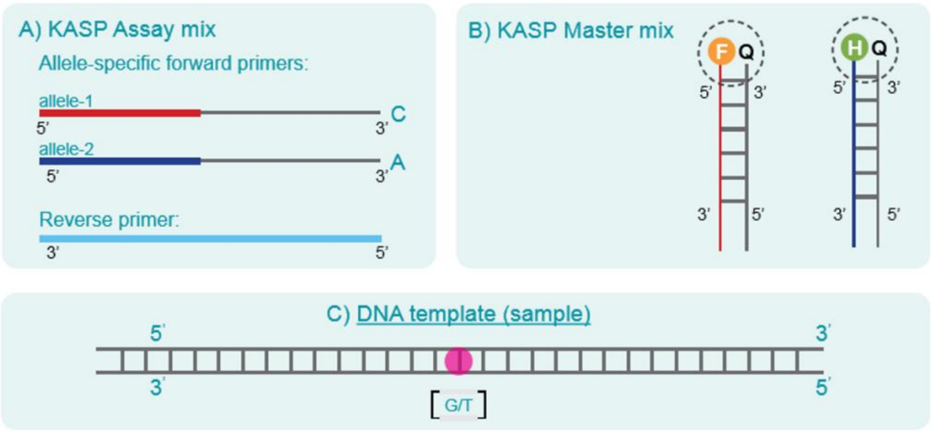
การตรวจสอบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ (SNP) โดยการใช้หลักการ competitive allelic specific primer

การประยุกต์ใช้ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) กับเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP โดยการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ใช้หลักการการแข่งขันกันของอัลลีลที่จำเพาะ (competitive allelic specific primer) กับเบสที่แตกต่างเพื่อใช้ในการตรวจวัดสัญญาณของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP (ภาพที่ 1) โดยในหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system (KASP) Assay mix ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเบสชนิดที่ 1 เรียกว่า forward 1 (F1) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเบสชนิดที่ 2 เรียกว่า forward 2 (F2) และ reverse primer (R)

2. KASP Master mix

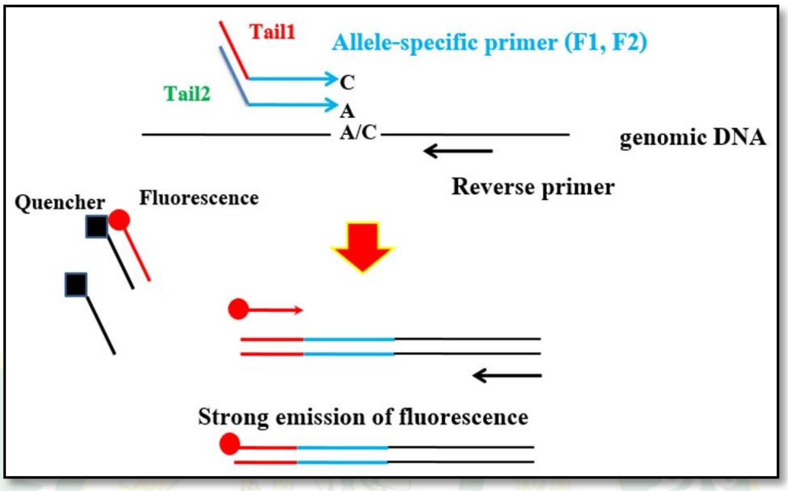
3. DNA template



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา (Genomics, 2013)

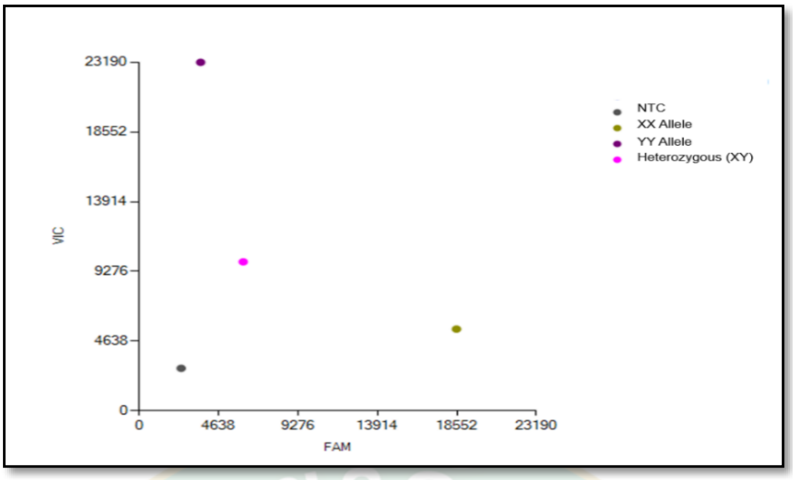
โดย forward primer ทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน 2 บริเวณ คือ ที่บริเวณปลาย 3’ ซึ่งจะจำเพาะต่อลำดับเบสหรือ SNP นั้นๆ เช่น จากภาพ A ใน allele-1 จะมีตำแหน่ง SNP บริเวณปลาย 3’ คือ C และ ใน allele-2 จะมีตำแหน่ง SNP บริเวณปลาย 3’ คือ A ซึ่งแตกต่างกัน และส่วนของปลาย 5’ ที่เรียกว่าหาง (tail) ซึ่งแต่ละหางจะจำเพาะต่อสาร fluorescence ที่ต่างชนิดกัน ในส่วนของสารละลาย KASP จะมีความจำเพาะเจาะจงหรือมีเบสที่ complementary กับหางของ primer ทำให้เมื่อ forward primer เข้าไปจับกับ complementary base ของ DNA template oligonucleotide ของ KASP ก็จะสามารถเข้าไปจับที่ tail ที่เป็นคู่สมกับ allele specific primer ที่ต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้สามารถตรวจจับสัญญาณของสาร fluorescence ที่ส่งออกมาโดยในปฏิกิริยารอบที่ 1 ของการทำ PCR ตัว forward primer ที่มีความจำเพาะกับ DNA template

และเกิดการเพิ่มปริมาณ ในปฏิกริยารอบที่ 2 KASP Master mix ที่จำเพาะกับปลายหางของ forward primer จะเข้าจับกัน ทำให้เกิดการแยกของสาร fluorescence และตัว quencher แยกออกจากกัน ทำให้เกิดการเรื่องแสงขึ้น โดยอาศัยสัญญาณของการเรืองแสงที่แตกต่างกันมาใช้ในการระบุความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ (SNP) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การประยุกต์ใช้หลักการของ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) เพื่อใช้ในการตรวจวัดสัญญาณของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP (Genomics, 2013)

การอ่านผล SNP ทำได้โดยการอ่านค่าของการเรืองแสงของสาร fluorescence 2 ชนิด เมื่อสิ้นสุดปฏิกริยาการทำ PCR โดยใช้เครื่องอ่านค่าสี fluorescence เรียกว่า เครื่อง Araya ซึ่งจะออกมาเป็นค่าการเรืองแสง จากนั้นนำค่าดังกล่าวไปวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม Araya ซึ่งถูกพัฒนาโดยบริษัท East-West Seed Limited และแสดงออกมาในลักษณะของกราฟจุด โดยมีแกน X เป็นการเรืองแสงของ allele ที่ 1 หรือ SNP1 และแกน Y เป็นการเรืองแสงของ allele ที่ 2 หรือ SNP2 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะกราฟจุดจากการอ่านค่าการเรืองแสงของ fluorescence โปรแกรมสำเร็จรูป Araya สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลของบริษัท East-West Seed Company Limited

จากกราฟจุด แกน X แสดงปริมาณการเรืองแสงของ fluorescence ชนิด FAM (6-carboxyfluorescein) และแกน Y แสดงปริมาณการเรืองแสงของ fluorescence ชนิด VIC (4,7,2′-trichloro-7′-phenyl-6-carboxyfluorescein) โดยจุดสีเขียวจะแสดงปริมาณการเรืองแสงของ fluorescence ชนิด FAM สูง และค่า VIC ต่ำ แสดงว่าตัวอย่างสีเขียวเป็น homozygous FF จุดสีม่วงจะแสดงปริมาณการเรืองแสงของ fluorescence ชนิด VIC สูงกว่า ค่า FAM ต่ำ แสดงว่าตัวอย่างสีม่วงเป็น homozygous VV แต่ถ้าอัตราส่วนของการเรืองแสงของ fluorescence ทั้งสองออกมาใกล้เคียงกับ 1 ดังปรากฏในสีชมพู แสดงว่าเป็น heterozygouse V/F ส่วนจุดสีดำ คือ ชุดควบคุม (control) เรียก NTC (non-template-control) เป็นตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอ ดังนั้นในปฏิกิริยา PCR จะต้องไม่เกิดการเรืองแสง (ภาพที่ 3)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเหี่ยวเหลืองในมะระ (Fusarium wilt)

พบครั้งแรกเมืองซีฮู ประเทศไต้หวันในปี ค.ศ. 1981 จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและการปลูกเชื้อเข้าสู่พืช (inoculation) เกิดจากจากเชื้อ *F.oxysporum* f. sp. *momordicae nov*.f ในมะระ (Sun and Huang, 1983) และในปีค.ศ. 1985 พบมะระเป็นพืชอาศัยของเชื้อ *F.oxysporum* f. sp. *momordicae* และเป็นโรคทางดินที่มีความสำคัญในประเทศไต้หวัน (Sun and Huang, 1985) ปีค.ศ.2007 พบการระบาดของโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ร้อยละ 12.30-56.75 ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน จึงทำการทดสอบความต้านทานโรค (*Fusarium oxysporum* f.sp. *momodicae*) ด้วยวิธีต่างๆของมะระ 8 สายพันธุ์ ด้วยการปลูกเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *momodicae* เข้าสู่พืช (inoculation) ในระยะต้นกล้า 3 วิธีการ คือ 1. นำรากแช่กับเชื้อ 2. นำดินมาแช่กับเชื้อ 3. ฉีดเชื้อเข้าสู่พืช พบว่าวิธีการที่ทำให้ติดเชื้อ (infection) ของมะระแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันแต่วิธีการนำรากมาแช่กับเชื้อเป็นวิธีการที่ทำให้มะระติดเชื้อได้ดีที่สุด อีกทั้งมะระสายพันธุ์ Thailand Da-Rou Wang, Chang-Shou-Da-Rou No.3 และ Da-Rou Xin No.3 มีระดับความต้านทานปานกลางและไม่พบว่ามีสายพันธุ์ไหนที่มีความต้านทานต่อเชื้อ (Tang-xun and Jian-you, 2007) ในประเทศไต้หวันจึงใช้การต่อยอด (grafting) เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ เพื่อลดการใช้สารเคมี ผลการทดสอบพบว่าช่วยเพิ่มผลผลิตถึง 82-127 ตันต่อเฮกตาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับมะระที่ไม่ต่อยอดที่ให้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 16 ตันต่อเฮกตาร์ (Lin, 2008) ในประเทศมาเลเซีย ศึกษาการเกิดโรคของ Fusarium spp. และการประเมินการเกิดโรคในพืชผักและจำแนก isolates ของเชื้อที่ทำให้พืชผักเน่าเสีย จากการทดสอบกับผัก 9 ชนิด คือ แตงกวา (*Cucumis sativus*) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) กระเจี๊ยบ (*Hibiscus esculentus*) บวบ (*Luffa acutangula*) มะระ (*Momordica charantia*) มะรุม (*Moringa olifel*) มะเขือ (*Solanum melongena*) ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis*) และพริก (*Capsicum annuum*) พบเชื้อ *Fusarium* spp. ทั้งหมด 83 isolates คือ *F. oxysporum* (22 isolates) *F. semitectum* (19 isolates) *F. solani* (19 isolates) *F. proliferatum* (14 isolates) *F. pseudocircinatum* (4 isolates) *F. sacchari* (2 isolates) *F. equiseti* (2 isolates) และ *F. verticillioides* (1 isolate) อีกทั้งยังพบว่ามีจำนวนเชื้อทั้งหมด 21 isolates ที่เป็นสาเหตุทำให้พืชผักเน่าเสีย (Saseetharan et al., 2014)

โดยทั่วไปการวิเคราะห์และพิสูจน์เชื้อโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) ที่มีสาเหตุเกิดเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ซึ่งเป็นโรคที่มากับดิน หรือ soil borne disease ใช้วิธีการแยกเชื้อจากการใช้วิธีทางสัณฐานวิทยา (morphometrics) และความสามารถของเชื้อโรคที่ทำให้เกิดโรคในพืชอาศัย แต่วิธีนี้ใช้เวลานานและยุ่งยาก ดังนั้นเพื่อให้เกิดความรวดเร็วและแม่นยำ

ในการแยกระบุเชื้อ FOM จึงใช้การวิเคราะห์ตรวจสอบความแตกต่างในระดับ DNA ของเชื้อ *F. oxysporum* f. spp. จำนวน 24 เชื้อของพืชตระกูลแตง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และใช้เทคนิค PCR โดยทดสอบกับ 320 arbitrary primer (ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม) และไม่ซ้ำกันขนาด 519 bp จาก RAPD primer $S58_{-519}$ และออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR ที่จำเพาะเจาะจงต่อโรคเหี่ยวเหลือง (FOM) ผลการทดสอบพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล RS_{-256} สามารถใช้ตรวจพิสูจน์เชื้อเหี่ยวเหลืองในระยะต้นกล้าได้ (Chen et al., 2015)

ยีนต้านทาน โรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt)

การศึกษากลุ่มลิงค์เกจ (linkage group) ในปีค.ศ.1991 ที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานในเมล่อนพบว่า linkage group 5 ต้านทานต่อ *Fusarium oxysporum melonis* resistance-1 และยังพบว่าใน linkage group 6 ต้านทานต่อ *F. o. melonis* resistance-2 (Pitrat, 1991) ต่อมาในปีค.ศ.2008 ศึกษาลักษณะความต้านทานของ FOM 1.2 ในเมล่อนและทำแผนที่ major QTL กับลักษณะตาข่ายที่อยู่ใน locus ของเมล่อน เพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ในประเทศอิสราเอลราเอล พบว่า FOM 1.2 เป็น major recessive QTL อยู่ใน linkage group 2 ใกล้กับ locus ที่ควบคุมการพัฒนาตาข่ายของเมล่อน (Herman et al., 2008) ในปีเดียวกันการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับ *Fom-1* locus ที่ต้านทานกับ Fusarium race 2 ในเมล่อน มีสาเหตุมาจาก *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*F.o.m*) ทำการทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD จำนวน 400 ไพรเมอร์ พบว่ามี 320 ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ Charentais-Fom1 (donor ต้านทาน *Fom-1* race 0 และ 2) และพันธุ์ TRG-1551 ที่อ่อนแอต่อเชื้อทั้งสอง race และมี 3 ไพรเมอร์ คือ $B17_{649}$, $V01_{578}$, และ $V06_{1092}$ ที่เชื่อมโยงกับ *Fom-1* locus จากนั้นจึงพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR ที่จำเพาะเจาะจงมากขึ้น จากไพรเมอร์ RAPD $B17_{649}$ เป็น $SB17_{645}$ $V01_{578}$ เป็น $SV01_{574}$ และ $V06_{1092}$ เป็น $SV06_{1092}$ มีระยะห่างจากยีน *Fom-1* 3.5, 4.0 และ 15.1 cM ตามลำดับและอยู่ใน linkage group 9 ดังนั้นเครื่องหมาย SCAR $SB17_{645}$ และ $SV01_{574}$ สามารถช่วยคัดเลือกพืชในงานปรับปรุงพันธุ์ได้ (Ali et al., 2008) ในปีค.ศ.2009 พบว่ายีนต้านทาน *Fom-1* (race 2) *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* ควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ยีน (single dominant gene) อยู่บน linkage group 7 โดยสายพันธุ์ P11 ที่อ่อนแอ (fom-1fom-1) และ MR-1 (Fom-1 Fom1) ที่ต้านทาน *Fom-1* races 0 (Tezuka et al., 2009) ในปีค.ศ.2010 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานของ *F. oxysporum* races 0 และ races 2 ของแคนตาลูป (cantalupensis) สายพันธุ์ Tortuga พบว่า สายพันธุ์ Tortuga มีการควบคุมด้วยสองยีนที่เป็นอิสระจากกัน โดยยีนเด่น 1 ยีน ซึ่งอาจเป็นยีน *Fom-1* และยีนด้อย คือ *fom-4*

