

การใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรม ของมะละกอ

The use of ISSR markers for genetic diversity of papaya cultivars

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์¹, ปิยะวดี เจริญวัฒนะ^{1*}, คำรพ รัตนสุต² และ อรุโณทัย ชาววา³

Suttawat Sinthirarot¹, Piyavadee Charoenwattana^{1*}, Kumrop Ratanasut²

and Aroonothai Sawwa³

บทคัดย่อ: การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ จากการทดสอบไพรเมอร์ 60 สายไพรเมอร์ พบว่า 57 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ จึงได้นำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 240 แถบ (39%) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 160-3,000 คู่เบส ค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.98 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) สามารถจัดมะละกอออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถช่วยในการประเมินและปรับปรุงพันธุ์มะละกอได้ต่อไป

คำสำคัญ: ไอเอสเอสอาร์, มะละกอ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ABSTRACT: Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used for genetic diversity analysis of 32 papaya cultivars (*Carica papaya* L). Fifty-seven selected ISSR primers amplified 612 bands ranging in size from 160-3,000 bp and 240 bands were polymorphic (39%). The similarity index ranged from 0.47 to 0.98. Cluster analysis using unweighted pair group method arithmetic mean (UPGMA) method based on genetic similarity indexes indicated that the 32 cultivars were clustered into three major groups. These clusters are in accordance with their geographical locations. The ISSR marker system is useful for identification and analysis of genetic diversity of papaya cultivars, and also for papaya breeding in future.

Keywords: ISSR markers, papaya, genetic diversity

¹ สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

Division of Crop Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

² ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University

³ สำนักงานวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives

* Corresponding author: piyavadee55@gmail.com

บทนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลเขตร้อนชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นพืชที่ปลูกง่าย เจริญเติบโตเร็วและให้ผลผลิตตลอดทั้งปี ในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะละกอในเชิงการค้าขนาดใหญ่ของประเทศอยู่ในภาคต่างๆ ทั่วประเทศ ซึ่งการผลิตมะละกอมุ่งเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และเพื่อการส่งออก สามารถทำรายได้ปีละหลายล้านบาท ผลผลิตมะละกอเฉลี่ยต่อปีมีจำนวนทั้งสิ้น 134,443 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,633 กิโลกรัม/ไร่ โดยประเทศไทยได้ส่งออกมะละกอสตจจำนวน 1,600 ตัน คิดเป็นมูลค่า 19.40 ล้านบาท และมะละกอบรรจุภาชนะอัดลม 2,348 ตัน มูลค่าการส่งออก 76.10 ล้านบาท (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550) นอกจากนี้ยังมีการผลิตมะละกอเพื่อกรีดน้ำยางไปใช้ในทางอุตสาหกรรม (พิภพ และสิริวิรัตน์, 2552) และมีการศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันเมล็ดมะละกอเพื่อพัฒนาเป็นน้ำมันพืชเพื่อการบริโภคได้ (ปิยวดี, 2551) มะละกอจึงกลายเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีผู้นิยมปลูกกันมากขึ้น มีการพัฒนาสายพันธุ์ และการสร้างพันธุ์ลูกผสมเพื่อให้ได้พันธุ์มะละกอที่มีคุณภาพ สำหรับมะละกอพันธุ์ที่นิยมปลูกในปัจจุบันมีความหลากหลายของสายพันธุ์ การจำแนกแหล่งที่มาและความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรมค่อนข้างยาก บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม และมีการตั้งชื่อพันธุ์มะละกอเป็นพันธุ์ใหม่ไปเรื่อยๆ ตามถิ่นที่ปลูกหรือตามลักษณะที่เปลี่ยนไป ทำให้เกิดความสับสนในการเรียกชื่อพันธุ์ การชื่อเมล็ดพันธุ์ ตลอดจนการผลิตเมล็ดพันธุ์ในอนาคต ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพผลผลิตของมะละกอที่ไม่ได้มาตรฐานตรงตามพันธุ์ (Janthasri *et al.*, 2007)

การนำเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาและบันทึกข้อมูลพันธุกรรมของมะละกอ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการจัดจำแนกสายพันธุ์มะละกอให้มีความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ในประเทศไทยได้มีการนำเอาเครื่องหมาย

เอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphisms) มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ (Janthasri *et al.*, 2007) แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูง วิธีการใช้ค่อนข้างซับซ้อน และไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่าง หรือเหมือนกันมากๆ (สุรินทร์, 2545) นอกจากนี้มีการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ช่วยในการคัดเลือกเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ (Oliveira *et al.*, 2010) การใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์ Caricaceae และการจำแนกเพศของมะละกอ (Costa *et al.*, 2011) และการประเมินค่า genetic distance ในมะละกอผสมกลับรุ่นลูก (Ramos *et al.*, 2012) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายไอ เอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeats) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษา จึงไม่มีข้อจำกัดในการใช้งาน (Godwin *et al.*, 2001) มีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) เกิดความแตกต่าง (polymorphism) สูง ใช้เวลาน้อย วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน (อรรชร, 2547) ข้อมูลเชื่อถือได้ จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกหมวดหมู่มะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ ที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษโดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์มะละกอต่อไป

