

การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเมลอนโดยเทคนิค เครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์

Evaluation of genetic variation in melon by SSR marker technique

อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ^{1*}
Orapin Saritnum^{1*}

บทคัดย่อ: การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเมลอนโดยอาศัยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ จำนวน 50 ชุดไพรเมอร์ มี 9 ชุดไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเมลอน 15 สายพันธุ์ได้ โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันเกิดขึ้นทั้งหมด 9 แถบ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเมลอนอยู่ในช่วง 0.29-1.00 จากการวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งเมลอนออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในด้านลักษณะผิวผลและสีเนื้อผล ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของเมลอนโดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ จึงเป็นประโยชน์สำหรับฐานข้อมูลทางพันธุกรรมเมลอน สามารถช่วยในการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม สำหรับใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์เมลอนต่อไป

คำสำคัญ: เมลอน, ดีเอ็นเอ, เอส เอส อาร์, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ABSTRACT: Evaluation of genetic variation in melon by SSR marker technique was reported. A total of 50 SSR primer pairs were applied in this study, 9 SSR primer pairs detected polymorphisms which showed a total of 9 polymorphic DNA bands with a genetic similarity coefficient in the range of 0.29-1.00 among all cultivars. By UPGMA cluster analysis, the dendrogram could be separated into 3 groups that related with the morphological characteristics in term of fruit skin and flesh color. Data of genetic variation of melon by SSR markers will be useful to melon genetic database for evaluation and use in melon breeding program further.

Keywords: melon, DNA, SSR, genetic variation

บทนำ

เมลอน (*Cucumis melo* L.) เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Cucurbitaceae จัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในพืชตระกูลนี้ มีการปลูกในหลายประเทศทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน รวมทั้งในประเทศไทย เมลอนเป็นพืชที่มีรสชาติดี หวาน มีกลิ่นหอม และอุดมไปด้วยโปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ (Lorenz and Maynard, 1988) จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์

ทั้งเป็นอาหารและแปรรูปในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เนื่องจากเมลอนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งในด้านรูปร่างผล สี กลิ่น รสชาติ ตลอดจนความต้านทานโรค (Whitaker and Davis, 1962) นอกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์พืชแล้ว การใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย การใช้ดีเอ็นเอซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในการจำแนกพันธุ์พืชนั้น สามารถใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด

¹ สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Program in Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University

* Corresponding author: orapins343@hotmail.com

(Begum et al., 2013) ถือเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูง อีกทั้งไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมและข้อจำกัด ปัจจุบันจึงมีการใช้เทคนิคชีวโมเลกุลในการจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชต่างๆ เช่น แตงกวา พักทอง แตงโม (Katzir et al., 1996) มะม่วง (Singh et al., 2009) องุ่น (Zdunic et al., 2009; Meneghetti et al., 2011) เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดกลุ่มสายพันธุ์เมลอน ทำการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเมลอนโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับฐานข้อมูลทางพันธุกรรมเมลอนเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เมลอนต่อไป

วิธีการศึกษา

การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเมลอนโดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ นั้น ทำการเก็บตัวอย่างใบเมลอนสายพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมและปลูกในโรงเรือนจำนวน 15 สายพันธุ์

(Table 1) มาวิเคราะห์พันธุกรรมด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ ทำการสกัดดีเอ็นเอ และใช้วิธีการรวมดีเอ็นเอเมลอนตามสายพันธุ์ ซึ่งจะไดดีเอ็นเอเมลอนทั้งหมด 15 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ละ 5 ตัวอย่างรวม) นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์ SSR จำนวน 50 ชุดไพรเมอร์ (Katzir et al., 1996; Danin-Poleg et al., 2001; Naoki et al., 2003; Patricia et al., 2004) นำส่วนผสมของดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วไปแยกแแถบดีเอ็นเอด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) ในแผ่นเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที ย้อมสีแแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV Transilluminator และบันทึกภาพแแถบดีเอ็นเอที่ได้

การประเมินความแตกต่างของแแถบดีเอ็นเอในกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ข้อมูลค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.2 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)

