



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสืบค้นหายีนความหอม
ในแตงกวา

**(Identification of Gene Controlling
Fragrance (2-Acetyl-1-Pyrroline) in
Cucumber)**

โดย ประกิจ สมท่า

กรกฎาคม 2558

สัญญาเลขที่ RSA5580057

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสืบค้นหายีนความหอมในแตงกวา
(Identification of Gene Controlling Fragrance (2-Acetyl-1-Pyrroline) in Cucumber)

ประกิจ สมท่า
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกระผมขอขอบคุณบุคคล ดังต่อไปนี้

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เรืองชัย จูวัฒนสำราญ ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และ ดร.สมพงษ์ จันท์แก้ว ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความช่วยเหลือในการรวบรวมเชื้อพันธุ์กรรมแตงกวากลิ่นหอมใบเตย

2. ดร.สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* และการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว

3. รองศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา วงศ์พรชัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์หาสาร 2-acetyl-1-pyrroline ในแตงกวา

4. ศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับแนวทางการวิจัย

ประกิจ สมท่า

Abstract

Pandan-like fragrance is a value-added trait in several food crops such as rice, vegetable soybean and sorghum. The fragrance is caused by the volatile chemical 2-acetyl-1-pyrroline (2AP). Mutation(s) in *betaine aldehyde dehydrogenase* [*BADH*; also known as *amino aldehyde dehydrogenase* (*AMADH*)] gene causes defective *BADH* protein and results in biosynthesis of 2AP. Recently, cucumber cultivars possessing pandan-like fragrance were discovered in Thailand. In this project, we report (i) inheritance of the fragrance in cucumber accession "PK2011T202", (ii) association between *BADH* and the fragrance in PK2011T202, and (iii) genetic diversity of fragrant and non-fragrant cucumbers. 2AP analysis in fruits of PK2011T202 using head-space gas chromatography demonstrated that PK2011T202 possesses 2AP. Segregation analysis of fragrance in F_1 , F_2 , and backcross populations derived from the cross between PK2011T202 and 301176 (non-fragrant cucumber) revealed that the fragrance in PK2011T202 is controlled by a single recessive gene and there is no xenia effect for the fragrance. DNA sequence analysis of *BADH* gene in PK2011T202 and 301176 showed that PK2011T202 possesses a single base substitution (A1855G) in exon 5 which causes an amino acid change in a highly conserved motif of *BADH* protein, Y163C. Single nucleotide amplified polymorphism (SNAP) markers were developed to detect the SNP polymorphism. Gene mapping in F_2 and a backcross populations developed from the cross between PK2011T202 and 301176 showed that the major QTL for fragrance was co-localized with the *CsBADH*. Based on the results, it can be concluded that the defect function of *CsBADH* gene is responsible for fragrance in cucumber PK2011T202. Genetic diversity analysis of 7 fragrant and 89 non-fragrant cucumber using 10 SSR markers revealed that the diversity level of fragrant cucumbers is comparable to that of non-fragrant cucumbers. There was genetic difference among the fragrant cucumber. Nonetheless, the fragrant and non-fragrant cucumbers were not clearly genetically differentiated.