(Oumouloud et al., 2010) และต่อมาในปีค.ศ.2016 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมความต้านทานต่อ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc) โดยการผสมระหว่างแคนตาลูป พันธุ์ Hemed ที่มีความต้านทานโรคสูง และ muskmelon พันธุ์ Dulce ที่มีความอ่อนแอต่อโรค ทำการศึกษาในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าพันธุ์ Hemed มียีนเด่น 1 ยีนที่ควบคุม คือ *Forc-1* และยีนด้อยคือ *forc-2* (Elkabetz et al., 2016)

การศึกษาในแตงโม ปีค.ศ.2014 การศึกษา QTL หลัก (major QTL) ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทาน *Fusarium oxysporum* Fr. f. *sp. niveum* race 1 โดยใช้สายพันธุ์ HMw017 พันธุ์ต้านทาน และ HMw013 พันธุ์ที่อ่อนแอ เพื่อใช้เป็นพ่อแม่และโดยใช้ประชากร F_3 เพื่อศึกษาและทดสอบระดับความรุนแรงของโรค ใช้ฐานข้อมูลของแตงโมจากการทำ genotyping by sequencing (GBS) โดยมหาวิทยาลัย Cornell และใช้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 168 ตัวอย่าง เพื่อออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 266 SNP ที่ครอบคลุมทั้ง 11 โครโมโซมของแตงโม พบว่า QTL หลักที่เกี่ยวข้องกับการต้านทาน *Fon* race 1 อยู่บนโครโมโซม 1 มี LOD score 33.31 อีกทั้งพบ QTL รองบนโครโมโซม 1 โครโมโซม 3 โครโมโซม 4 โครโมโซม 9 และโครโมโซม 10 (Lambel et al., 2014) ต่อมาในปีค.ศ.2016 การศึกษาทำจีโนไทป์โดยการหาลำดับเบสที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทป์เพียงหนึ่งตำแหน่งเดียว (SNP) และทำแผนที่ทางพันธุกรรมของแตงโมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน *Fusarium oxysporum*. f. *sp. niveum* (*Fon*) race 1 เพื่อยืนยันยีนต้านทานของ *Fon* race 1 อยู่บนโครโมโซม 1 โดยใช้พันธุ์ Calhoun Gray ที่ต้านทาน และ Sugar Baby สายพันธุ์อ่อนแอ และใช้ประชากร F_3 ในการศึกษาจากนั้นเก็บข้อมูลของระดับความรุนแรงของโรคหลังจากการปลูกเชื้อ (inoculation) 11, 14, 17, 20, 23 และ 26 วัน และหาพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ข้อมูลด้านจีโนไทป์ใช้เครื่องหมาย SNP ที่ได้จากการทำ GBS นำไปทำแผนทางกายภาพ (physical maps) จำนวน 1024 SNP และ 389 SNP ใช้ในการทำแผนที่พันธุกรรม (genetic map) พบว่าการทำ physical maps ยีน *Fon* race 1 อยู่บนโครโมโซม 1 และได้ genetic map ทั้งหมด 12 linkage map พบว่ายีน *Fon* race 1 ใน linkage map ที่ 1 เช่นกัน (Meru and McGregor, 2016)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

1. สถานที่ทำการทดลอง

ทำการศึกษา ณ ฟาร์มเลิศพันธุ์ บริษัทฮอทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด จังหวัดเชียงใหม่

2. พันธุ์และการสร้างประชากร

การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่

วางแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design: RCBD) โดยมีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ มะระสายพันธุ์ EW-000255, EW-000256, EW-000257 และ EW-000254 ที่เป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลือง (resistance check) สำหรับใช้เปรียบเทียบความต้านทาน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ต้น จากนั้นทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* และประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อ โดยให้คะแนนระดับความรุนแรงของการเกิดโรค 5 ระดับ (rating score) และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC ;the area under the disease progress curve) (Plank, 1963) เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนี้

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) /2] (t_{i+1} - t_i)$$

โดยที่ y_i และ y_{i+1} = เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเป็นโรค ณ เวลา i และ i+1

t_i, และ t_{i+1} = จำนวนวัน ณ เวลา i และ i+1

n = จำนวนครั้งที่ประเมินเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเป็นโรค

จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์แม่ที่อ่อนแอ โดยใช้ค่า AUDPC ที่มีค่าเฉลี่ยที่ต่ำที่สุด ซึ่งจะแสดงถึงพืชเกิดอาการเป็นโรคอย่างรุนแรง เมื่อถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย และใช้สายพันธุ์พ่อที่มีความต้านทานคือ EW-000254 เพื่อสร้างประชากรลูกผสม

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการคำนวณค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แม่ โดยใช้ค่าเฉลี่ย AUDPC

สายพันธุ์	ต้นที่	ซ้ำที่	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่าเฉลี่ย
			7 วัน	14 วัน	21 วัน	AUDPC
EW-000255	1	1	0	3	4	35
EW-000255	2	1	0	3	4	35
EW-000255	3	1	0	4	4	42
EW-000255	4	1	0	3	4	35
EW-000255	5	1	0	3	4	35
EW-000255	6	1	0	3	4	35
EW-000255	7	1	0	4	4	42
EW-000255	8	1	0	3	4	35
EW-000255	9	1	0	3	4	35
EW-000255	10	1	0	3	4	35
EW-000255	11	1	0	2	3	24.5
EW-000255	12	1	0	3	4	35
EW-000255	13	1	0	3	4	35
EW-000255	14	1	0	3	4	35
EW-000255	15	1	0	2	4	28
ค่าเฉลี่ย			0	3	3.93	34.77

ตัวอย่าง การคำนวณค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ของสายพันธุ์ EW-000255 ซ้ำที่ 1 ทั้งหมด 15 ต้น ดังนี้

EW-000255 = (((ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ณ วันที่ 0 คือ 0 + ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ณ วันที่ 7) / 2 x 7) + ((ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ณ วันที่ 7 + ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ณ วันที่ 14) / 2 x 7) + ((ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ณ วันที่ 14 + ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ณ วันที่ 21) / 2 x 7))

EW-000255 ต้นที่ 1 มีค่า AUDPC = $(((0+0)/2*7)+((0+3)/2*7)+((3+4)/2*7)) = 35$

ดังนั้น ค่าเฉลี่ย AUDPC ของ สายพันธุ์ EW-000255 ทั้ง 15 ต้น คือ 34.77

การสร้างประชากร

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* แล้ว นำค่าเฉลี่ย AUDPC ของมะระทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ EW-000255, EW-000256, EW-000257 และ EW-000254 มาวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกให้เหลือสายพันธุ์แม่ที่อ่อนแอและมีค่า AUDPC สูงที่สุดเพียง 1 สายพันธุ์ ปลูกและผสมกับสายพันธุ์พ่อ EW-000254 ที่ต้านทานต่อโรค เพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ (F_1) จากนั้นนำลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ปลูกและผสมตัวเอง เพื่อให้ได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จำนวนอย่าง 235 ต้น เพื่อใช้ในการศึกษา

3. วัสดุอุปรณ์และสารเคมี

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา ใบอ่อนของมะระ ได้แก่ สายพันธุ์พ่อ EW-000254 เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทาน และสายพันธุ์แม่ที่ถูกคัดเลือกในข้อ 2 จากค่าเฉลี่ย AUDPC สูงที่สุดเพียง 1 สายพันธุ์ และที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 235 ต้น

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องบดตัวอย่าง
2. ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้
3. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
4. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. ลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ชนิดใช้กับหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ชนิดใช้กับแพลท
9. เครื่องวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ (เครื่องวัดการดูดกลืนแสง) รุ่น Nano-Drop8000 (Thermo science)
10. เพลทพลาสติกชนิดก้นแหลม (V shape) 96 หลุม ยี่ห้อ NUNC
11. สติ๊กเกอร์ใส สำหรับปิดเพลท (Kodak Digital Paper Professional)
12. สติ๊กเกอร์ใส ชนิดหนา สำหรับปิดเพลท (Thermo scientific AB-0558 Adhesive PCR Film)
13. แอเรย์เทป (Array tape^{TM}) ชนิด 384 หลุม ขนาด 2 ไมโครลิตร (Douglas Scientific)
14. พลาสติกปิดแอเรย์เทป (Cover tape) (Douglas Scientific)
15. เครื่องดูดจ่ายสาร (Nexar) (Douglas Scientific)

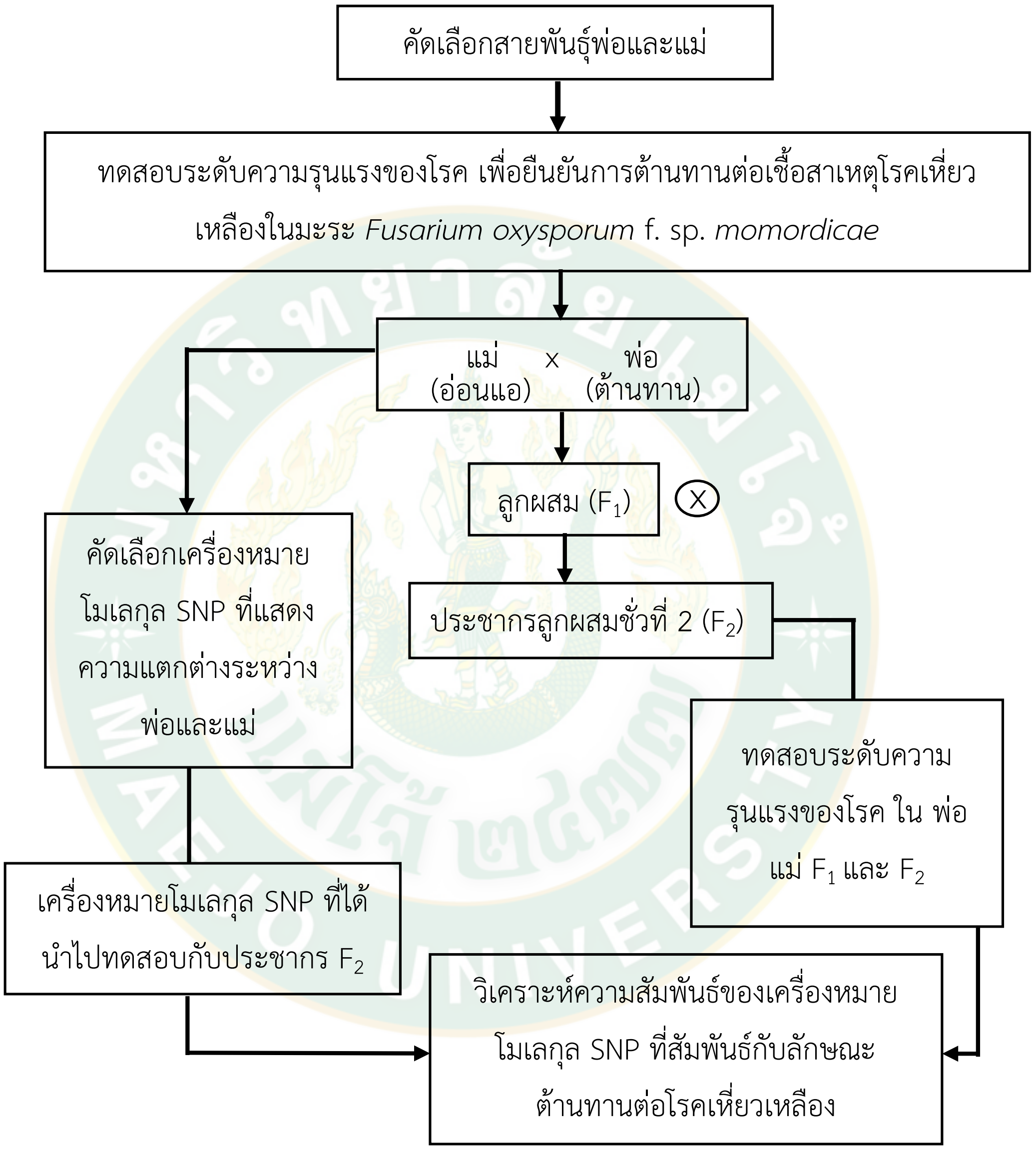
16. เครื่อง Thermal Cycler (Soellex) (Douglas Scientific)
17. เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับแอเรย์เทป (Douglas Scientific)
18. เครื่องอ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (Araya) (Douglas Scientific)
19. โปรแกรมสำเร็จรูป Araya สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลของบริษัท East-West Seed Company Limited
20. ไมโครปิเปตชนิดหลายช่องดูดจ่าย 8 ช่อง ขนาดต่างๆ
21. ไมโครปิเปตชนิดหลายช่องดูดจ่าย 12 ช่อง ขนาดต่างๆ
22. ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ
23. ไมโครปิเปตทิป สำหรับดูดสารขนาดต่างๆ
24. ไมโครปิเปตทิปชนิดกรอง สำหรับดูดสารขนาดต่างๆ

สารเคมี

1. สารสกัด 2X CTAB บัฟเฟอร์ (cetyl trimethyl ammonium bromind) ความเข้มข้น 2 เท่า
2. ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25 : 24 : 1
3. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
4. ไอโซโพรพานอล
5. น้ำกลั่นบริสุทธิ์
6. บัฟเฟอร์ 1X TE
7. ไพรเมอร์ SNP ชนิด forward 1 (F1) ถูกออกแบบโดยบริษัท East-West Seed จำกัด และสังเคราะห์จากบริษัท Integrated DNA Technologies
8. ไพรเมอร์ SNP ชนิด forward 2 (F2) ถูกออกแบบโดยบริษัท East-West Seed จำกัด และสังเคราะห์จากบริษัท Integrated DNA Technologies
9. ไพรเมอร์ SNP ชนิด reverse (R) ถูกออกแบบโดยบริษัท East-West Seed จำกัด และสังเคราะห์จากบริษัท Integrated DNA Technologies
10. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป 2X KASP master mix จากบริษัท LGC Limited ความเข้มข้น 2 เท่า

4. วิธีการทดลอง

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ มีขั้นตอนการดำเนินงานและรายละเอียดดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ในมะระ

4.1 การทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*)

เชื้อสาเหตุที่ใช้ในการศึกษา คือ เชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ไอโซเลทจากจังหวัดพิษณุโลก ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA) เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปปลูกเชื้อกับต้นกล้ามะระ (อายุที่ 14 วันหลังการเพาะเมล็ด) สายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ ประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 235 ต้น ด้วยวิธีจุ่มรากต้นกล้า (root tip) ในสารแขวนลอยสปอร์ ตามวิธีการประยุกต์ของบริษัท East-West Seed เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำต้นกล้ามะระปลูกในกระถาง เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง ประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังจากวันที่ได้รับเชื้อ โดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ ตามตารางที่ 4 (ดัดแปลงจาก (Marlatt et al., 1996)) (ภาพที่ 5) และคำนวณพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) (Plank, 1963)

ตารางที่ 4 แสดงระดับความรุนแรงของโรค (disease score) ที่กำหนดไว้ 5 ระดับ

ระดับการเกิดโรค	อาการ
0	ไม่แสดงอาการของโรค
1	แสดงอาการใบซีดและเหลือง ประมาณร้อยละ 1-30
2	แสดงอาการใบเหลืองมากและเหี่ยว ประมาณร้อยละ 31-60
3	แสดงอาการใบเหลืองมากและเหี่ยว ประมาณร้อยละ 61-100
4	พืชตาย

ระดับ 0 ระดับ 1 ระดับ 2 ระดับ 3 ระดับ 4

ภาพที่ 5 ระดับความรุนแรงของโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ เป็น 5 ระดับ

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมะระ

1. เก็บตัวอย่างใบอ่อนมะระที่จะทดสอบ จำนวน 1-2 ใบ ใส่หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. ใส่ลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จำนวน 3-4 เม็ด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 2X CTAB ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

3. นำตัวอย่างเข้าเครื่องบดตัวอย่าง นาน 5 นาที เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์แตก

4. นำตัวอย่างที่บดแล้ว ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ CTAB ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 585 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา และบ่มที่ตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

5. เติมสารฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 25:24:1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

6. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. ดูดสารละลายส่วนใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีสารไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้สารละลายและตัวอย่างเข้ากัน

8. นำไปแช่ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้ตกตะกอนดีเอ็นเอ

9. ทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆเทสารละลายส่วนใสทิ้งและเหลือตะกอนที่ก้นหลอดไว้

10. เติมเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อล้างตะกอน

11. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

12. เทสารละลายส่วนใสทิ้ง โดยไม่ให้ตะกอนหลุด ตากตะกอนดีเอ็นเอจนกว่าจะแห้ง

13. ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าดีเอ็นเอละลายหมด

14. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Nano-Drop 8000

15. ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

4.3 การทำ PCR

. 4.3.1 การเตรียมไพรเมอร์ SNP

ไพรเมอร์ 1 ชุด (1 SNP) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 เส้น ได้แก่ forward1 (F1), forward2 (F2) และ reverse (R) จากไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 100 µM เพื่อผสมชุดของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 100 µl ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเตรียมชุดไพรเมอร์สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร100 µl

ไพรเมอร์ SNP	ความเข้มข้นสุดท้าย(µM)	ปริมาตร (µl)
forword1 (F1) ความเข้มข้น 100 µM	12	12
forward2 (F2) ความเข้มข้น 100 µM	12	12
reverse (R) ความเข้มข้น 100 µM	30	30
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	-	46
ปริมาตรรวม	-	100

4.3.2 การเตรียมปฏิกิริยา PCR (Polymerase chain reaction)

1. เตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ลงในเพลทพลาสติกชนิดก้นแหลม (V shape) จำนวน 100 ไมโครลิตร เรียกว่า เพลทดีเอ็นเอ

2. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป 2X KASP master mix ใส่ลงในเพลทพลาสติกชนิดก้นแหลม (V shape) จากนั้นเติมไพรเมอร์ ที่เตรียมไว้ใน 4.3.1 ลงไป เรียกว่า เพลท assay (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของสารใน 1 ปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นในปฏิกริยา	ปริมาตร (µl)
ดีเอ็นเอ (15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	7.4 ng / µl	0.8
บัฟเฟอร์สำเร็จรูป KASPar master mix (2X)	2X	0.8
ไพรเมอร์ SNPs (54 µM)	0.67 µM	0.02
ปริมาตรรวม	-	1.62

3. นำแพลทดีเอ็นเอและเพลท assay เข้าเครื่องเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ชนิดที่ใช้กับแพลท ด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

4. ใช้ระบบ Ultra High Throughput Technology for SNPs (Douglas Scientific) ช่วยในการเตรียมดีเอนเอ โดยนำแพลทดีเอ็นเอเข้าในเครื่องดูดจ่ายสาร (Nexar) เพื่อดูดจ่ายดีเอ็นเอลงไปสู่แอเรย์เทป (Array tape™) ชนิด 384 หลุม จากนั้นนำแพลท assay เข้าในเครื่องดูดจ่ายสาร เพื่อทำการดูดจ่าย assay ลงบนแอเรย์เทปที่มีดีเอ็นเอ และปิดด้วยพลาสติกปิดแอเรย์เทป (cover tape) นำแอเรย์เทปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับแอเรย์เทป (Douglas Scientific) ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และนำแอเรย์เทปใส่เครื่อง Thermal Cycler (Soellex) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เวลาและอุณหภูมิ (ตารางที่ 7)

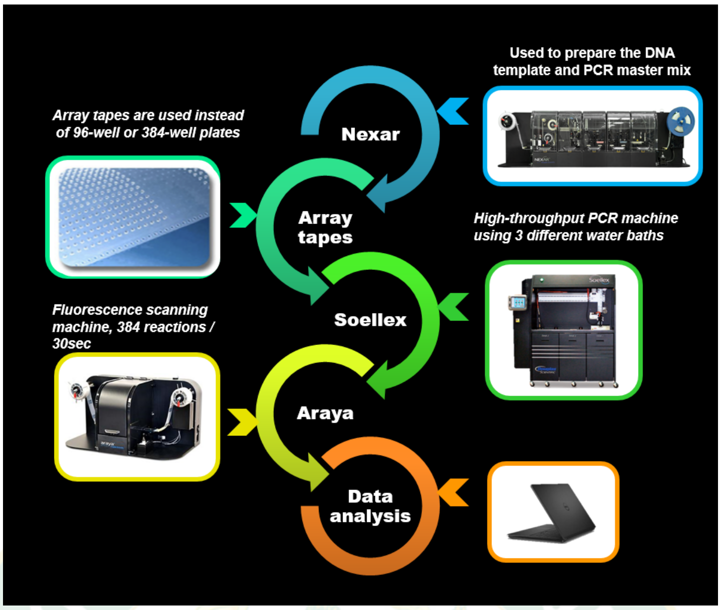
ตารางที่ 7 ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denature	94 องศาเซลเซียส	15 นาที	1 รอบ
Touch down	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
	65-57 องศาเซลเซียส	60 วินาที	10 รอบ
PCR	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
	57 องศาเซลเซียส	60 วินาที	40 รอบ

เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแอเรย์เทป เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับแอเรย์เทป (Douglas Scientific) ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที

6. นำผลของ PCR (แอเรย์เทป) มาตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (Araya) (Douglas Scientific)

7. วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลของ East-West Seed Company Limited (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงระบบการทำงานของ Ultra High Throughput Technology for SNPs (Douglas Scientific) ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา PCR และการทำ PCR

4.4 การคัดเลือกและตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล SNP

คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ โดยการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างของมะระสายพันธุ์พ่อ คือ EW-000254 และสายพันธุ์แม่ที่ถูกคัดเลือกจากการทดสอบต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในข้อที่ 2 จากนั้นทดสอบกับไพรเมอร์ จำนวน 1,828 SNP ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ที่สามารถแยกแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่เพื่อใช้ตรวจสอบในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 235 ตัวอย่าง

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษานี้แบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน คือ ข้อมูลด้านฟีโนไทป์และข้อมูลด้านจีโนไทป์

4.5.1 การวิเคราะห์ข้อมูลด้านฟีโนไทป์ หรือการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) แบ่งเป็นการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ (1.) การคัดเลือกสายพันธุ์แม่ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่อ่อนแอที่สุดเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์แม่ จากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคหลังจากวันที่ได้รับเชื้อที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังจากวันที่ได้รับเชื้อ และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความรุนแรงของโรคโดยใช้ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ที่มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด (2.) ข้อมูลฟีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 7, 14 และ 21 วันหลังจากวันที่ได้รับเชื้อ และ

คำนวณพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) จากนั้นทดสอบอัตราส่วนของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ว่าสอดคล้องตามทฤษฎีของเมลเดลหรือไม่ โดยค่าคาดหมายทางฟีไทป์ คือ 1:3 (อ่อนแอ : ต้านทาน) ด้วยวิธีการทดสอบ Chi-square test (χ^2) และสร้างกราฟเพื่อดูการกระจายตัวของฟีโนไทป์ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

4.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลด้านจีโนไทป์ โดยตรวจสอบจำนวนข้อมูลที่สูญหาย (missing data) เพื่อคัดกรองข้อมูลจีโนไทป์เบื้องต้น ซึ่งแต่ละไพรเมอร์ SNP จะต้องมีจำนวนข้อมูลที่สูญหายไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Joinmap 4.1 (Van Ooijen, 2006)จากนั้นทดสอบการกระจายตัวของไพรเมอร์ SNP (segregation distortion) โดยการทดสอบ Chi-square test (χ^2) เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ SNP ที่ได้สอดคล้องกับค่าคาดหมายในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 หรือไม่ ซึ่งในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จะมีค่าคาดหมายการกระจายตัวของอัลลีล AA (ต้านทาน) : AB (ต้านทานปานกลาง) : BB (อ่อนแอ) คือ 1:2:1 โดยให้ AA คือ อัลลีลเหมือนพ่อพันธุ์ต้านทาน AB คือ อัลลีลที่เหมือนทั้งพ่อและเหมือนแม่ ซึ่งต้านทานปานกลาง และ BB คือ อัลลีลเหมือนแม่พันธุ์อ่อนแอ และตัดข้อมูลไพรเมอร์ SNP ที่ให้ผลจีโนไทป์ซ้ำกันออก 1 ไพรเมอร์ SNP จากนั้นสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups) จากไพรเมอร์ SNP ที่ใช้ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยกำหนด logarithm of odds (LOD score) ที่ต่ำสุดเท่ากับ 3.0 ใช้ค่าrecombination frequency (rf) เท่ากับ 0.25 และใช้ Kosambi’s mapping function (Kosambi, 1944) ในการเปลี่ยนค่า recombination frequency เป็นหน่วยเซ็นติมอร์แกน (cM) ผลที่ได้จากการสร้างกลุ่มลิงค์เกจคาดว่าไพรเมอร์ SNP ที่อยู่กลุ่มเดียวกันอาจจะอยู่บริเวณเดียวกัน

4.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์

นำข้อมูลด้านฟีโนไทป์จากการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 มาคำนวณค่า AUDPC และนำข้อมูลจีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จากข้อ 4.5.2 นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ โดยใช้โปรแกรม MapQTL6 (Van Ooijen and Kyazma, 2009) โดยพิจารณาจากคะแนน logarithm of odd ratio (LOD) ที่มีค่าตั้งแต่ 3 ขึ้นไป และค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (percentage of phenotypic variation explained; PVE) ที่มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็น QTL หลักและค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์จะเป็น QTL รอง เพื่อบอกถึงเครื่องหมายโมเลกุลนั้นสามารถบอกถึงลักษณะที่สนใจได้มากน้อยหรือไม่ ซึ่งค่า LOD ที่สูงจะแสดงให้เห็นได้ว่า เครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่สนใจอยู่ใกล้กัน แต่ถ้า LOD ต่ำแสดงว่า เครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองที่สนใจอยู่ไกลกัน

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ข้อมูลด้านฟีโนไทป์

1.1 พันธุ์และการสร้างประชากร การคัดเลือกสายพันธุ์แม่จากการประเมินความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design: RCBD) โดยมีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ มะระสายพันธุ์ EW-000255, EW-000256, EW-000257 และ EW-000254 ที่เป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลือง (resistance check) เพื่อสำหรับใช้เปรียบเทียบความต้านทาน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ผลการทดสอบความแปรปรวนในแต่ละสายพันธุ์ (Test of Homogeneity of Variance) โดยวิธีการของ Bartlett's test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 1) จากนั้นทดสอบการแจกแจงแบบปกติของข้อมูล ของค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) พบว่ามีการแจกแจงแบบปกติ ($p > 0.05$) (ตารางภาคผนวกที่ 2) ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ตารางที่ 8 พบว่า Block ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่า สายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 8 วิเคราะห์ความแปรปรวนความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของมะระจำนวน 4 สายพันธุ์ จากการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr(> F)
Block	2	1.8848	0.9424	0.58	0.5901^{ns}
Treatment	3	2526.8029	842.2676	515.42	0.0000^{**}
Error	6	9.8048	1.6341		
Total	11	2538.4925			
CV(%)	4.84				
AUDPC Mean	26.39				

หมายเหตุ : ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (non-significant difference)

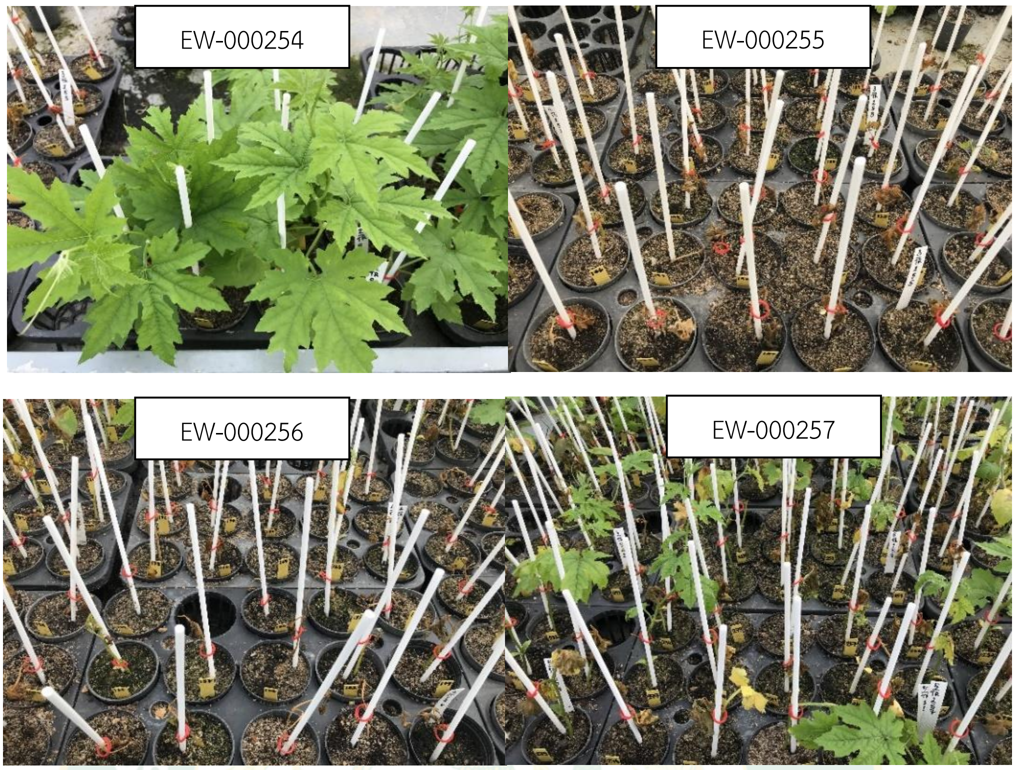
** คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (significant difference)

ผลการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ในมะระ 4 สายพันธุ์ ที่อายุ 21 วันหลังจากได้รับเชื้อ จะเห็นได้ว่ามะระทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการแสดงความต้านทานต่อโรคที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) โดยใช้วิธี Least Significant Different (LSD) พบว่ามะระสายพันธุ์ EW-000255 และ EW-000256 ให้ค่าเฉลี่ย AUDPC ที่สูงที่สุดเท่ากับ 36.32 และ 37.65 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อที่มีความต้านทานให้ค่าเฉลี่ย AUDPC เท่ากับ 1.79 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าค่าเฉลี่ย AUDPC ของ สายพันธุ์ EW-000255 และ EW-000256 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่สายพันธุ์ EW-000256 มีค่าเฉลี่ย AUDPC ที่สูงกว่าสายพันธุ์ EW-000255 ประกอบกับการมีลักษณะคุณภาพของผลที่ตรง ลายทางสลับหยดน้ำ และผลมีสีเขียวอ่อน ตรงตามที่ตลาดต้องการ (ภาพที่ 8) ดังนั้นจึงคัดเลือกมะระสายพันธุ์ EW-000256 มาใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2 ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ของมะระที่ทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง จำนวน 4 สายพันธุ์โดยใช้ วิธี Least Significant Different (LSD)

Acc.	ค่าเฉลี่ย AUDPC
EW-000254-R-check	1.79^{c}
EW-000255	36.32^{a}
EW-000256	37.65^{a}
EW-000257	29.79^{b}
Pr(> F)	0.0000^{**}
CV(%)	5.5

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Least Significant Different (LSD)



ภาพที่ 7 แสดงการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง Fusarium oxysporum f. sp. momordicae ในมะระจำนวน 4 สายพันธุ์ 21 วัน หลังจากวันที่ได้รับเชื้อ ในการคัดเลือกสายพันธุ์แม่

MAEJO UNIVERSITY

EW-000254

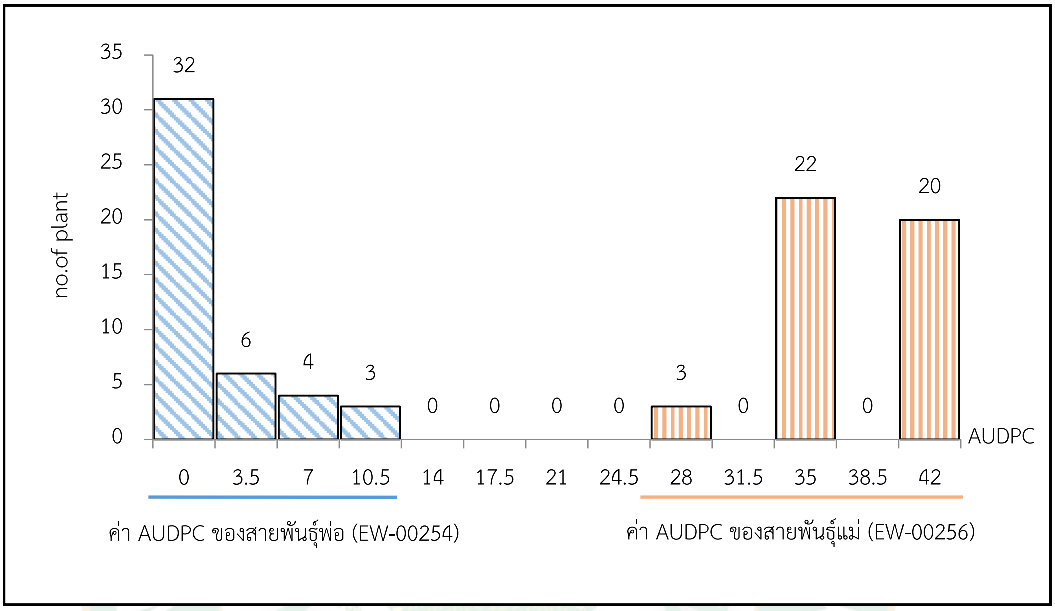
EW-000255

EW-000256

EW-000257

ภาพที่ 8 ลักษณะของผลมะระที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ในมะระจำนวน 4 สายพันธุ์