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างพืช

พันธุ์มะละกอจากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษจำนวน 32 พันธุ์ดังนี้ Forida, HO, HOSno.1, HOSno.2, HOSno.3, KDDNs, KDLS1, KDLS2, KD-Si, KK80, KN(SR), KNLS1, LN, MA, MI, Maradol, MIR, SEW58, SK001, SK002, SK003, SK004, Taiwan, Khaek Dum, Khaek Nuan, Khrang, Tha Phra3,

Number 12, Pak Chong, Hybrid Australia, Si Tong และ Hawaii โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นกล้าอายุ 2 เดือนจำนวนต้นละ 1-2 ใบ เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของมะละกอด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Kang *et al.* (1998) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1xPCR buffer 0.4 mM dNTP 2 mM $MgCl_2$ 0.6 mM primer 0.5 unit Taq polymerase (Fermentas) และดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรม PCR ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที โดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่องถ่ายภาพสารพันธุกรรม (Gel documentation) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder plus และ 100 bp DNA ladder plus (Fermentas) คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างชัดเจน

การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะละกอลดแต่ละสายพันธุ์ ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาไอเอสเอสอาร์-พีซีอาร์โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index, S.I.) จากสูตร $S.I. = 2n_{ab} / (n_a + n_b)$ (Lynch, 1991) เมื่อ n_a และ n_b แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และ n_{ab} คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ก่อนนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรม เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอลดทั้ง 32 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.1 (Rohlf, 1998)

ผลการศึกษา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะละกอลด 32 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 60 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ 57 ไพรเมอร์หรือคิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Table 1) โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่างกันจำนวน 240 แถบ (39%) ขึ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดประมาณ 160-3,000 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ (GT)₇AG มีขนาดประมาณ 270-1,300 คู่เบส (Figure 1) จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ Florida กับ HOSno.3 มีค่าต่ำที่สุด (0.47) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ Tha Phra3 กับสายพันธุ์ KK80 มีค่าสูงที่สุด (0.98) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอลดด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน และสร้างแผนภาพ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) ของมะละกอลดทั้ง 32 สายพันธุ์ สามารถจัดเป็น 3 กลุ่มที่แตกต่างกันทางพันธุกรรม โดยกลุ่มที่ 1 อยู่ในเขตอเมริกาเหนือ กลุ่มที่ 2 และ 3 อยู่ในเขตแปซิฟิก (Figure 2)

วิจารณ์

จากการทดลองพบว่ามะละกอสายพันธุ์ Tha Phra3 กับ KK80 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.98 (98%) ซึ่งสอดคล้องกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเนื่องจากมะละกอ KK80 เป็นมะละกอที่พัฒนาสายพันธุ์มาจากมะละกอ Tha Phra3 (วิไล และคณะ, 2551) เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 สายพันธุ์ ด้วยวิธี UPGMA และนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ 32 สายพันธุ์ พบว่ามะละกอสายพันธุ์ Florida Tha Phra3 และ KK80 ถูกแยกออกมาจากกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับข้อมูลการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ โดย Florida เป็นมะละกอที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอเมริกาเหนือ ส่วน Tha Phra3 และ KK80 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง Florida กับแขกดำ (วิไล และคณะ, 2551) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอทั้ง 32 สายพันธุ์ ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่ม

ความสัมพันธ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.63 ถึง 0.98 ซึ่งมีช่วงความเหมือนทางพันธุกรรมกว้างกว่าความเหมือนทางพันธุกรรมของการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมะละกอที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 30 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเอเฟลเจลล์ จากการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 12 คู่ พบว่าค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.726 ถึง 0.92 และจำแนกเป็น 6 กลุ่ม (Janthasri *et al.*, 2007) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสายพันธุ์มะละกอที่นำมาศึกษาและเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์มีความแตกต่างกัน ไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวในการตรวจสอบครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน (สุรินทร์, 2552) ในขณะที่ไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายแบบ codominant สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote และใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์มะละกออย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว (Oliveira *et al.*, 2010)

Table 1 Total number of DNA bands and polymorphic bands from ISSR analysis of thirty-two papaya cultivars using 60 primers.