บทคัดย่อ

กลิ่นหอมใบเตยเป็นลักษณะที่เพิ่มมูลค่าในผลผลิตพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าว ถั่วเหลือง ผักสด และข้าวฟ่าง กลิ่นหอมใบเตยเกิดจากสารเคมีหอมระเหยที่เรียกว่า 2-acetyl-1-pyrroline หรือ 2AP ในข้าว ถั่วเหลือง ผักสด และข้าวฟ่าง พบว่า การกลายพันธุ์ในยีน *betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2)* หรืออีกชื่อหนึ่งคือ *amino aldehyde dehydrogenase 2 (AMADH2)* ที่ทำให้เอ็นไซม์ *BADH* ไม่ทำงานหรือทำงานผิดปกติ ส่งผลให้เกิดการสร้าง 2AP ขึ้น เมื่อไม่นานมานี้ มีการค้นพบแตงกวาพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่มีกลิ่นหอมใบเตย วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ คือ (1) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ “PK2011T202” (2) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *BADH* กับความหอมในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 และ (3) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาพันธุ์หอมและแตงกวาพันธุ์ไม่หอมของไทย การวิเคราะห์สาร 2AP พบว่า ผลของพันธุ์ PK2011T202 มีสาร 2AP การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะในประชากร F_1 , F_2 และ BC_1F_1 ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 กับ “301176” (พันธุ์ไม่หอม) พบว่า กลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ “PK2011T202” เป็นลักษณะด้อย และถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง และไม่มี “xenia effect” กล่าวคือ ถ้ามีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น ละอองเกสรของพันธุ์ไม่หอมไม่มีผลต่อการแสดงออกของกลิ่นหอมในพันธุ์หอม การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH* ในพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 พบว่า พันธุ์ PK2011T202 มีการกลายพันธุ์ชนิด single base substitution ใน exon 5 ตรงตำแหน่งที่ 1855 โดยมีการเปลี่ยนจากนิวคลีโอไทด์อะดีโนซีน (adenosine; A) เป็นกวีนีน (guanine; G) (A1855G) และการกลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 163 ของเอ็นไซม์ *BADH* เปลี่ยนจากไทโรซีน (Tyrosine; Y) เป็นไซโทซีน (Cytosine; C) (Y163C) จากวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมกลิ่นหอม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และเครื่องหมาย Single nucleotide amplified polymorphism (SNAP) ซึ่งใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ A1855G ในประชากร F_2 และ BC_1F_1 พบว่า ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมกลิ่นหอมตรงกับตำแหน่งของเครื่องหมาย SNAP ที่พัฒนาขึ้น ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ A1855G ในยีน *BADH* ของแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 ทำให้เกิดกลิ่นหอมใบเตยขึ้น การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม 7 พันธุ์ ร่วมกับพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม 89 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย พบว่า พันธุ์ที่มีกลิ่นหอมมีความหลากหลายทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม พันธุ์ที่มีกลิ่นหอมมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม แต่ไม่แตกต่างอย่างชัดเจนกับพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม

รหัสโครงการ : RSA5580057

ชื่อโครงการ : การสืบค้นหายีนความหอมในแตงกวา (Identification of Gene Controlling
Fragrance (2-Acetyl-1-Pyrroline) in Cucumber)

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ประกิจ สมท่า มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : pksomta@gmail.com และ agrpks@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (16 กรกฎาคม 2555 ถึงวันที่ 15 กรกฎาคม 2558)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะกลิ่นหอมในแตงกวา
2. เพื่อค้นหายีนที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมในแตงกวา
3. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบยีนความหอม (functional marker) ในแตงกวา สำหรับใช้ช่วยคัดเลือกพันธุ์
4. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม

วิธีทดลอง

การทดลองที่ 1: การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะกลิ่นหอมใบเตย

1.1 ปลูกแตงกวาพันธุ์มีกลิ่นหอมใบเตย (พันธุ์ PK2011T202) กับแตงกวาพันธุ์ไม่มีกลิ่นหอมใบเตย (301176) แล้วผสมพันธุ์เพื่อสร้างประชากร F₁ (PK2011T202 x 301176) และประชากร BC₁P₁ [PK2011T202 x (PK2011T202 x 301176)] และ BC₁P₂ [301176 x (PK2011T202 x 301176)] แล้วปลูกประชากรทั้งหมดรวมทั้งพันธุ์พ่อแม่ โดยมีจำนวนประชากร F₁, F₂, BC₁P₁ และ BC₁P₂ จำนวน 17, 128, 108 และ 86 ต้น ตามลำดับ และพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 จำนวน 10 และ 4 ต้น ตามลำดับ