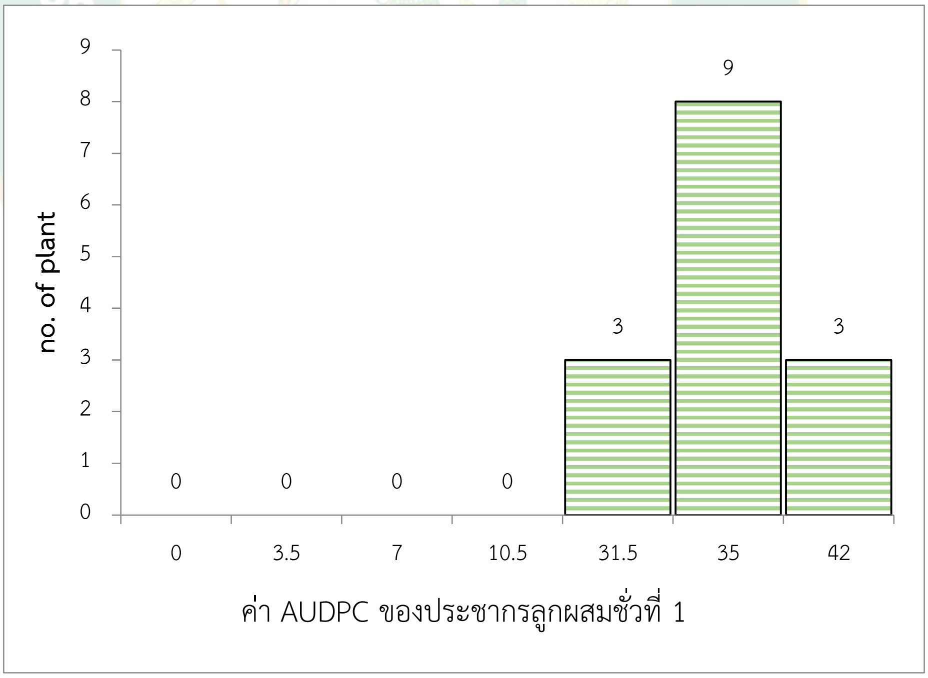
จากการประเมินความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองทำให้ได้สายพันธุ์แม่ที่อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลืองที่สุด คือ EW-000256 มีการกระจายตัวของค่า AUDPC ระหว่าง 28-42 ในกราฟแท่งสีส้ม (ภาพที่ 9) และมีค่าเฉลี่ย AUDPC เท่ากับ37.65 ในสายพันธุ์พ่อ EW-000254 มีการกระจายตัวของค่า AUDPC ระหว่าง 0-10.5 และมีค่าเฉลี่ยAUDPC เท่ากับ 1.79 แสดงผลในกราฟแท่งสีฟ้า (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ระหว่างสายพันธุ์พ่อ (EW-000254) ที่มีความต้านทาน และสายพันธุ์แม่ (EW-000256) ที่อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลือง

1.2. การวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระในประชากรประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

ผลจากการคัดเลือกสายพันธุ์แม่ที่ได้คือ EW-000256 และนำสายพันธุ์พ่อ EW-000254 ปลูกและผสมกันเพื่อผลิตประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และนำลูกผสมปลูกและผสมตัวเองเพื่อให้ได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 7, 14 และ 21 วันหลังจากวันที่ได้รับเชื้อ จากกราฟการกระจายตัวของค่า AUDPC (ภาพที่ 9) ของสายพันธุ์พ่อ (EW-000254) ที่ต้านทาน และสายพันธุ์แม่ (EW-000256) ที่อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลืองทำให้สามารถแบ่งกลุ่มต้านทานได้ตามสายพันธุ์พ่อ โดยมีค่า AUDPC ตั้งแต่ 0-10.5 และกลุ่มอ่อนแอตามสายพันธุ์แม่ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 28-42 และในประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่เกิดจากสายพันธุ์แม่ (EW-000256) x สายพันธุ์พ่อ (EW-000254) มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 31.5-42 และมีค่าเฉลี่ย AUDPC เท่ากับ 36.16 (ภาพที่ 10) ซึ่งแสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคทั้งหมด และมีแนวโน้มไปทางลักษณะกลุ่มอ่อนแอคล้ายกับค่า AUDPC ของสายพันธุ์แม่ (EW-000256) ดังนั้นจึงมีการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในมะระเป็นแบบลักษณะด้อย (recessive trait)



ภาพที่ 10 การกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

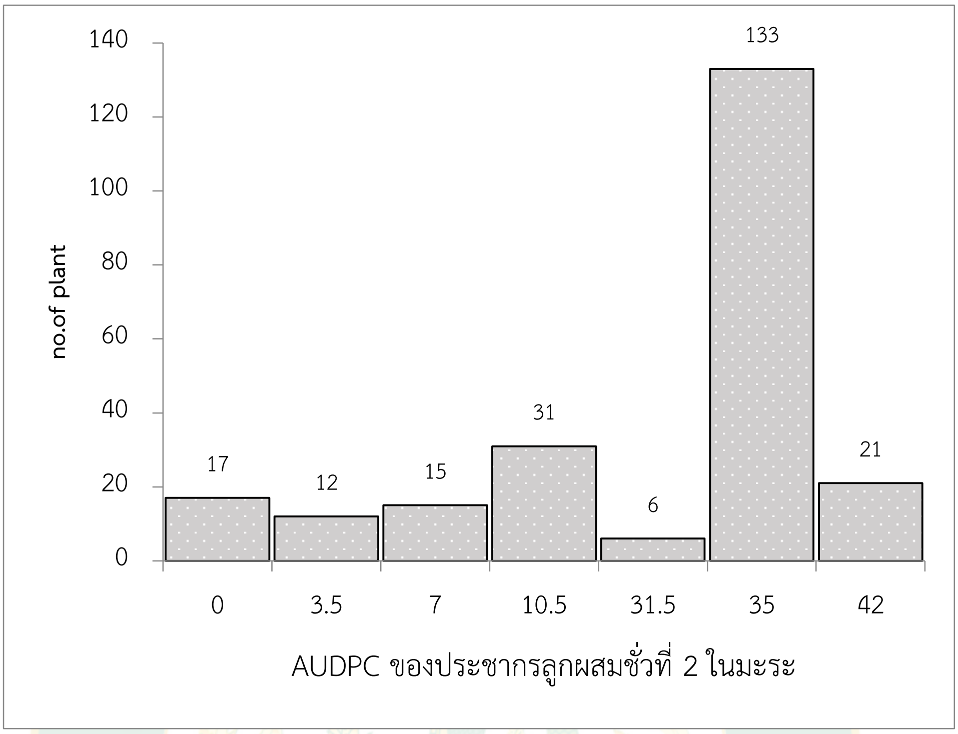
ทดสอบอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลือง ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยวิธีการทดสอบ Chi-square test เพื่อหาจำนวนยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรค ซึ่งตั้งสมมติฐานคือ (H_0) ลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในมะระจะถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 ยีน โดยกำหนดให้อัตราส่วนค่าที่คาดหมายด้านฟีโนไทป์ระหว่างต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอในประชากรลูกรุ่นที่ 2 เท่ากับ 1:3 ซึ่งคาดว่าอาจถูกควบคุมด้วยยีนด้อยจำนวน 1 ยีนโดยค่า Chi square ที่ได้ไม่แตกต่างจากค่า Chi square ตาราง จึงยอมรับสมมติฐาน แต่ในทางตรงกันข้ามหากค่า Chi square ที่คำนวณได้มีค่าที่แตกต่างจากค่า Chi square ในตารางก็จะปฏิเสธสมมติฐาน นั่นคือลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในมะระถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 ยีน (ตารางที่ 10) พบว่าค่า Chi-Square ที่คำนวณได้เท่ากับ 5.99 ซึ่งมีค่าที่มากกว่าค่า Chi-Square ในตารางความน่าจะเป็น 0.05 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 1 มีค่าเท่ากับ 3.842 ซึ่งอัตราส่วนที่คาดหมายในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยอัตราส่วนต้นต้านทาน : ต้นอ่อนแอ ไม่เท่ากับ 1 : 3 ดังนั้นลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระจึงคาดว่าถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 ยีน และมีการกระจายตัวของฟีโนไทป์ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ไปในทางลักษณะอ่อนแอต่อโรคเหมือนสายพันธุ์แม่ (ภาพที่ 11) ซึ่งเป็นการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) โดยกราฟมีลักษณะโค้งเบ้ขวา (negative skew)

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบค่า Chi-square test (χ^2) ของการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ในมะระ

จำนวนยีนด้อย (recessive)	ฟีโนไทป์	ค่า AUDPC	อัตราส่วนที่คาดหมาย	ค่าที่ได้จากการทดลอง (O)	ค่าที่ได้ตามทฤษฎี (E)	chi-square (χ^2)	df	p-value
1 ยีน	ต้นต้านทาน	R (≤10.5)	1	75	58.75	5.99	1	0.014 *
	ต้นอ่อนแอ	S (≥10.5)	3	160	176.25			

หมายเหตุ p-value < 0.05

* คือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (significant difference)



ภาพที่ 11 การกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

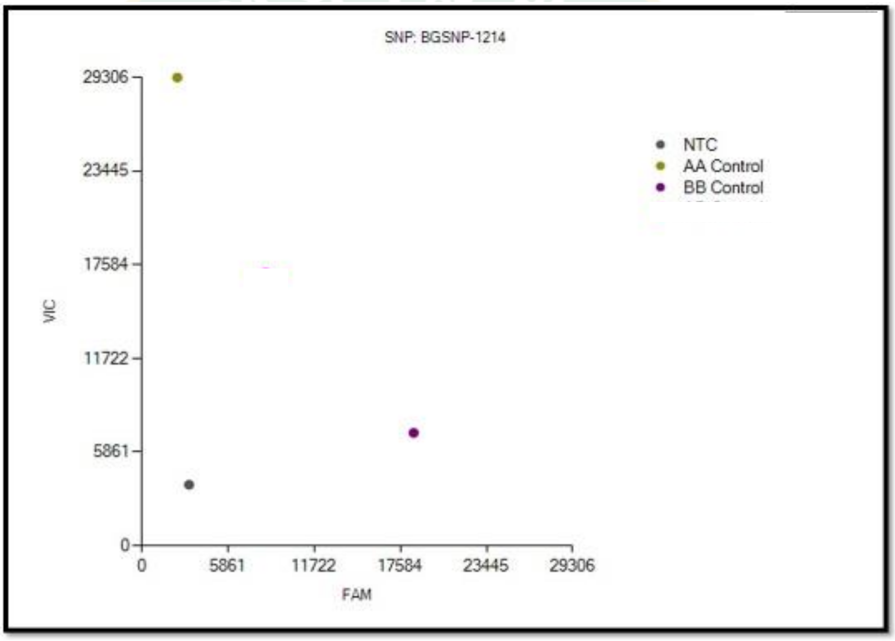
2. การวิเคราะห์ข้อมูลด้านจีโนไทป์

2.1. การคัดเลือกไพรเมอร์ SNP

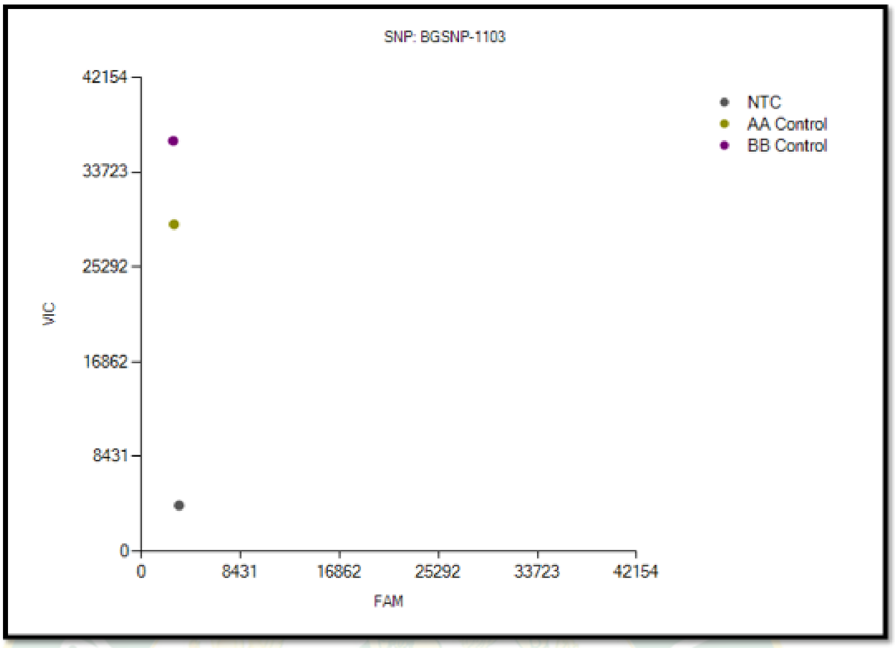
ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ EW-000254 และสายพันธุ์แม่ EW-000256 จำนวน 1,828 ไพรเมอร์ SNP พบว่า มีเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ที่สามารถแยกแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ จำนวน 297 ไพรเมอร์ SNP (ภาพที่ 12) และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ จำนวน 1,531 ไพรเมอร์ SNP (ภาพที่ 13) จากนั้นนำเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 297 ไพรเมอร์ SNP (ตารางที่ 11) ทดสอบกับประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 235 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นข้อมูลด้านจีโนไทป์สำหรับสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups : LG) และวิเคราะห์QTL ของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์

ตารางที่ 11 จำนวนไพรเมอร์ SNP ที่ตรวจสอบและจำนวนไพรเมอร์ SNP ที่ถูกคัดเลือกเพื่อทดสอบกับประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ในมะระ

ขั้นตอน	จำนวนไพรเมอร์ SNP ที่ตรวจสอบ	จำนวนไพรเมอร์ SNP ที่ถูกคัดเลือก
คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่	1,828	297



ภาพที่ 12 ตัวอย่างผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SNP : BGSNP-1214 ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างสายพันธุ์พ่อ EW-000254 จุดสีเขียว (AA control) และสายพันธุ์แม่ EW-000256 จุดสีม่วง (BB control) จุดสีดำ คือ ชุดควบคุม (control)



ภาพที่ 13 ตัวอย่างผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SNP : BGSNP-1103 ที่สามารถแยกความไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างสายพันธุ์พ่อ EW-000254 จุดสีเขียว (AA control) และสายพันธุ์แม่ EW-000256 จุดสีม่วง (BB control) จุดสีดำ คือ ชุดควบคุม (control)

2.2. วิเคราะห์ข้อมูลด้านจีโนไทป์

เครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 297 ไพรเมอร์ SNP ที่ถูกคัดเลือก

นำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากการทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 297 ไพรเมอร์ SNP มาทำการตรวจสอบและคัดกรองข้อมูลสูญหาย (missing data) ของแต่ละไพรเมอร์ SNP พบว่าไม่มีไพรเมอร์ SNP และตัวอย่างใดที่มีข้อมูลจีโนไทป์สูญหายเกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Joinmap 4.1 (Van Ooijen, 2006) ตัดข้อมูลไพรเมอร์ SNP ที่ให้ผลจีโนไทป์ซ้ำกันออก 1 ไพรเมอร์ SNP กล่าวคือ ถ้าไพรเมอร์ SNP ที่ให้ผลจีโนไทป์เหมือนกัน 100% (similarity =1) จะเลือกใช้ไพรเมอร์ SNP เพียง 1 ไพรเมอร์ SNP เท่านั้น และตัดไพรเมอร์ SNP ออกจำนวน 8 ไพรเมอร์ SNP (ตารางที่ 12 และ ตารางภาคผนวกที่ 3) ดังนั้นจึงมีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์ทั้งหมด 289 ไพรเมอร์ SNP ที่ถูกนำมาใช้ในการทดสอบ จากนั้นทดสอบการกระจายตัวของไพรเมอร์ SNP (segregation distortion) โดยการทดสอบ Chi-square test (χ^2) เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ SNP ที่ได้สอดคล้องกับค่าคาดหมายในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 หรือไม่ ซึ่งในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จะมีค่าคาดหมายการกระจายตัวของอัลลีล คือ 1:2:1 ดังนั้น ในประชากรนี้ลูกผสมชั่วที่ 2 นี้ควรจะมีค่าจีโนไทป์ที่คาดหวังคือ 58.75 AA : 117.50 AB : 58.75 BB ผลการทดสอบ Chi-square test พบว่ามีไพรเมอร์ SNP จำนวน 47 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 13) ที่มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนที่คาดหมายไว้ ซึ่งเรียกไพรเมอร์ SNP ดังกล่าวนี้ว่า marker segregation distortion และในการทดลองนี้จะไม่ตัดไพรเมอร์ SNP ที่เป็น marker segregation distortion ออกในขั้นตอนการสร้างกลุ่มลิงค์เกจ

ผลจากการสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups : LG) จากไพรเมอร์ SNP ทั้งหมด 282 ไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Joinmap 4.1 (Van Ooijen, 2006) สามารถนำไปจัดกลุ่มลิงค์เกจได้จำนวน 13 กลุ่มลิงค์เกจ (ภาพที่ 14) และมีจำนวน 7 ไพรเมอร์ SNP ที่ไม่สามารถจัดอยู่ใน 13 กลุ่มลิงค์เกจ (ตารางภาคผนวกที่ 4) และพบว่ามี marker segregation distortion อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1, 2, 4, 5, 6 และ 13 จำนวน 47 ไพรเมอร์ SNP (ตารางภาคผนวกที่ 5)

ตารางที่ 12 แสดงไพรเมอร์ SNP ที่ให้ผลจีโนไทป์เหมือนกันและมีความเหมือนกัน (similarity)

ชื่อไพรเมอร์ SNP ที่ใช้	ชื่อไพรเมอร์ SNP ที่ตัดออก	ความเหมือน (similarity)
BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	1
BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	1
MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	1
BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	1
BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	1
BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	1
BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	1
MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638	1

หมายเหตุ 1 หมายถึง ไพรเมอร์ SNP ที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 13 แสดงไพรเมอร์ SNP ที่มีการกระจายตัวผิดรูปแบบ (segregation distortion) จำนวน 47 ไพรเมอร์ SNP

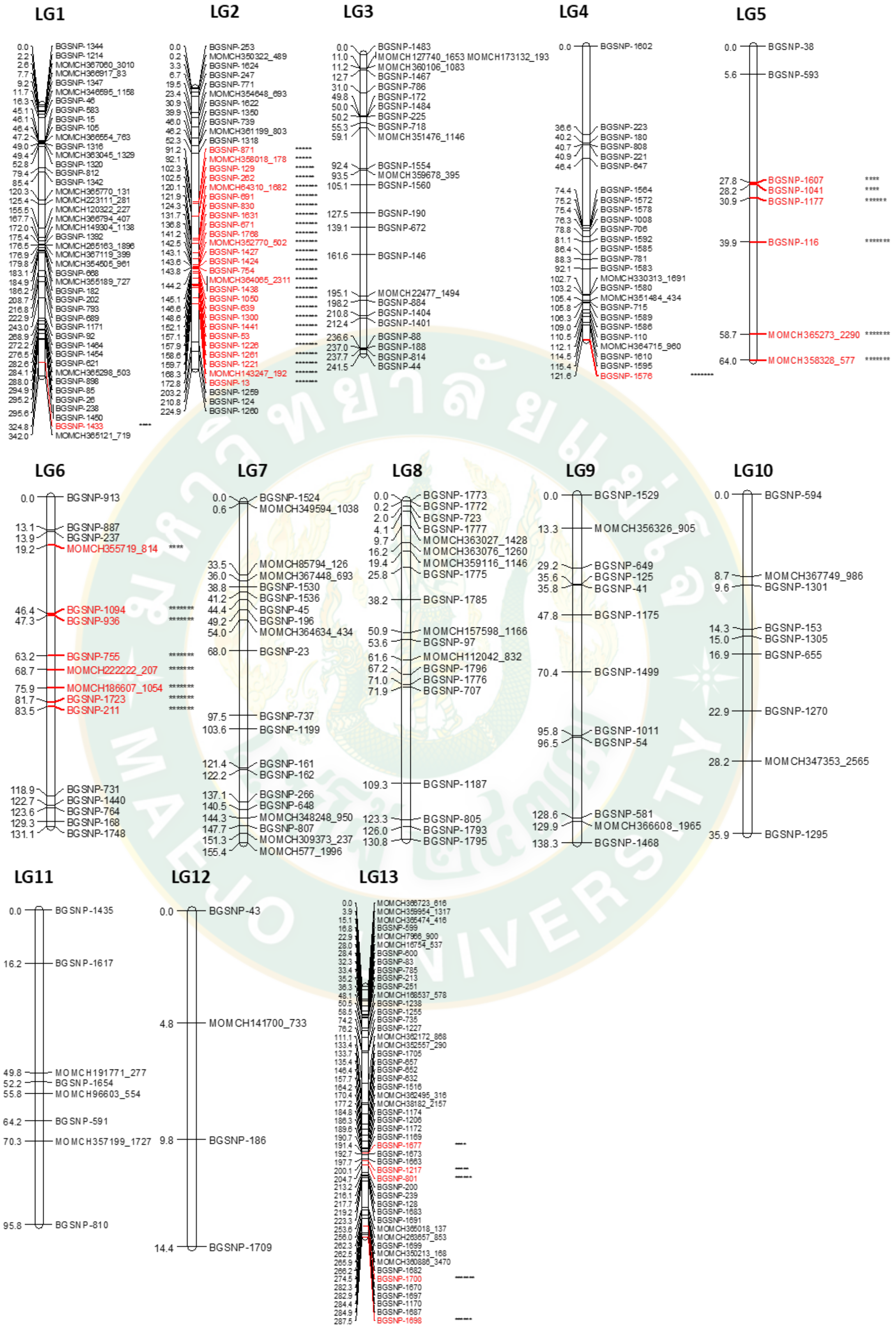
ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์ SNP	AA	AB	BB	Blank	chi-square (χ^2)	Df	Signif.
1	BGSNP-116	86	114	34	1	23.26	2	*******
2	BGSNP-1221	98	115	22	0	49.26	2	*******
3	BGSNP-1226	102	115	18	0	60.16	2	*******
4	BGSNP-1261	100	116	19	0	55.88	2	*******
5	BGSNP-13	89	109	37	0	24.24	2	*******
6	BGSNP-1300	116	111	8	0	99.99	2	*******
7	BGSNP-211	101	125	9	0	72.99	2	*******
8	MOMCH186607_1054	109	123	2	1	98.47	2	*******
9	MOMCH365273_2290	92	122	21	0	43.25	2	*******
10	MOMCH64310_1682	75	136	24	0	27.96	2	*******

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์ SNP	AA	AB	BB	Blank	chi-square (χ^2)	Df	Signif.
11	BGSNP-1050	122	111	2	0	123.27	2	*******
12	BGSNP-1094	87	126	22	0	37.19	2	*******
13	BGSNP-639	119	112	4	0	113.07	2	*******
14	BGSNP-671	112	117	4	2	100.12	2	*******
15	BGSNP-691	81	132	22	0	33.2	2	*******
16	BGSNP-754	123	111	1	0	127.39	2	*******
17	BGSNP-755	99	123	13	0	63.46	2	*******
18	BGSNP-830	87	127	21	0	38.61	2	*******
19	BGSNP-936	86	128	21	0	37.83	2	*******
20	MOMCH143247_192	92	115	28	0	34.97	2	*******
21	MOMCH352770_502	123	111	1	0	127.39	2	*******
22	MOMCH358328_577	94	131	9	1	65.1	2	*******
23	BGSNP-1424	124	110	1	0	129.71	2	*******
24	BGSNP-1438	122	111	1	1	125.75	2	*******
25	BGSNP-1441	109	117	9	0	85.11	2	*******
26	BGSNP-1576	25	146	52	12	27.89	2	*******
27	BGSNP-1631	106	116	13	0	73.65	2	*******
28	BGSNP-1700	44	152	36	3	22.9	2	*******
29	BGSNP-1723	101	127	7	0	76.74	2	*******

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์ SNP	AA	AB	BB	Blank	chi-square (χ^2)	Df	Signif.
30	BGSNP-1768	118	115	2	0	114.63	2	*******
31	BGSNP-53	100	117	18	0	57.23	2	*******
32	MOMCH222222_207	106	121	8	0	81.94	2	*******
33	BGSNP-1427	122	112	1	0	125.12	2	*******
34	MOMCH364065_2311	123	111	1	0	127.39	2	*******
35	BGSNP-262	76	125	33	1	16.9	2	******
36	BGSNP-1177	85	105	44	1	16.83	2	******
37	BGSNP-801	36	148	50	1	18.1	2	******
38	BGSNP-1698	34	145	55	1	17.17	2	******
39	BGSNP-129	76	126	33	0	16.97	2	******
40	MOMCH358018_178	81	115	39	0	15.12	2	*****
41	BGSNP-871	80	117	38	0	15.02	2	*****
42	BGSNP-1217	37	131	67	0	10.76	2	****
43	BGSNP-1041	81	110	44	0	12.61	2	****
44	BGSNP-1433	36	132	67	0	11.76	2	****
45	BGSNP-1607	80	110	44	1	11.91	2	****
46	BGSNP-1677	37	127	70	1	11.02	2	****
47	MOMCH355719_814	79	115	41	0	12.4	2	****



ภาพที่ 14 แสดงผลการสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups : LG) ในมะระจำนวน 13 กลุ่มลิงค์เกจ (หมายเหตุ * marker segregation distrotion)

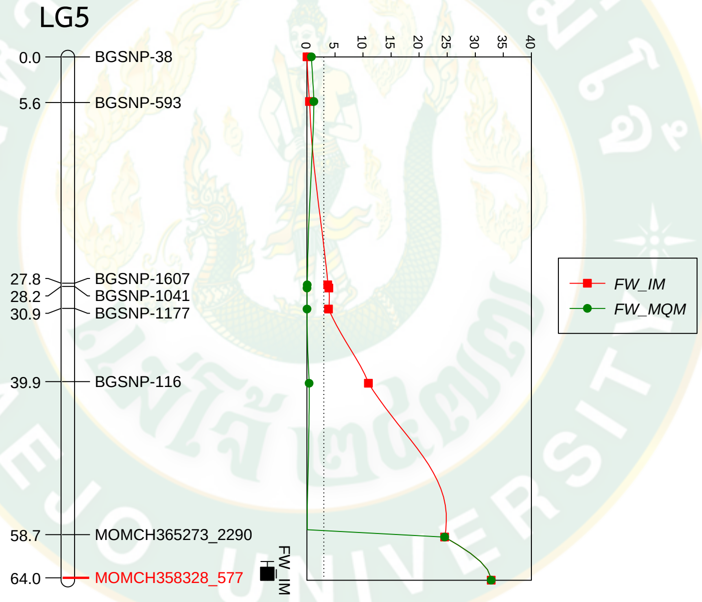
3. การวิเคราะห์ QTL ของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์โดยวิธี Interval mapping และ MQM analysis

เมื่อนำผลที่ได้จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 พบว่า สามารถจัดกลุ่มลิงค์เกจได้จำนวน 13 กลุ่มลิงค์เกจ และนำข้อมูลฟีโนไทป์ที่ได้จากการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้ค่า AUDPC (ตารางภาคผนวกที่ 6) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MapQTL6 (Van Ooijen and Kyazma, 2009) โดยวิธี Interval mapping พบว่ากลุ่มลิงค์เกจที่ 5 ให้ค่า LOD เท่ากับ 32.85 และ 24.57 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 47.5 และ 38.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 15) และกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 มีค่า LOD เท่ากับ 3.83 และ 3.81 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 7.2. เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 16) มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ เนื่องจากมีค่า LOD ที่มากกว่า 3

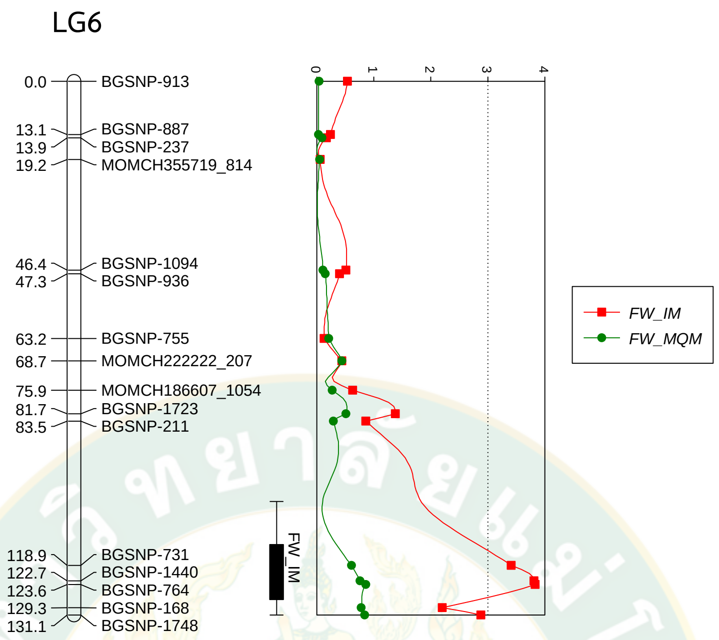
เพื่อให้ได้ผลที่มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ QTL จึงนำผลการวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธีการ Interval mapping มาวิเคราะห์โดยวิธี MQM analysis เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง ในการศึกษาครั้งนี้ เรียกชื่อว่า *FW* ผลการวิเคราะห์โดยวิธี MQM analysis พบว่าลักษณะต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองถูกควบคุมด้วย QTL หลักเพียงตำแหน่งเดียวในกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 และไม่พบ QTL ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 ด้วยวิธี MQM analysis ซึ่งมีค่า LOD ที่ต่ำกว่า 3 มีค่าเท่ากับ 0.86 และ 0.76 ดังนั้นในกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 จึงเป็น QTL หลัก (major QTL) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ และมีผลต่อลักษณะต้านทานโรค โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย ได้แก่ MOMCH358328_577 ซึ่งมีค่า LOD เท่ากับ 32.85 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 47.5 และ MOMCH365273_2290 มีค่า LOD เท่ากับ 24.57 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 38.2 (ภาพที่ 17) และเป็น marker segregation distortion

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธี Interval mapping และ MQM analysis กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ

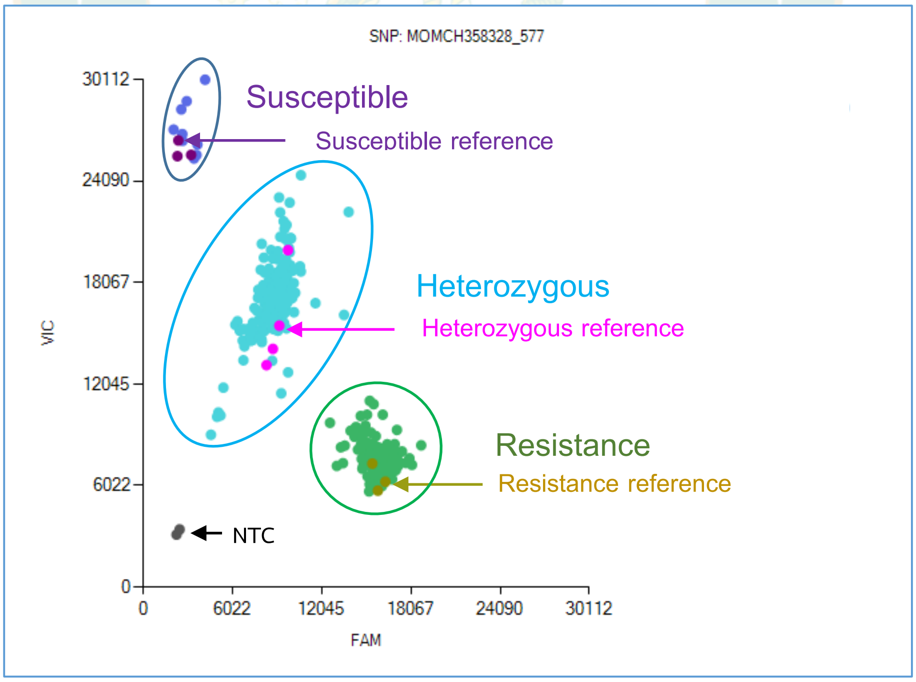
LG	Position (cM)	ไพรเมอร์ SNP	Interval mapping		MQM analysis	
			LOD	% Expl.	LOD	% Expl.
5	64.0	MOMCH358328_577	32.85	47.5	32.85	47.5
5	58.7	MOMCH365273_2290	24.57	38.2	24.57	38.2
6	123.6	BGSNP-764	3.83	7.2	0.86	0.9
6	122.7	BGSNP-1440	3.81	7.2	0.76	0.8