Table 1 Description of melon to analysis by SSRs

Code	Name	Flesh color	Fruit skin
ME01	Yellow Honey dew Cream	Orange	Smooth
ME02	Honey dew	White	Smooth
ME03	Cream Honey dew	Orange	Smooth
ME04	Musk melon	Green	Netted
ME05	Yellow Honey dew	Orange	Smooth
ME06	Hami	Orange	Netted
ME07	Galia	Green	Netted
ME08	Yellow canary	Green	Smooth
ME09	Western shipper	Orange	Netted
ME10	Yellow Honey dew	White	Smooth
ME11	-	Green	Netted
ME12	-	Green	Netted
ME13	-	Green	Netted
ME14	-	Green	Netted
ME15	-	Green	Netted

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเมลอน 15 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ จำนวน 50 ชุด ไพโรมอร์ เพื่อประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า มีเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ จำนวน 21 ชุดไพโรมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 28 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่างกัน (Polymorphisms) ทั้งหมด 9 แถบ คิดเป็น 32.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้จากเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ จำนวน 9 ชุดไพโรมอร์ ได้แก่ CMACC146, CMAGN68, CMBR53, CMCCA145, CMCTT144, CMTC160a+b, CMTC168, CSAT425 และ CSCSTTT15a แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันทั้ง 9 แถบนี้ แสดงแถบดีเอ็นเอหลักที่มีความเฉพาะเจาะจงในแต่ละชุดไพโรมอร์นั้นๆ (Table 2; Figure 1) จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน พบว่า ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเมลอนตัวอย่าง ME14 และ ME15 มีค่า 0.56 ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง

ME01, ME05 และ ME11 มีค่าสูงสุด 1.0 รวมทั้งในกลุ่มตัวอย่างเมลอน ME02, ME04, ME06, ME07, ME09 และ ME12 ด้วยเช่นกัน (Figure 2)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างเมลอนด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Dendrogram) ของเมลอนทั้ง 15 สายพันธุ์ สามารถจัดเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ ME14 และ ME15 มีลักษณะผิวผลและสีเนื้อผลที่เหมือนกัน กลุ่มที่ 2 คือ ME03 และ ME10 ซึ่งเป็นเมลอนในกลุ่ม Honey drew มีลักษณะผิวผลที่เหมือนกัน ส่วนกลุ่มที่ 3 คือ ME01, ME05, ME11, ME02, ME04, ME06, ME07, ME09, ME12, ME08 และ ME13 (Figure 2) ทั้งนี้ สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ CMTC168, CMAGN68 และ CMACC146 ร่วมกันในการคัดเลือกลักษณะผิวผลเรียบ สีเนื้อผลเขียว ออกจากกลุ่มที่มีลักษณะผิวผลเรียบ สีเนื้อผลขาวหรือส้มได้

Table 2 List of SSR primers and their characteristics based on genetic analysis of melon

Primer	Sequence (5'-3')	Allele size (bp)
CMACC146	F = CAACCACCGACTACTAAGTC R = CGACCAAACCCATCCGATAA	152
CMAGN68	F = GGAAGGAAATTAGCATGCAC R = GCCACTCTGTCTTTCTTCC	190
CMBR53	F = GCCTTTTGTGATGCTCCAAT R = AAACAAACATGGAAATAGCTTTCA	134
CMCCA145	F = GAGGGAAGGCAGAAACCAAAG R = GCTACTTTTGTGGTGGTGG	142
CMCTT144	F = CAAAAGGTTTCGATTGGTGGG R = AAATGGTGGGGGTGAATAGG	192
CMTC160a+b	F = GTCTCTCTCCCTTATCTTCCA R = GATGGTGCCTTAGTTGTTCCG	215
CMTC168	F = ATCATTGGATGTGGGATTCTC R = ACAGATGGATGAAACCTTAGG	200
CSAT425	F = TAGGGCAGGTATTATTTCAG R = ACGGACTGATTAGTATAGGC	93
CSCSTTT15a	F = GTTTGATAATGGCGGATTGT R = GTAGAAATGAAGGTATGGTGG	198