Primer	Number of DNA bands		Ta*	Primer	Number of DNA bands		Ta*	Primer	Number of DNA bands		Ta*
	total	polymorphic			total	polymorphic			total	polymorphic	
(AG) ₈ T	12	6	50	(GACA) ₄	14	13	55	(CA) ₈ G	11	6	55
(GA) ₈ T	12	3	50	(CAA) ₅	12	3	50	(AC) ₈ G	13	8	50
(CT) ₈ A	9	5	55	(GA) ₈ A	13	3	50	(CA) ₈ RT	9	4	50
(GT) ₈ YT	6	4	55	(GT) ₈ A	11	7	50	(CA) ₈ RG	14	10	55
(AG) ₈ YA	6	0	50	(TC) ₈ A	7	1	50	(GT) ₈ YC	14	5	55
(CAC) ₃ GC	9	0	55	(TC) ₈ G	6	2	50	(AC) ₈ YG	16	8	50
(CT) ₈ RC	5	4	50	(TG) ₈ C	6	0	50	(ATG) ₈	12	3	50
(AC) ₈ YA	15	10	55	(GA) ₈ YT	6	3	50	(GAA) ₈	13	6	50
(ACC) ₈	9	2	50	(CTC) ₈	13	4	55	(GGAGA) ₅	13	5	50
DBD(AC) ₇	18	5	55	(GA) ₈ C	15	9	55	DVD(TC) ₇	17	8	55
(CAG) ₅	6	0	55	(CT) ₈ T	8	4	55	BDB(CA) ₇	10	2	55
(AGC) ₅ GR	8	0	55	(CT) ₈ G	8	0	50	VHV(GT) ₇	17	6	55
(AGC) ₅ AY	14	5	55	(TC) ₈ C	12	3	50	HVH(TG) ₇	15	8	50
CA(GA) ₈	11	4	50	(AGC) ₈	8	1	55	A(CA) ₈ G	4	2	50
(GAG) ₃ GC	9	4	55	(CCG) ₈	8	1	50	(ATG) ₈ G	17	7	55
GC(GA) ₈	12	6	55	(CA) ₈ GT	9	7	55	CT(CCT) ₃ CAC	9	3	50
(AGC) ₅ Y	19	0	55	(GA) ₈ CC	5	0	55	(GT) ₇ AG	7	5	55
GGGT(GGGGT) ₂ G	9	2	55	(CCCCT) ₄	11	3	50	(CA)7TC	0	0	-
(GA) ₈ YC	9	2	55	(AG) ₈ C	10	8	55	(GATA) ₄	0	0	-
(CAGA) ₄	10	5	50	(AG) ₈ G	14	7	55	(AT) ₈ G	0	0	-

B=(C,G,T), D=(A,G,T), Y=(C,T), R=(A,G), V=(A,C,G), H=(A,C,T)

*Ta = annealing temperatures

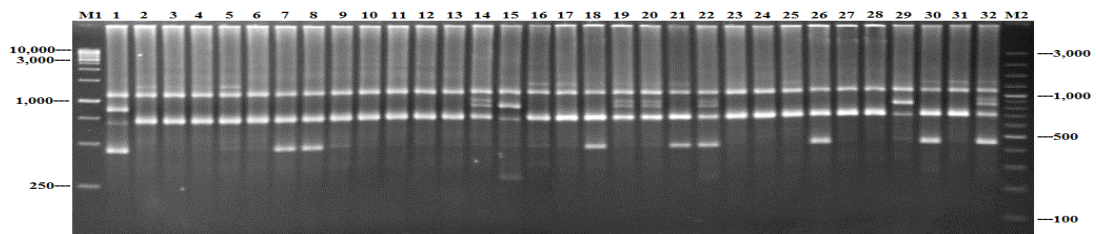


Figure 1 ISSR patterns of thirty-two papaya cultivars (using primer $(GT)_7AG$ Lane M1, 1kb DNA ladder plus; Lane 1-32, Florida, HO, HOSno.1, HOSno.2, HOSno.3, KDDNs, KDLS1, KDLS2, KD-Si, KK80, KN(SR), KNLS1, LN, MA, MI, Maradol, MIR, SEW58, SK001, SK002, SK003, SK004, Taiwan, Khaek Dum, Khaek Nuan, Khrang, Tha Phra3, Number 12, Pak Chong, Hybrid Australia, Si Tong and Hawaii; Lane M2, 100 bp DNA ladder plus.