ภาพที่ 15 การวิเคราะห์ QTL ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 ด้วยวิธีการ Interval mapping (เส้นสีแดง -■- FW_IM) และวิธีการ MQM analysis (เส้นสีเขียว -●- FW_MQM) ซึ่งเป็นตำแหน่ง major QTL. ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ



ภาพที่ 16 การวิเคราะห์ QTL ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 ด้วยวิธีการ Interval mapping (เส้นสีแดง FW_IM) และวิธีการ MQM analysis (เส้นสีเขียว FW_MQM)



ภาพที่ 17 ไพรเมอร์ SNP ชื่อ MOMCH358328_577 ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ข้อมูลด้านฟีโนไทป์

พันธุ์และการสร้างประชากร การคัดเลือกสายพันธุ์แม่จากการประเมินความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง

จากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*) ใช้เชื้อไอโซเลทจากจังหวัดพิษณุโลกทดสอบความต้านทานในมะระ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แม่และทดสอบกับประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ในการศึกษาครั้งนี้ใช้การคำนวณพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC ;the area under the disease progress curve) เนื่องจากค่า AUDPC เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อสรุปของดัชนีการเกิดโรคเมื่อระยะเวลาผ่านไป เพื่อเปรียบเทียบการเกิดโรคที่เกิดขึ้นระหว่างเวลา สถานที่ทดลอง หรือวิธีการจัดการ ซึ่งวิธีการคำนวณค่า AUDPC เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้ประเมินค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคระหว่างแต่ละจุดเวลาที่อยู่ติดกัน (Madden et al., 2007) จากการทดสอบความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในมะระทั้ง 4 สายพันธุ์จะเห็นได้ว่า มีมะระเพียง 1 สายพันธุ์ที่แสดงความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองมากที่สุด คือ EW-000254 ที่ใช้เป็นพันธุ์เพื่อเปรียบเทียบความต้านทานและเป็นสายพันธุ์พ่อ ในการสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 และ ชั่วที่ 2 พบมะระ 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ EW-000255 และ EW-000256 ที่มีค่าเฉลี่ย AUDPC เท่ากับ 36.32 และ 37.65 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มะระพันธุ์ EW-000256 จะมีค่า AUDPC สูงที่สุด และมีลักษณะผล ลายทางสลับหยดน้ำและผลมีสีเขียวอ่อน ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดในประเทศไทย (Dhillon et al., 2016) จึงเลือกใช้เป็นสายพันธุ์แม่ ในขณะที่มะระพันธุ์ EW-000255 มีผลสีขาว ในขั้นตอนการประเมินความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลือง และคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่เพื่อนำมาสร้างประชากรสำหรับใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อนำมาใช้ในการช่วยคัดเลือกลักษณะที่ต้องการนั้นเป็นขั้นตอนที่จำเป็นและมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากในการสร้างประชากรนั้นจำเป็นที่จะต้องคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่จะต้องมีลักษณะที่มีคุณค่าทางการเกษตรและพันธุ์ที่ใช้จะต้องมีลักษณะที่สนใจที่แตกต่างกัน 1 หรือหลายลักษณะทั้งลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนเพียง 1 คู่ (monogenic trait) หรือควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenic trait หรือ quantitative trait) (สุรินทร์, 2552)

1.2. การวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระในประชากรประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่เกิดจากสายพันธุ์แม่ (EW-000256) x สายพันธุ์พ่อ (EW-000254) แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคทั้งหมด มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 31.5-42 มีค่าเฉลี่ย AUDPC เท่ากับ 36.16 ซึ่งมีแนวโน้มไปทางกลุ่มอ่อนแอคล้ายกับค่า AUDPC ของสายพันธุ์แม่ (EW-000256) จากผลการประเมินความต้านทานในประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้ดังกล่าวนี้ จึงสนับสนุนว่าลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในการศึกษาครั้งนี้มีการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในมะระเป็นแบบลักษณะด้อย (recessive trait)

ผลประเมินความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* จำนวน 235 ต้น มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 0-42 เนื่องจากลักษณะทางฟีโนไทป์ของโรคเหี่ยวเหลืองที่ปรากฏไม่สามารถแยกพืชที่มีความต้านทานออกจากพืชที่อ่อนแอได้อย่างชัดเจน จึงใช้การแบ่งกลุ่มต้านทานตามสายพันธุ์พ่อ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 0-10.5 และกลุ่มอ่อนแอตามสายพันธุ์แม่ มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 28-42 เป็นตัวแบ่งกลุ่ม ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง เป็นแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) โดยกราฟมีลักษณะโค้งเบ้ขวา (negative skew) เนื่องจากในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ส่วนมากแสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่อ่อนแอต่อโรค จึงแสดงให้เห็นว่าลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 อาจมียีนควบคุมหลายยีน หรือเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trati) โดยสอดคล้องกับผลการทดสอบค่า Chi-square test (χ^2) ของการแสดงออกด้านฟีโนไทป์ในประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่อัตราส่วนที่คาดหมายไม่เท่ากับ 1 : 3 ตามทฤษฎีของเมลเดล อย่างไรก็ตาม การศึกษาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน แต่พบในพืชวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ในแคนตาลูปมีการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมความต้านทานต่อ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc) โดยพันธุ์ Hemed ต้านทานโรคสูง และ muskmelon พันธุ์ Dulce ที่อ่อนแอต่อโรค ในประชากรลูกรุ่นที่ 2 พันธุ์ Hemed มียีนเด่น 1 ยีนที่ควบคุม คือ *Forc-1* และยีนด้อย คือ *forc-2* (Elkabetz et al., 2016) จากการศึกษาการถ่ายทอดความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระครั้งนี้พบว่า ความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 คู่ ซึ่งการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมต่างไปจากแคนตาลูป ที่ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น เนื่องจากมีความแตกต่างของชนิดของเชื้อสาเหตุ (pathogen) ชนิดของ race โรคเหี่ยวเหลืองในมะระ และแหล่งสายพันธุ์ต้านทาน (resistance sources) ที่ใช้ในการศึกษา อีกทั้งวิธีการวินิจฉัยระดับความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน (Zhang et al., 2014)

2. การวิเคราะห์ข้อมูลด้านจีโนไทป์

การทดสอบ Chi-square test (χ^2) ของข้อมูลจีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ SNP ที่ได้สอดคล้องกับค่าคาดหมายในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 หรือไม่ ซึ่งในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จะมีค่าคาดหมายการกระจายตัวของอัลลีล คือ 1:2:1 พบจำนวน 47 ไพรเมอร์ SNP มีการกระจายตัวของไพรเมอร์ SNP ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน เรียกว่า marker segregation distortion ซึ่งเป็น marker ที่มีการกระจายตัวของอัลลีลคลาดเคลื่อนผิดรูปแบบไปจากอัตราส่วนที่คาดหมายทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของประชากรที่ใช้ศึกษา (Xu and Hu, 2009) และการพบ marker segregation distortion จะพบทั่วไปในการวิเคราะห์จีโนม เช่น เกิดจากความผิดพลาดของการสุ่มตัวอย่างของประชากร การเก็บข้อมูล ข้อมูลทางฟีโนไทป์ และพ่อแม่ที่ใช้ในการทดลอง หรืออาจเกิดจากการคัดเลือกของ gametes และ zygotes (Falconer and Mackay, 1996) และmarker segregation distortion เกิดจากการเข้าคู่ของ loci ที่เด่นของพ่อและแม่ หรือ recombinant genotypes (Alheit et al., 2011) แต่ยังคงสามารถนำมาใช้ได้และไม่มีผลกระทบต่อการทำ QTL mapping (Xu, 2008) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงไม่ตัดไพรเมอร์ SNP ที่เป็น marker segregation distortion ออกจากการสร้างกลุ่มลิงค์เกจ และเพื่อให้เกิดการสร้างแผนที่ยีนที่มีความถี่ของการสร้างแผนที่มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ในส่วนของการจัดเรียงกลุ่มลิงค์เกจที่ได้จากการทดสอบครั้งนี้มีความสอดคล้องในการจัดเรียงของกลุ่มลิงค์เกจกับแผนที่ QTL ของยีนต้านทานโรคราแป้งในมะระในงานวิจัยของ Theeraporn (2017) เนื่องจากเป็น ไพรเมอร์ SNP ชุดเดียวกันซึ่งถูกออกแบบโดยบริษัท East West Seed จำกัด

ผลการสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups : LG) ในมะระมีจำนวน 13 กลุ่มลิงค์เกจ ซึ่งมีจำนวนกลุ่มลิงค์เกจที่มากกว่าจำนวนโครโมโซมของมะระ (x = 11) (Bharathi et al., 2011) อาจเป็นไปได้ว่าจำนวนไพรเมอร์ SNP ที่ถูกคัดเลือกมีจำนวนน้อยจึงทำให้ขาดความเชื่อมโยงกันในกลุ่มลิงค์เกจ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับในการศึกษาแผนที่ของมะระที่เกี่ยวข้องกับดอกเพศเมีย (gynoecy) ในปี 2014 พบจำนวน 15 กลุ่มลิงค์เกจ (Matsumura et al., 2014)

การวิเคราะห์ QTL ของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองใช้การวิเคราะห์ QTL 2 วิธี คือ Interval mapping และ MQM analysis ในการวิเคราะห์ QTL วิธี Interval mapping พบว่ากลุ่มลิงค์เกจที่ 5 เป็น QTL หลัก และกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 เป็น QTL รอง เนื่องจากโดยทั่วไปจะใช้ LOD ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป (Collard, B. C. Y. et al., 2005) เพื่อให้การวิเคราะห์ QTL ให้ความแม่นยำ น่าเชื่อถือและมีความละเอียดของตำแหน่ง QTL จึงใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ MQM analysis (Rajpal et al., 2016; Van Deynze et al., 2009) พบว่ากลุ่มลิงค์เกจที่ 5 ยังคงเป็น QTL หลักที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง และมีค่า LOD สูงสุดเท่ากับ 32.85 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์

(PVE) เท่ากับ 47.5 เปอร์เซ็นต์ ในไพรเมอร์ SNP ชื่อ MOMCH358328_577 อีกทั้งยังไพรเมอร์ SNP นี้เป็น marker segregation distortion ที่การกระจายตัวของไพรเมอร์ SNP ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 อาจเนื่องมาจากในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของฟีโนไทป์ลักษณะต้านทานไม่เท่ากับค่าคาดหมาย 1 :3 และยังการกระจายตัวของค่า AUDPC ของความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองเป็นแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) โดยส่วนมากแสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่อ่อนแอต่อโรค อีกทั้งยังไม่พบ QTL ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 ในการวิเคราะห์ QTL แบบ MQM analysis เนื่องจากมีค่า LOD ที่ต่ำกว่า 3 และมีค่าค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) ที่น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 จึงไม่มีอิทธิพลต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าพบ QTL หลัก (major QTL) เพียงตำแหน่งเดียว อาจเนื่องมาจาก ปัจจัยต่างๆเหล่านี้ ได้แก่ แหล่งของความต้านทาน (resistance source) ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี QTL หลักเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น ปัจจัยที่สอง คือ จำนวณเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ที่นำมาใช้ในการทดสอบนั้นยังมีน้อย ซึ่งจะสังเกตได้จากความหนาแน่นของเครื่องหมายโมเลกุลในบางกลุ่มลิงค์เกจที่มีจำนวนน้อย หรืออีกหนึ่งสาเหตุอาจมาจากจำนวนประชากรรุ่นที่ 2 ที่ใช้ในการทดสอบนี้ยังมีปริมาณไม่มากพอ

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสายพันธุ์มะระที่มีความต้านทานและอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลืองจากมะระ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ EW-000255, EW-000255, EW-000256, และ EW-000257 ทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* และประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังจากวันที่ได้รับเชื้อ โดยให้คะแนนระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ (rating score) สามารถคัดเลือกสายพันธุ์แม่ที่อ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเหลืองที่สุด คือ EW-000256 ที่มีค่าเฉลี่ย AUDPC เท่ากับ 37.65 และมีการกระจายตัวของค่าAUDPC ระหว่าง 28-42 อีกทั้งยังมีลักษณะผลมีสีเขียวเป็นที่ต้องการของตลาดในประเทศไทย และในสายพันธุ์พ่อ EW-000254 มีค่าเฉลี่ย AUDPC เท่ากับ 1.79 และมีการกระจายตัวของค่า AUDPC ระหว่าง 0-10.5 และในประชากร F_1 ที่เกิดจากสายพันธุ์แม่ (EW-000256) x สายพันธุ์พ่อ (EW-000254) แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคทั้งหมด มีค่า AUDPC ตั้งแต่ 31.5-42 มีลักษณะอ่อนแอเหมือนสายพันธุ์แม่(EW-000256) ดังนั้น ยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองในมะระเป็นยีนด้อย (recessive gene)

การศึกษาการกระจายตัวในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 235 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดยการทดสอบ Chi-square test พบว่า ค่า Chi-Square ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 5.99 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.014) โดยมีอัตราส่วนของต้นที่ต้านทานและต้นอ่อนแอต่อโรคเป็น 75 และ 160 ซึ่งไม่อยู่ในสัดส่วน 1:3 จากผลการศึกษาแสดงว่าลักษณะยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระมีอาจมากกว่า 1 คู่ และเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait)

การทดสอบจีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ในมะระ จำนวน 235 ตัวอย่าง สามารถสร้างกลุ่มลิงค์เกจ (linkage groups : LG) จากจำนวน 282 ไพรเมอร์ ได้จำนวน 13 กลุ่มลิงค์เกจ และมีจำนวน 7 ไพรเมอร์ ไม่สามารถจัดกลุ่มลิงค์เกจได้ และพบ marker segregation distortion อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1, 2, 4, 5, 6 และกลุ่มลิงค์เกจ 13 จำนวน 47 ไพรเมอร์

การวิเคราะห์ QTL ของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์โดยวิธี Interval mapping โดยใช้ค่า AUDPC วิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่า กลุ่มลิงค์เกจที่ 5 ให้ค่า LOD สูงที่สุดเท่ากับ 32.85 และ 24.57 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 47.5 และ 38.2 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 มีค่า LOD เท่ากับ 3.83 และ 3.81 มีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 7.2. เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้การวิเคราะห์ QTL มีความแม่นยำน่าเชื่อถือและมีความละเอียดของตำแหน่ง QTL จึงใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ MQM analysis พบว่า

ลักษณะต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองถูกควบคุมด้วย QTL หลัก คือ กลุ่มลิงค์เกจที่ 5 มีค่า LOD สูงสุดเท่ากับ 32.85 และมีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 47.5 ในไพรเมอร์ SNP MOMCH358328_577 และเป็น marker segregation distortion ดังนั้น ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 5 จึงเป็น QTL หลัก (major QTL) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระซึ่งมีผลต่อลักษณะต้านทานโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวเหลือง *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* ในมะระจากประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้เป็นส่วนหนึ่งของ QTL เท่านั้น ซึ่งยังไม่ใช่เครื่องหมายที่อยู่บนยีน อาจมีข้อจำกัดของประชากรที่นำมาประยุกต์ใช้ รวมไปถึงค่าความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ฟีโนไทป์ (PVE) ที่ได้นั้นยังไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมายที่ได้จากการศึกษาที่ได้นั้นยังต้องการการทดสอบกับประชากรอื่นๆ เช่น ประชากรผสมกลับ เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าเครื่องหมายที่ได้สามารถนำไปช่วยในงานด้านปรับปรุงพันธุ์มะระได้ อีกทั้งยังควรมีการศึกษาต่อโดยการหายีนที่สนใจในตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับบริเวณ QTL ที่พบ