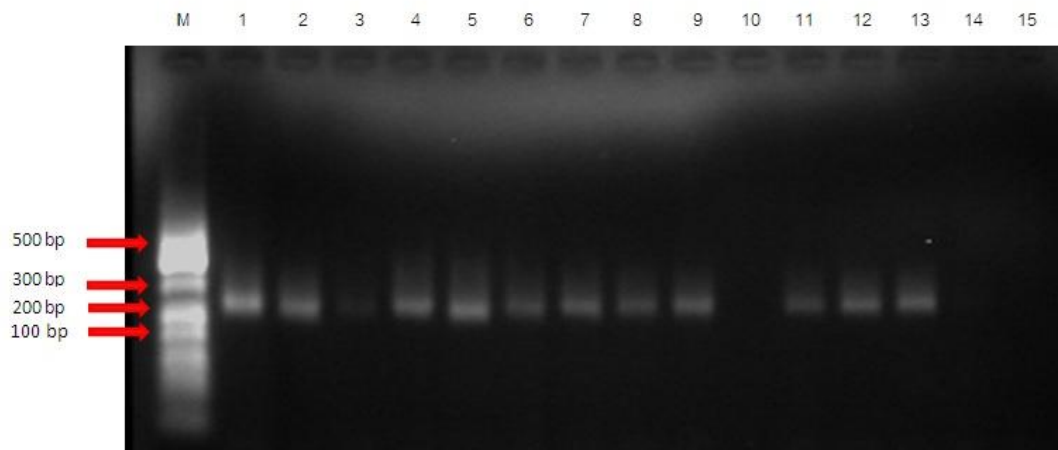


Figure 1 Sample of simple sequence repeat (SSR) profile of melon genotypes using CMTC168, Lane M: Molecular weight marker, Lane 1-15: melon samples

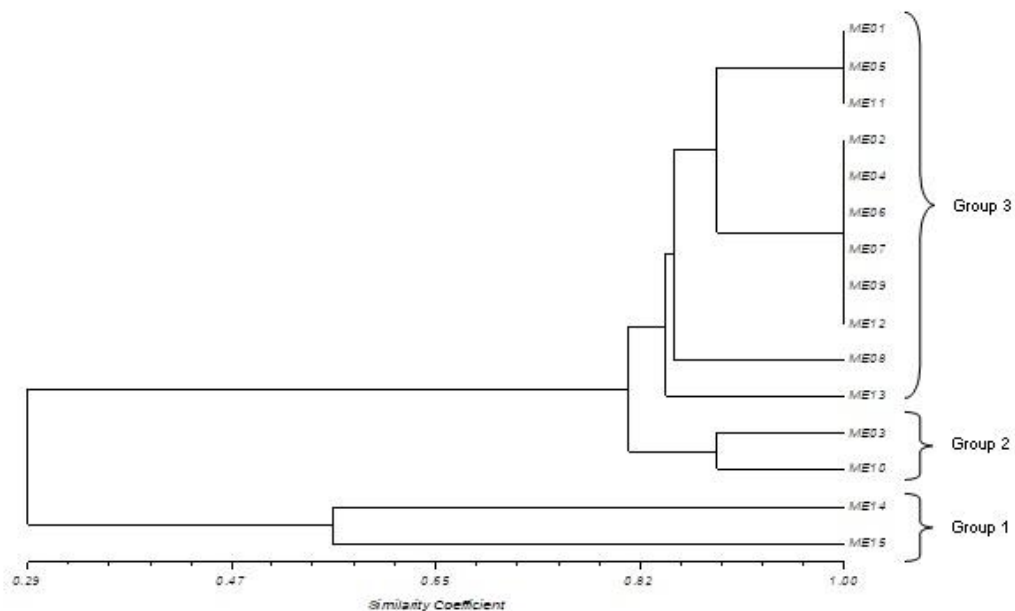


Figure 2 UPGMA dendrogram of 15 melon genetic materials based on SSRs

จากการศึกษาพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเมลอนจำนวน 15 สายพันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในด้านลักษณะผิวผลและสีเนื้อผลเป็นส่วนใหญ่ และมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.29-1.00 แม้ตัวอย่างเมลอนที่นำมาศึกษาจะมีความแตกต่างกันใน