1.2 ทำการประเมินความหอมในใบของประชากร F₁, F₂, BC₁P₁ และ BC₁P₂ และพันธุ์ PK2011T202 กับ 301176 ตามวิธีการของ Sood และ Siddiq (1978) โดยเก็บใบอ่อนของแต่ละต้นที่อายุ 15 วันหลังปลูก น้ำหนัก 0.8 ถึง 1 กรัมมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่เติมสารละลาย KOH ความเข้มข้น 1.7% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเปิดฝา แล้วทำการดม แล้วบันทึกว่ามีหรือไม่มีกลิ่นหอมใบเตย โดยให้คะแนน

1.3 ทำการประเมินความหอมในใบของประชากร F₁, F₂ และ BC₁P₁ และพันธุ์ PK2011T202 กับ 301176 ด้วยวิธีการดมผล โดย 15 ถึง 20 วันหลังจากติดผลผลิต ดมผลที่ติดบนต้นแต่ละต้นโดยตรง ในตอนเช้า ระหว่างเวลา 8:30 ถึง 9:30 นาฬิกา แล้วบันทึกว่ามีหรือไม่มี

มีกลิ่นหอมใบเตย นอกจากนี้ยังได้ดมกลิ่นผลที่เกิดจากการผสมพันธุ์ PK2011T202 × 301176 กับ 301176 × PK2011T202 ด้วยเพื่อตรวจสอบว่า xenia effect หรือไม่

1.4 วิเคราะห์ข้อมูลการกระจายตัวของประชากรว่ามีจำนวนต้นหอม : จำนวนต้นไม่หอม เป็น 3:1 และ 1:1 หรือไม่ ในประชากร F_2 และ BC_1P_1 ตามลำดับ โดยการทดสอบไคสแควร์ (chi-square test) (Mother 1955) ด้วยโปรแกรม R-Program 2.10.0 (R Development Core Team 2010)

1.5 ส่งผลสดของแตงกวาอายุ 10 วันหลังดอกบาน ของพันธุ์ PK2011T202 กับ 301176 ไปวิเคราะห์หาสาร 2-acetyl-1-pyrroline โดยใช้ head-space gas chromatography ตามวิธีการของ Sriseadka et al. (2001) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การทดลองที่ 2: การสืบค้นหายีนที่ควบคุมความหอมใบเตย (2-acetyl-1-pyrroline) ในแตงกวา

2.1 ปลูกแตงกวาพันธุ์มีกลิ่นหอมใบเตย (พันธุ์ PK2011T202) กับแตงกวาพันธุ์ไม่มีกลิ่นหอมใบเตย (301176) และ ประชากร F_2 (PK2011T202 × 301176) ในแปลงทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง ตุลาคม 2556 โดยมีจำนวนต้นของ PK2011T202, 301176 และ F_2 เท่ากับ 10, 10 และ 123 ตามลำดับ

2.2 ปลูกแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 พันธุ์ 301176 และประชากรผสมกลับ BC_1F_1 [(PK2011T202 × 301176) × PK2011T202] ในกระถางขนาด 12 นิ้ว กระถางละ 1 ต้น ณ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เมษายน 2557 โดยมีจำนวนต้นของ PK2011T202, 301176 และ BC_1F_1 เท่ากับ 10, 10 และ 138 ต้น ตามลำดับ

2.3 เมื่อแตงกวามีอายุ 15 วันหลังการปลูก สกัดดีเอ็นเอของประชากร F_2 ประชากร BC_1F_1 พันธุ์ PK2011T202 และพันธุ์ 301176 ตามวิธีการของ Lodhi และคณะ (1994) และเมื่อแตงกวามีอายุ 30 วันหลังการปลูก ประเมินความหอมในใบของประชากร F_2 และ BC_1P_1 และพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 ตามวิธีการของ Sood และ Siddiq (1978) โดยนำใบอ่อนของ แต่ละต้นน้ำหนัก 0.8 ถึง 1 กรัมมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตรที่เติมสารละลาย KOH ความเข้มข้น 1.7% ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเปิดฝา แล้วทำการดม โดยใช้คนดมจำนวน 5 คน แล้วให้ระดับคะแนนความหอมของแต่ละต้น ดังนี้ 1 = ไม่มีกลิ่นหอมใบเตย, 2 = มีกลิ่นหอมใบเตยน้อยจนถึงปานกลาง และ 3 = มีกลิ่นใบเตยมาก