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงการทดสอบความแปรปรวนในประชากรของมะระ 4 สายพันธุ์ ว่ามีความแปรปรวนแตกต่างกันหรือไม่ (Test of Homogeneity of Variance) โดยวิธีการของ Bartlett's test

Method	DF	Chisq Value	Pr(>Chisq)
Bartlett	3	4.06	0.2546^{ns}

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงการทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (Test for Normality) ของค่า AUDPC ด้วยวิธี Shapiro-Wilk

Variable	Method	W Value	Pr(< W)
AUDPC_resid	Shapiro-Wilk	0.8964	0.1424 ^{ns}

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงการเปรียบผลของจีโนไทป์ในไพรเมอร์ SNP ที่มีความเหมือนกัน (similarity) โดย 1 หมายถึง ไพรเมอร์ SNP ที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการทดสอบ

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
1	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	B	B	H	H
2	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
3	B	B	H	H	B	B	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H
4	A	A	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	H	H	H	H
5	B	B	A	A	H	H	A	A	B	B	H	H	H	H	A	A
6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	H	H
7	A	A	B	B	B	B	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A
8	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H
9	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	B	B
10	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	H	H	B	B	H	H
11	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
12	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	B	B
13	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H
14	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
15	H	H	H	H	B	B	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H
16	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H
17	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	A	A
18	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
19	A	A	B	B	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	H	H
20	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	B	B
21	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	A	A
22	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B
23	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	H	H
24	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	B	B
25	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H
26	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	H	H	B	B
27	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	B	B
28	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
29	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	A	A	H	H	B	B
30	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	B	B
31	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	A	A	H	H	A	A
32	H	H	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A
33	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
34	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H
35	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	B	B
36	H	H	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B
37	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	H	H	A	A
38	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
39	H	H	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H
40	B	B	A	A	B	B	A	A	B	B	H	H	H	H	H	H
41	A	A	B	B	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H	B	B
42	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	B	B
43	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	H	H	A	A	H	H
44	B	B	H	H	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
45	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	H	H
46	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	A	A
47	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	B	B	H	H	B	B
48	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H
49	A	A	A	A	B	B	H	H	A	A	A	A	B	B	A	A
50	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
51	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
52	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	B	B	A	A	H	H
53	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	H	H	H	H	A	A
54	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	A	A
55	H	H	H	H	A	A	B	B	H	H	H	H	A	A	H	H
56	H	H	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
57	A	A	A	A	B	B	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
58	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	B	B	A	A
59	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A
60	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	A	A	H	H	B	B
61	A	A	B	B	A	A	B	B	A	A	A	A	H	H	A	A
62	H	H	A	A	H	H	B	B	H	H	H	H	B	B	H	H
63	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H	B	B	H	H
64	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
65	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
66	H	H	B	B	H	H	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A
67	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
68	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H
69	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H
70	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A
71	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	H	H	A	A	B	B
72	B	B	H	H	B	B	B	B	H	H	H	H	B	B	B	B
73	H	H	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H	B	B	B	B
74	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	H	H	B	B	A	A

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
75	H	H	B	B	B	B	B	B	H	H	H	H	B	B	B	B
76	A	A	H	H	B	B	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H
77	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B
78	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	A	A	H	H
79	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
80	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H
81	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
82	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	A	A
83	A	A	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	H	H	B	B
84	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	B	B	B	B
85	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H
86	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A
87	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
88	A	A	B	B	B	B	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
89	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	H	H	H	H
90	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A
91	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H
92	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H
93	A	A	A	A	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	H	H
94	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A
95	B	B	H	H	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A
96	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	A	A
97	A	A	B	B	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	H	H
98	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
99	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	B	B	H	H
100	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H	B	B	H	H
101	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	B	B
102	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	H	H	H	H	H	H
103	A	A	H	H	B	B	H	H	A	A	A	A	B	B	A	A
104	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	B	B

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
105	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	B	B	B	B
106	H	H	B	B	A	A	B	B	H	H	H	H	B	B	H	H
107	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	B	B	H	H
108	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	A	A
109	H	H	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H	B	B	H	H
110	A	A	H	H	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	H	H
111	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
112	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
113	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	B	B
114	A	A	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	B	B
115	A	A	H	H	B	B	H	H	A	A	A	A	H	H	A	A
116	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
117	H	H	A	A	B	B	A	A	A	A	H	H	A	A	H	H
118	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	A	A	A	A	B	B
119	A	A	H	H	B	B	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H
120	H	H	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
121	A	A	H	H	A	A	B	B	A	A	A	A	H	H	H	H
122	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	A	A
123	B	B	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
124	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H
125	H	H	B	B	A	A	B	B	A	A	H	H	B	B	A	A
126	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	H	H
127	A	A	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	B	B	A	A
128	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
129	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
130	H	H	B	B	A	A	A	A	H	H	H	H	B	B	H	H
131	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A	H	H	B	B	A	A
132	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H
133	A	A	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	A	A
134	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
135	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	B	B
136	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B
137	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	B	B	A	A
138	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
139	A	A	B	B	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A
140	H	H	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A
141	A	A	H	H	B	B	A	A	A	A	A	A	H	H	B	B
142	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	A	A
143	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B
144	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	A	A
145	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H
146	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
147	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H
148	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H
149	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	A	A
150	A	A	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	A	A
151	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
152	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A
153	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	H	H	B	B	H	H
154	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
155	H	H	B	B	B	B	B	B	H	H	A	A	H	H	H	H
156	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H	B	B
157	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
158	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	B	B	H	H
159	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
160	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
161	H	H	B	B	B	B	B	B	H	H	A	A	H	H	H	H
162	H	H	A	A	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
163	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H
164	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	A	A

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
165	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
166	H	H	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	B	B	B	B
167	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
168	B	B	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	A	A	A	A
169	H	H	B	B	A	A	B	B	H	H	H	H	B	B	A	A
170	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
171	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	B	B	H	H
172	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
173	A	A	H	H	B	B	A	A	A	A	H	H	B	B	A	A
174	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	A	A
175	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	B	B	H	H
176	A	A	H	H	B	B	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
177	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	A	A
178	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B
179	A	A	H	H	H	H	B	B	A	A	H	H	B	B	A	A
180	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A
181	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A
182	H	H	B	B	A	A	H	H	H	H	A	A	H	H	B	B
183	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A
184	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H
185	A	A	H	H	B	B	A	A	H	H	H	H	H	H	B	B
186	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H
187	H	H	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A
188	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
189	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
190	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	B	B
191	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	B	B	A	A
192	H	H	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	A	A	B	B
193	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	B	B	B	B
194	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
195	B	B	B	B	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H
196	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	H	H	A	A	B	B
197	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B
198	H	H	A	A	B	B	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H
199	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H
200	H	H	A	A	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B
201	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H
202	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
203	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	A	A
204	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	B	B
205	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
206	A	A	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	B	B	H	H
207	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	H	H
208	H	H	H	H	B	B	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A
209	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	B	B	H	H
210	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
211	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	B	B	H	H
212	H	H	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	H	H	H	H
213	A	A	A	A	H	H	H	H	A	A	A	A	H	H	B	B
214	A	A	B	B	A	A	B	B	A	A	A	A	B	B	H	H
215	H	H	A	A	B	B	A	A	H	H	A	A	H	H	H	H
216	H	H	A	A	A	A	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H
217	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	H	H	A	A
218	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	B	B	H	H
219	A	A	B	B	A	A	H	H	A	A	B	B	B	B	H	H
220	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A
221	A	A	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	H	H
222	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H
223	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	A	A
224	H	H	B	B	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์		จีโนไทป์	
	BGSNP-1226[1]	BGSNP-1257	BGSNP-1316[1]	BGSNP-1362	MOMCH359954_1317[1]	MOMCH367657_130	BGSNP-1342[1]	BGSNP-1357	BGSNP-1441[1]	BGSNP-1420	BGSNP-1631[1]	BGSNP-1613	BGSNP-1663[1]	BGSNP-1702	MOMCH365503_1591[1]	MOMCH362263_1638
225	A	A	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	H	H
226	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A
227	B	B	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H
228	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A
229	H	H	H	H	H	H	A	A	H	H	B	B	H	H	A	A
230	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
231	A	A	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	H	H	H	H
232	H	H	H	H	A	A	H	H	H	H	H	H	B	B	H	H
233	H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	A	A	H	H	A	A
234	H	H	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A
235	A	A	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	B	B	A	A

ตารางภาคผนวกที่ 4 ไพรเมอร์ SNP 7 ไพรเมอร์ ที่ไม่สามารถจัดอยู่ใน 13 กลุ่มลิงค์เกจในมะระ

ลำดับ	ไพรเมอร์ SNP
1	BGSNP-258
2	MOMCH365503_1591
3	BGSNP-1047
4	BGSNP-815
5	MOMCH362263_1638
6	BGSNP-1632
7	BGSNP-264

MAEJO UNIVERSITY

ตารางภาคผนวกที่ 5 marker segregation distortion อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1, 2, 4, 5, 6 และ 13 จำนวน 47 ไพรเมอร์ SNP

LG	ไพรเมอร์ SNP marker segregation distortion	Signif.
1	BGSNP-1433	****
2	BGSNP-871	*****
2	MOMCH358018_178	*****
2	BGSNP-129	******
2	BGSNP-262	******
2	MOMCH64310_1682	*******
2	BGSNP-691	*******
2	BGSNP-830	*******
2	BGSNP-1631	*******
2	BGSNP-671	*******
2	BGSNP-1768	*******
2	MOMCH352770_502	*******
2	BGSNP-1427	*******
2	BGSNP-1424	*******
2	BGSNP-754	*******
2	MOMCH364065_2311	*******
2	BGSNP-1438	*******
2	BGSNP-1050	*******
2	BGSNP-639	*******
2	BGSNP-1300	*******
2	BGSNP-1441	*******
2	BGSNP-53	*******
2	BGSNP-1226	*******

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

LG	ไพรเมอร์ SNP marker segregation distortion	Signif.
2	BGSNP-1261	*******
2	BGSNP-1221	*******
2	MOMCH143247_192	*******
2	BGSNP-13	*******
4	BGSNP-1576	*******
5	BGSNP-1607	****
5	BGSNP-1041	****
5	BGSNP-1177	******
5	BGSNP-116	*******
5	MOMCH365273_2290	*******
5	MOMCH358328_577	*******
6	MOMCH355719_814	****
6	BGSNP-1094	*******
6	BGSNP-936	*******
6	BGSNP-755	*******
6	MOMCH222222_207	*******
6	MOMCH186607_1054	*******
6	BGSNP-1723	*******
6	BGSNP-211	*******
13	BGSNP-1677	****
13	BGSNP-1217	****
13	BGSNP-801	******
13	BGSNP-1700	*******
13	BGSNP-1698	******

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าพื้นที่ใต้กราฟความรุนแรงของโรค (AUDPC) ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 และจีโนไทป์ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในมะระ

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
1	0	4	4	42	H	A = Homozygous Resistance
2	0	3	4	35	A	H = Heterozygous (Susceptible)
3	0	3	4	35	H	B = Homozygous Susceptible
4	0	0	0	0	A	- = Blank
5	0	0	0	0	A	
6	0	3	4	35	H	
7	0	3	4	35	H	
8	0	3	4	35	H	
9	0	0	0	0	A	
10	0	0	3	10.5	A	
11	0	0	1	3.5	A	
12	0	3	4	35	H	
13	0	3	4	35	H	
14	0	3	4	35	H	
15	0	0	2	7	A	
16	0	0	3	10.5	A	
17	0	0	2	7	A	
18	0	0	1	3.5	A	
19	0	0	3	10.5	H	
20	0	3	4	35	H	
21	0	4	4	42	H	
22	0	3	4	35	H	
23	0	3	4	35	H	
24	0	0	1	3.5	H	
25	0	3	4	35	B	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
26	0	3	3	31.5	A	A = Homozygous Resistance
27	0	0	0	0	A	H = Heterozygous (Susceptible)
28	0	3	3	31.5	A	B = Homozygous Susceptible
29	0	3	4	35	H	- = Blank
30	0	3	4	35	H	
31	0	0	3	10.5	A	
32	0	0	2	7	A	
33	0	3	4	35	H	
34	0	3	4	35	H	
35	0	0	0	0	A	
36	0	3	4	35	H	
37	0	4	4	42	H	
38	0	3	4	35	B	
39	0	3	4	35	H	
40	0	0	0	0	A	
41	0	0	0	0	A	
42	0	4	4	42	B	
43	0	0	2	7	A	
44	0	3	3	31.5	H	
45	0	0	3	10.5	A	
46	0	0	3	10.5	A	
47	0	0	3	10.5	A	
48	0	0	3	10.5	A	
49	0	0	3	10.5	A	
50	0	3	4	35	B	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
51	0	3	4	35	A	A = Homozygous Resistance
52	0	0	0	0	A	H = Heterozygous (Susceptible)
53	0	3	4	35	H	B = Homozygous Susceptible
54	0	3	4	35	H	- = Blank
55	0	3	4	35	H	
56	0	0	3	10.5	A	
57	0	4	4	42	H	
58	0	3	4	35	H	
59	0	3	4	35	H	
60	0	3	4	35	H	
61	0	0	2	7	A	
62	0	0	3	10.5	A	
63	0	3	4	35	H	
64	0	0	2	7	A	
65	0	3	4	35	H	
66	0	3	4	35	H	
67	0	0	1	3.5	A	
68	0	3	4	35	H	
69	0	0	3	10.5	A	
70	0	3	4	35	H	
71	0	0	2	7	H	
72	0	3	4	35	H	
73	0	3	4	35	H	
74	0	0	1	3.5	A	
75	0	3	4	35	H	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของ ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
76	0	0	3	10.5	A	A = Homozygous Resistance
77	0	3	4	35	H	H = Heterozygous (Susceptible)
78	0	3	4	35	H	B = Homozygous Susceptible
79	0	3	4	35	A	- = Blank
80	0	3	3	31.5	A	
81	0	3	4	35	A	
82	0	3	4	35	H	
83	0	3	4	35	H	
84	0	3	4	35	A	
85	0	3	4	35	H	
86	0	0	3	10.5	A	
87	0	0	3	10.5	A	
88	0	0	0	0	B	
89	0	3	4	35	A	
90	0	0	3	10.5	A	
91	0	3	4	35	H	
92	0	3	4	35	H	
93	0	3	4	35	A	
94	0	4	4	42	H	
95	0	0	2	7	A	
96	0	3	4	35	H	
97	0	3	4	35	H	
98	0	4	4	42	H	
99	0	3	4	35	H	
100	0	3	4	35	H	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของ ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
101	0	3	4	35	H	A = Homozygous Resistance
102	0	0	3	10.5	A	H = Heterozygous (Susceptible)
103	0	3	3	31.5	A	B = Homozygous Susceptible
104	0	3	3	31.5	A	- = Blank
105	0	3	4	35	H	
106	0	0	3	10.5	A	
107	0	0	3	10.5	A	
108	0	0	1	3.5	A	
109	0	3	4	35	A	
110	0	0	3	10.5	H	
111	0	3	4	35	H	
112	0	4	4	42	H	
113	0	0	3	10.5	A	
114	0	0	0	0	A	
115	0	3	4	35	H	
116	0	0	0	0	A	
117	0	4	4	42	H	
118	0	3	4	35	H	
119	0	3	4	35	H	
120	0	3	4	35	A	
121	0	4	4	42	H	
122	0	3	4	35	H	
123	0	0	2	7	A	
124	0	0	0	0	A	
125	0	0	3	10.5	A	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
126	0	4	4	42	H	A = Homozygous Resistance
127	0	0	2	7	H	H = Heterozygous (Susceptible)
128	0	0	3	10.5	A	B = Homozygous Susceptible
129	0	3	4	35	H	- = Blank
130	0	3	4	35	H	
131	0	3	4	35	H	
132	0	3	4	35	A	
133	0	0	2	7	A	
134	0	0	2	7	A	
135	0	3	4	35	H	
136	0	0	2	7	A	
137	0	3	4	35	H	
138	0	4	4	42	H	
139	0	3	4	35	H	
140	0	3	4	35	H	
141	0	3	4	35	H	
142	0	3	4	35	H	
143	0	3	4	35	H	
144	0	3	4	35	H	
145	0	3	4	35	H	
146	0	3	4	35	H	
147	0	3	4	35	B	
148	0	0	0	0	A	
149	0	3	4	35	H	
150	0	3	4	35	H	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของ ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
151	0	0	3	10.5	A	A = Homozygous Resistance
152	0	0	0	0	A	H = Heterozygous (Susceptible)
153	0	3	4	35	H	B = Homozygous Susceptible
154	0	3	4	35	H	- = Blank
155	0	3	4	35	B	
156	0	3	4	35	H	
157	0	3	4	35	H	
158	0	0	3	10.5	A	
159	0	3	4	35	H	
160	0	3	4	35	H	
161	0	0	1	3.5	A	
162	0	3	4	35	H	
163	0	0	3	10.5	A	
164	0	3	4	35	H	
165	0	3	4	35	H	
166	0	3	4	35	H	
167	0	3	4	35	H	
168	0	3	4	35	H	
169	0	3	4	35	H	
170	0	3	4	35	H	
171	0	4	4	42	A	
172	0	0	0	0	A	
173	0	0	3	10.5	A	
174	0	3	4	35	A	
175	0	3	4	35	A	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
176	0	3	4	35	H	A = Homozygous Resistance
177	0	4	4	42	H	H = Heterozygous (Susceptible)
178	0	0	1	3.5	A	B = Homozygous Susceptible
179	0	4	4	42	H	- = Blank
180	0	3	4	35	H	
181	0	3	4	35	A	
182	0	3	4	35	H	
183	0	0	3	10.5	A	
184	0	0	1	3.5	A	
185	0	3	4	35	H	
186	0	0	0	0	A	
187	0	3	4	35	H	
188	0	4	4	42	H	
189	0	3	4	35	A	
190	0	3	4	35	H	
191	0	0	3	10.5	A	
192	0	3	4	35	H	
193	0	3	4	35	H	
194	0	3	4	35	B	
195	0	3	4	35	A	
196	0	3	4	35	A	
197	0	3	4	35	A	
198	0	4	4	42	H	
199	0	4	4	42	H	
200	0	0	1	3.5	A	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
201	0	0	3	10.5	H	A = Homozygous Resistance
202	0	3	4	35	A	H = Heterozygous (Susceptible)
203	0	3	4	35	H	B = Homozygous Susceptible
204	0	3	4	35	H	- = Blank
205	0	4	4	42	H	
206	0	3	4	35	H	
207	0	3	4	35	H	
208	0	3	4	35	H	
209	0	3	4	35	H	
210	0	4	4	42	H	
211	0	0	2	7	H	
212	0	3	4	35	H	
213	0	3	4	35	H	
214	0	3	4	35	H	
215	0	3	4	35	A	
216	0	3	4	35	H	
217	0	3	4	35	H	
218	0	0	1	3.5	A	
219	0	3	4	35	H	
220	0	3	4	35	H	
221	0	3	4	35	A	
222	0	3	4	35	H	
223	0	3	4	35	H	
224	0	3	4	35	H	
225	0	3	4	35	H	
226	0	4	4	42	B	
227	0	3	4	35	A	
228	0	3	4	35	H	