กลุ่มชนิดของเมลอน รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน แต่พบว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมไม่มาก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nhi et al. (2010) ที่พบว่า ถึงแม้เมลอนในเวียดนามที่นำมาศึกษาจะมีชนิดที่แตกต่างกัน และมีความแตกต่างกันทางด้านสัณฐานวิทยา แต่กลับมีความแปรปรวนทางด้านพันธุกรรมที่ต่ำ ซึ่งการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย

โมเลกุล เอส เอส อาร์ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการประเมินค่าลักษณะทางพันธุกรรมของเมลอนเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม หากมีการศึกษาเพิ่มเติม ใช้เครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ จำนวนเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันมากยิ่งขึ้น หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุลอื่นมาร่วมมากขึ้น ตลอดจนการเลือกใช้เทคนิคการตรวจสอบผลในการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยไฟฟ้าโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อให้แสดงผลได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดียิ่งขึ้น

สรุป

การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเมลอนโดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเมลอนจำนวน 15 สายพันธุ์ ออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในด้านลักษณะผิวผล และสีเนื้อผล แสดงให้เห็นถึงเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์ สามารถนำมาใช้ในการประเมินลักษณะทางพันธุกรรมของเมลอน ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการจัดจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของเมลอนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ บริษัท ฮอทิเจนเนติกส์วีเลิร์ซ (เอส.อี.เอเซีย) จำกัด ตลอดจนผู้ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานต่างๆ ทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

- Begum, H., M.T. Reddy, S. Malathi, B.P. Reddy, G. Narshimulu, J. Nagaraju, and E.A. Siddiq. 2013. Microsatellite analysis of intracultivar diversity in 'Chinnarasam' mango from Andhra Pradesh, India. *African Crop Science Journal*. 21(2): 109-117.
- Danin-Poleg, Y., N. Reis, G. Tzuri and N. Katzir. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in cucumis. *Theo. Applied Genet*. 102: 61-72.
- Katzir, N., Y. Danin-Poleg, G. Tzuri, Z. Karchi, U. Lavi, and P.B. Cregan. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several cucurbitacean species. *Theor. App. Genet*. 93: 1282-1290.
- Lorenz O.A., and D.N. Maynard. 1988. *Knott's handbook for vegetable growths*. John Wiley & Sons., New York, USA.
- Meneghetti, S., A. Costacurta, G. Morreale, and A. Calo. 2011. Study of intra-varietal genetic variability in grapevine cultivars by PCR-derived molecular markers and correlations with the geographic origins. *Molecular Biotechnology*. 50(1): 72-85.
- Naoki, C., K. Suwabe, T. Nunome, and M. Hirai. 2003. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major Cucurbit crops. *Breeding Science*. 53: 21-27.
- Nhi, P.T.P., Y. Akashi, T.T.M. Hang, K. Tanaka, Y. Aierken, T. Yamamoto, H. Nishida, C. Long, and K. Kato. 2010. Genetic diversity in Vietnamese melon landraces revealed by the analyses of morphological traits and nuclear and cytoplasmic molecular markers. *Breed. Sci*. 60: 255-266.
- Patricia, S.R., T.C. de L. Lins, R.L. Tristan, G.S.C. Buso, J.A. Buso, and M.E. Ferre. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*. 4.
- Singh, S., A.B. Gaikwad, and J.L. Karihaloo. 2009. Morphological and molecular analysis of intracultivar variation in Indian mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*. 829: 205-212.
- Whitaker, T.W., and G.N. Davis. 1962. *Cucurbits. Botany, Cultivation and Utilization*. Word Crop Books. International Science Publishers Inc., New York.
- Zdunic, G., E. Maletic, A. Vokurka, J.K. Kontic, I. Pezo, and I. Pejic. 2009. Intravarietal variability of the cultivar 'Plavac Mali' (*Vitis vinifera* L.). *Acta Horticulturae*. 827: 203-206.