2.4 ปลูกแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 พันธุ์ละ 5 กระถางๆ ละ 1 ต้น ในโรงเรือนทดลองของศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จ.ปทุมธานี เมื่อแตงกวามี 15, 30 และ 45 วันหลังการปลูก ทำการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) จากใบอ่อนของแตงกวาพันธุ์

PK2011T202 และ 301176 ในแต่ละกระถาง โดยใช้ using Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) แล้วเติม DNA-free™ DNaseI (Ambion) เพื่อกำจัดดีเอ็นเอ จากนั้นจึงเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ RevertAid H 156 Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) หลังจากนั้นตรวจสอบความเข้มข้น cDNA ด้วย ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., DE, USA)

2.5 สืบค้นหาลำดับเบสของยีน *betainealdehyde dehydrogenase* (*BADH*) ในแตงกวา ด้วยวิธี Blast search ในฐานข้อมูล whole genome sequence ของแตงกวาพันธุ์ “Gy14” และ “9930” ที่ Phytozome v9.1 (<http://www.phytozome.net/cucumber>) และ Cucumber Genome Database (<http://cucumber.genomics.org.cn>) โดยใช้ลำดับเบสของยีน *BADH* จากเมล่อน (melon; *Cucumis melo* L.) (หมายเลข Genbank คือ JN091961) จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ด้วยโปรแกรม Primer3 (Rozen and Skaletsky 2001) สำหรับใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *BADH* ใน cDNA ของแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 (ตารางที่ 1) ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *BADH* ของแตงกวา ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล Phytozome v9.1 และ Cucumber Genome Database นอกจากนี้ยังออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ACTIN* ด้วย (หมายเลข Genbank คือ AB698859) โดยทำ Real-time PCR ตามวิธีการของ Yundaeng et al. (2013) และคำนวณการแสดงออกของยีน *BADH* โดยใช้วิธีของ Livak และ Schmittgen (2001)

นอกจากนี้ยังพัฒนาเครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) ที่มีตำแหน่งอยู่ในยีน *BADH* และอยู่รอบๆ ตำแหน่งของยีน *BADH* ในแตงกวา (ตารางที่ 2) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูล Phytozome v9.1 (<http://www.phytozome.net/cucumber>) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับพัฒนาเครื่องหมาย SSR ใช้โปรแกรม Primer3 (Rozen and Skaletsky 2001)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับใช้วิเคราะห์ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CsBADH* และ *ACTIN* ในแตงกวา (annealing temperature ของทุกไพรเมอร์ เท่ากับ 58 องศาเซลเซียส)

ชื่อไพรเมอร์	ยีนที่ตรวจสอบ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ขนาดของ PCR product (คู่เบส)
Cs_BADH	<i>BADH</i>	F: GGCTGTTCTGTCCTAAGTATT R: AGTAATCGAAGCACCCAGCA	149
Cs_ACTIN	<i>ACTIN</i>	F: AGGCCGTTCTGTCCCTCTAC R: CAGTAAGGTCACGACCAGCA	150