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

ชื่อประชากร	ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค			ค่า AUDPC	ผลจีโนไทป์ ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	Remark :
	7 วัน	14 วัน	21 วัน		ไพรเมอร์ SNP : MOMCH358328_577	
229	0	0	1	3.5	-	A = Homozygous Resistance
230	0	0	0	0	A	H = Heterozygous (Susceptible)
231	0	0	2	7	A	B = Homozygous Susceptible
232	0	3	4	35	H	- = **Blank**
233	0	3	4	35	H	
234	0	3	4	35	A	
235	0	0	3	10.5	A	

MAEJO UNIVERSITY

บรรณานุกรม

AgriFarming. 2015. **Bitter gourd farming information guide**. [Online]. Available http://Asiafarming.com/bitter-gourd-farming-guide (11 September 2559).

Alexopoulus, C. J. M. & Blackwell, C. W. 2002. **Introductory mycology**. Wiley.

Alheit, K. V., Reif, J. C., Maurer, H. P., Hahn, V., Weissmann, E. A., Miedaner, T. & Würschum, T. 2011. Detection of segregation distortion loci in triticale (x Triticosecale Wittmack) based on a high-density DArT marker consensus genetic linkage map. **BMC genomics**, 12(1), 380.

Ali Oumouloud, Maria Soledad Arnedo-Andres, Rafael Gonzalez-Torres & Jose María Alvarez. 2008. Development of molecular markers linked to the Fom-1 locus for resistance to Fusarium race 2 in melon. **Euphytica**, 164(2), 347-356.

Bharathi, L. K., Munshi, A. D., Chandrashekaran, S., Behera, T. K., Das, A. B. & John, K. J. 2011. Cytotaxonomical analysis of Momordica L.(Cucurbitaceae) species of Indian occurrence. **Journal of genetics**, 90(1), 21-30.

Chandra, K. & Pandey, A. 2017. QTL Mapping in Crop Improvement: A Basic Concept. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, 6(12), 835-842.

Cheema, J., Ellis, T. H. N. & Dicks, J. 2010. THREaD Mapper Studio: a novel, visual web server for the estimation of genetic linkage maps. **Nucleic acids research**, 38(suppl_2), W188-W193.

Chen Zhendong, Wen Junli , Huang Rukui, Qin Jia & Li Qiqin. 2015. **The molecular identification and detection of Fusarium oxysporum f. sp. momordicae**

Collard, B., Jahufer, Z., Brouwer, J. B. & Pang, E. 2005. **An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts**.

Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. & Pang, E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, 142(1-2), 169-196.

Dhillon, N., Sanguansil, S., Pujan Singh, S., Abu Taher Masud, M., Kumar, P., Bharathi, L., Yetisir, H., Huang, R., Xuan Canh, D. & McCreight, J. 2016. **Gourds: Bitter, Bottle, Wax, Snake, Sponge and Ridge**.

Elkabetz, M., Paris, H. S., Burger, Y., Hanan, A. & Cohen, R. 2016. Two genes for resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum in melon (Cucumis melo, Cucurbitaceae). **Scientia Horticulturae**, 201(57-60).

Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. 1996. Introduction to quantitative genetics. 1996. **Harlow, Essex, UK: Longmans Green**, 3

Genomics, L. 2013. KASP™ Genotyping Chemistry User Guide and Manual. **LGC Limited, Teddington, UK**.

Grover, A. & Sharma, P. C. 2016. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, 36(2), 290-302.

Hartwell, L., Goldberg, M. L., Fischer, J. A., Hood, L. & Aquadro, C. F. 2014. **Genetics: from genes to genomes**. McGraw-Hill Science/Engineering/Math.

Herman, R., Zvirin, Z., Kovalski, I., Freeman, S., Denisov, Y., Zuri, G., Katzir, N., Perl-Treves, R. & Pitrat, M. 2008. Characterization of Fusarium race 1.2 resistance in melon and mapping of a major QTL for this trait near a fruit netting locus.

Kole, C., Olukolu, B., Kole, P., K Rao, V., Bajpai, A., Suthanthiram, B., Singh, J., Rajamanickam, E. & G Abbott, A. 2012. **The First Genetic Map and Positions of Major Fruit Trait Loci of Bitter Melon (Momordica charantia)**.

Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. **Ann. Eugenics**, 12(172-175).

Lambel, S., Lanini, B., Vivoda, E., Fauve, J., Wechter, W. P., Harris-Shultz, K. R., Massey, L. & Levi, A. 2014. A major QTL associated with Fusarium oxysporum race 1 resistance identified in genetic populations derived from closely related watermelon lines using selective genotyping and genotyping-by-sequencing for SNP discovery. **Theoretical and applied genetics**, 127(10), 2105-2115.

Lin, Y. (2008). **Grafting techniques for controlling fusarium wilt of bitter gourd. Fruits and Fertilizer Technology Center PT**.

Lincoln, S. E., Daly, M. J. & Lander, E. S. 1993. Constructing linkage maps with MAPMAKER/Exp Version 3.0. A tutorial reference manual. **Whitehead Institute for Medical Res, Cambridge**.

Madden, L. V., Hughes, G. & Van Den Bosch, F. 2007. The study of plant disease epidemics.

Manly, K. F., Cudmore Jr, R. H. & Meer, J. M. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. **Mammalian Genome**, 12(12), 930-932.

Marlatt, M., Correll, J., Kaufmann, P. & Cooper, P. 1996. Two genetically distinct populations of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici race 3 in the United States. **Plant Disease**, 80(12), 1336-1342.

Matsumura, H., Miyagi, N., Taniai, N., Fukushima, M., Tarora, K., Shudo, A. & Urasaki, N. 2014. Mapping of the Gynoecy in Bitter Gourd (Momordica charantia) Using RAD-Seq Analysis. **PLOS ONE**, 9(1), e87138.

Meru, G. & McGregor, C. 2016. Genotyping by sequencing for SNP discovery and genetic mapping of resistance to race 1 of Fusarium oxysporum in watermelon. **Scientia Horticulturae**, 209(31-40).

Mondini, L., Noorani, A. & Pagnotta, M. A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity**, 1(1), 19-35.

Morton, N. E. 1955. Sequential tests for the detection of linkage. **American journal of human genetics**, 7(3), 277.

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G. & Baloch, F. S. 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 32(2), 261-285.

Oumouloud, A., Arnedo-Andrés, M., González-Torres, R. & Alvarez, J. 2010. Inheritance of resistance to Fusarium oxysporum f. sp. melonis races 0 and 2 in melon accession Tortuga. **Euphytica**, 176(2), 183-189.

Pitrat, M. 1991. Linkage groups in Cucumis melo L. **Journal of Heredity**, 82(5), 406-411.

Plank, J. v. d. 1963. Plant diseases: epidemics and control. **Plant diseases: epidemics and control.**

Rajpal, V. R., Rao, S. R. & Raina, S. 2016. **Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement**. Springer.

Reyes, R. M. 2014. **Current status of bitter gourd production and marketing in Asia and market potential of bitter gourd as a functional vegetable**

Saseetharan, M., Huda, N. & Zakaria, L. 2014. Occurrence of Fusarium spp. on Vegetable Crops and Assessment of Their Pathogenicity. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science***,* 37(4).

Shampo, M. A. & Kyle, R. A. 2002. Kary B. Mullis-Nobel Laureate for Procedure to Replicate DNA. **Mayo Clinic Proceedings***,* 77(7)*,* 606.

Singh, D. K., Upadhyay, A. & Agrahari, P. 2015. A Review on Salient Pharmacological Features of Momordica charantia. **International Journal of Pharmacology***,* 11(5)*,* 405-413.

Stephens, J. M. 1994. **Momordica--Momordica Spp**. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.

Sun, S. & Huang, J. 1985. Formulated soil amendment for controlling Fusarium wilt and other soilborne diseases. **Plant disease***,* 69(11)*,* 917-920.

Sun, S. K. & Huang, J. 1983. A new Fusarium wilt of bitter gourd in Taiwan. **Plant disease***,* 67(2)*,* 226-227.

Tamilselvi, N. & Pugalendhi, L. 2015. AGRONOMIC EVALUATION OF GRAFTED BITTER GOURD (MOMORDICA CHARANTIA L.) CULTIVARS FOR GROWTH AND YIELD.

Tamilselvi, N. A., Pugalendhi, L. & Raguchander, T. 2016. Exploiting cucurbitaceous species as rootstocks for management of Fusarium wilt (Fusarium oxysporum) in bitter gourd. **Australian Journal of Crop Science***,* 10(10)*,* 1460-1465.

Tang-xun, G. & Jian-you, M. 2007. Resistance to the blight disease (Fusarium oxysporum f. sp. momodicae) of several bitter gourd varieties. **Guangxi Agricultural Sciences***,* (4), 15.

Theeraporn Jiratammakun, Cline;, E., Salutan;, V. & Struss;, D. 2017. **QTL mapping of powdery mildew resistant gene in bitter gourd**. National Genetic Conference 2017

Tezuka, T., Waki, K., Yashiro, K., Kuzuya, M., Ishikawa, T., Takatsu, Y. & Miyagi, M. 2009. Construction of a linkage map and identification of DNA markers linked to Fom-1, a gene conferring resistance to Fusarium oxysporum f.sp. melonis race 2 in melon. **Euphytica***,* 168(2)*,* 177-188.

Van Deynze, A., Center, S. B., Ashrafi, H. & Francis, D. 2009. The 42nd Tomato Breeders Roundtable June 28-July 1, 2009 Embassy Suites River Promenade Sacramento, California.

Van Ooijen, J. & Kyazma, B. 2009. MapQTL® 6, Software for the mapping of quantitative trait in experiment populations of diploid species. **Wageningen: Kyazma BV**.

Van Ooijen, J. W. 2006. JoinMap 4. **Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands**.

Watanabe, T. 2010. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species**. CRC press.

Xu, S. 2008. Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics***,* 180(4)*,* 2201-2208.

Xu, S. & Hu, Z. 2009. Mapping quantitative trait loci using distorted markers. **International journal of plant genomics***,* 2009.

Yin, T. M., DiFazio, S. P., Gunter, L. E., Riemenschneider, D. & Tuskan, G. A. 2004. Large-scale heterospecific segregation distortion in Populus revealed by a dense genetic map. **Theoretical and applied genetics***,* 109(3)*,* 451-463.

Zhang, S.-p., Miao, H., Yang, Y.-h., Xie, B.-y., Wang, Y. & Gu, X.-f. 2014. A major quantitative trait locus conferring resistance to fusarium wilt was detected in cucumber by using recombinant inbred lines. **Molecular breeding***,* 34(4)*,* 1805-1815.

กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติธนะ. 2552. มะระขี้นก. หมอชาวบ้าน*,* 367.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2546. ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. กรุงเทพ ฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร ภาควิชาพืชไร่นา.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์. 2550. โรคพืชผักที่สำคัญในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: บริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด.

วีณา จิรัจฉริยากูล. 2555. มะระขี้นก. มหาวิทยาลัยมหิดล คณะเภสัชศาสตร์.

ศศิวิมล แสวงผล, เชฏฐ์ สาทรกิจ และ ทยา เจนจิตติกุล. 2546. สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซุปเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร.

สถาบันวิจัยและพัฒนาที่สูง. 2553. **E-Herbarium (eherb)** ข้อมูลของ มะระ, มะระขี้นก, มะห่อย. [Online]. Available https://eherb.hrdi.or.th/search_result_details.php?herbariumID=1002&name=-%20Balsam%20pear,%20Bitter%20cucumber%20-%20Bitter%20Gourd,%20Bitter%20Cucumber,%20Balsam%20Pear,%20Carilla%20Fruit,%20Balsam%20Apple,%20Bitter%20Melon,%20Bitter%20Squash%20%5B3%5D (20 สิงหาคม 2560).

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุพืช DNA Markers in Plant Breeding. **Journal of Ubon Ratchathani university**, 2546(ฉบับที่ 2 กรกฎาคม-ธันวาคม 2546), 39-58.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลับเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม: กรุงเทพมหานคร.

อุดม โกสัยสุก. 2541. การปลูกผักกินผล. อักษราพิพัฒน.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวศิวาพร แก้วคำฟู

เกิดเมื่อ 03 มกราคม 2528

ประวัติการศึกษา พ.ศ.2545 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง

พ.ศ.2550 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ (พืชผัก) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ.2556 สำเร็จการศึกษาปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ธุรกิจเกษตร) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ประวัติการทำงาน พ.ศ.2550-2553 นักวิจัยระดับ Research Technician แผนก Cell Biology

พ.ศ.2554 นักวิจัยระดับ Assistant Research แผนก Molecular Genetics LAB

พ.ศ.2554-2556 นักวิจัยระดับ junior Research แผนก Molecular Genetics LAB

พ.ศ.2557-2558 นักวิจัยระดับ Research Specialist II แผนก Molecular Genetics LAB

พ.ศ.2557-ปัจจุบัน นักวิจัยระดับ Research Specialist II แผนกTrait Introgression ฝ่าย Biotechnology