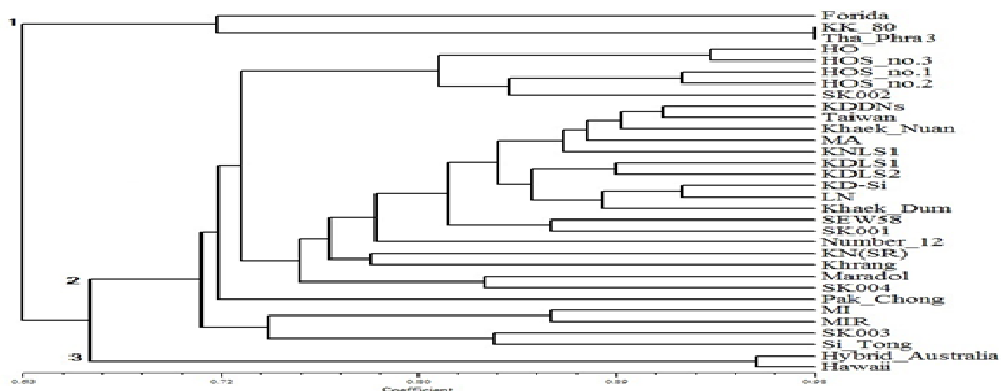


Figure 2 Dendrogram of thirty-two papaya cultivars based on ISSR data using 57 primers with UPGMA cluster analysis.

สรุป

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสามารถในการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอในระดับหนึ่ง โดยสามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอจำนวน 32 สายพันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอ และมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.98 ซึ่งงานวิจัยนี้ยังแสดงถึงศักยภาพของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกสายพันธุ์มะละกอได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น มะกอกน้ำมัน (Gomes *et al.*, 2009) ถั่วลิสง (Raina *et al.*, 2001) และ ชา (Lai *et al.*, 2001) เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้นี้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินสายพันธุ์มะละกอจากแหล่งต่างๆ มาใช้ในการปรับปรุง

พันธุ์มะละกอ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพและให้ผลผลิตสูง

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. เกษตรฯ แรงแก้ปัญหา มะละกอลดฮวบแม่ค้าล้มต๋องสะเทือน เหตุไวรัสจุดวงแหวนระบาดหนัก หวั่นกระทบยอดส่งออก-ผลผลิตขาดตลาดกว่า 1.5 หมื่นตันต่อปี (ออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.moac.go.th/ewt_news.php?nid=2970&filename=NFC. ค้นเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2555.
- ปิยวดี สัมมาเพชร. 2551. การศึกษาสมบัติของน้ำมันเมล็ดมะละกอเพื่อพัฒนาเป็นน้ำมันบริโภค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- พิภพ สมเวทย์ และศิริรัตน์ เพชรเหมือน. 2552. โครงการการศึกษาสายพันธุ์ระบบการผลิตและการตลาดของมะละกอในจังหวัดกระบี่. มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต.

- วิไล ปราสาทศรี, อุดม คำชา, เฉลิมชัย ปราสาทศรี, รัชนี้ ศิริยาน, สุวิทย์ ชัยเกียรติยศ และ Dennis Gonsalves. 2551. ขอนแก่น 80 มะละกอผลเล็กเพื่อกินสุกและส่งออก. กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- _____. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 64.
- อรรณณ ชลวานิชย์. 2547. การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของ เปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Costa, F.R., N.S.P, Telma, P.C.G., Ana and G.P., Messias. 2011. NOTE ISSR markers for genetic relationships in Caricaceae and sex differentiation in papaya. In Biotechnology 11: 352-357.
- Godwin, I.D., E.S. Mace and Nurzuhairawaty. 2001. Genotyping Pacific Island Taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) Germplasm, pp.109-128. In: Plant Genotyping the DNA Fingerprinting of Plants,
- Henry, ed. Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants. CABI Publishing, Australia.
- Gomes, S., P.M. Lopes, J. Lopes and H. Guedes-Pinto. 2009. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR. Plant Molecular Reporter 27(3): 365-373.
- Janthasri, R., S. Katengam and U. Khumcha. 2007. An Analysis on DNA Fingerprints of Thirty Papaya Cultivars (*Carica papaya* L.), Grown in Thailand with the Use of Amplified Fragment Length Polymorphisms Technique. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 3072-3078.
- Kang, H.W., Y.G. Cho, U.H. Yoon and M.U. Eun. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Molecular Biology Reporter 16 : 1-9.
- Lai, J.A., W. C. Yang and J. Y. Hsiao. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Botanical Bulletin- Academia Sinica 42: 93-100.
- Lynch, M. 1991. analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting, DNA Fingerprinting: Approaches and Application, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Oliveira, E.J., A. Santos Silva, F. M. Carvalho, L. F. Santos, J. L. Costa, V. B. Oliveira Amorim and J. L. L. Dantas. 2010. Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular- assisted selection. Euphytica 173: 279-287.
- Raina, P. S., V. Rani, T. Kojima, K.P.Singh and R. M. Devarumath. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification. and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. Genome 44: 763-772.
- Ramos, H.C.C., M.G., Pereira, L.S.A., Gonçalves. A.P.C.G., Berilli, F.O. Pinto and E.H. Ribeiro. 2012. Multivariate analysis to determine the genetic distance among backcross papaya (*Carica papaya*) progenies. Genetics and Molecular Research 11 (2): 1280-1295.
- Rohlf, F.J., 1998. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 3.2. 1st Edn., Exeter Software, New York.