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของจีโนม (โครโมโซม) ที่มียีน *CsBADH* ของแตงกวาเพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (annealing temperature ของทุกไพรเมอร์ เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ขนาดของ PCR product (คู่เบส)	ตำแหน่งบน scaffold01357
ch1_BADH_1	F: GATGGTTGCGTACAACAC	610	1161306-1161323
	R: TTGAGGAGGTTGGGTTGG		1161932-1161915
ch1_BADH_2	F: GGTAATGGATCCTCCCTCAA	838	1161855-1161874
	R: CTCGTGGGTGCATCTAACTAC		1162712-1162692
ch1_BADH_3	F: AGTTGTCACTCCCACGTG	809	1162480-1162497
	R: AGGGCCACGTTAAGATAGAG		1163255-1163236
ch1_BADH_4	F: CAACCATAGCATGCTTGC	964	1163027-1163044
	R: CCTACCCGTCACAAATCGTTG		1164010-1163990
ch1_BADH_5	F: CCCACTTGTTTCAAACCTGGAG	1066	1163695-1163715
	R: GGAAGATGGATGGCACCATA		1164779-1164760
ch1_BADH_6	F: GGCTGTTCTGTGCCAAGTAT	881	1164554-1164572
	R: GCAGTAAGAGGGCAACAAGTACC		1165435-1165434
ch1_BADH_7	F: CGATGTTGCTGGGTGCTTC	987	1165288-1165306
	R: GCCGTATCCTGTCAGAACAT		1166293-1166274
ch1_BADH_8	F: GCCATCAGAACTTGCATCTG	905	1166113-1166132
	R: TCGTCTGCTCCATTGAACC		1167035-1167017
ch1_BADH_9	F: TCCCGTCTACTTGTACACGT	908	1166873-1166892
	R: GCTGGTTCAACGAAGTATCC		1167799-1167780
ch1_BADH_10	F: GTCTCAACTGCTGAGCAAGA	888	1167623-1167642
	R: GCTGCTTCGTGGAATAGAATC		1168528-1168510
ch1_BADH_11	F: GCTTTGGTCGAGAGCTAGG	748	1168227-1168245
	R: AGGCTACCAACAACCTCACTC		1168993-1168974

2.6 ออกแบบไพรเมอร์ (primer) สำหรับใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของจีโนม (โครโมโซม) ที่มียีน *BADH* และหาลำดับเบสของยีน *BADH* ในแตงกวา โดยใช้ข้อมูลของยีน *BADH* ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล Phytozome v9.1 และ Cucumber Genome Database (ตารางที่ 3) จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *BADH* ในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 กับพันธุ์ 301176 โดยเตรียมปฏิกิริยา PCR ขนาด of 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1× Taq buffer, MgCl₂ 2 mM, 0.2 mM dNTPs, 0.1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) และ forward primer และ reward primer อย่างละ 0.5 mM แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp PCR9700 System (Applied Biosystems) โดย

ตั้งโปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลอากาโรส 1.5% แล้วทำความสะอาดผลผลิต PCR ด้วย E-gel® CloneWell™ Agarose Gels (Invitrogen) หลังจากนั้นจึงส่งผลผลิต PCR ที่ได้ไปยังบริษัท Macrogen Co. Ltd ประเทศเกาหลีใต้เพื่อหาลำดับเบส โดยใช้เครื่องวิเคราะห์พันธุกรรม ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)

หลังจากได้ลำดับเบสของยีน *BADH* ในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 กับพันธุ์ 301176 แล้ว นำลำดับเบสของทั้งสองพันธุ์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแตงกวาพันธุ์ Gy14 ในฐานข้อมูล Phytozome v9.1 และพันธุ์ 9930 ในฐานข้อมูล Cucumber Genome Database โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) เพื่อค้นหาตำแหน่งและชนิดของการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังนำข้อมูลลำดับเบสของยีน *BADH* ในส่วนที่เป็น coding sequence ของพันธุ์ PK2011T202 กับพันธุ์ 301176 ที่ได้จากการเปรียบเทียบ ไปทำการทำนายลำดับของกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ *BADH* แล้วนำข้อมูลลำดับของกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ *BADH* ในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 กับพันธุ์ 301176 แล้ว ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ *BADH* ของแตงกวาพันธุ์ Gy14 และพันธุ์ 9930 เพื่อค้นหากรดอะมิโนที่เป็นสาเหตุของการกลายพันธุ์และอาจทำให้เกิดความหอมในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202

Table 3 เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่ออกแบบสำหรับใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอในและรอบๆ ยีน *CsBADH* ของแตงกวา (annealing temperature ของทุกไพรเมอร์ เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	ชนิดซ้ำของ SSR	ขนาดของ PCR product (คู่เบส)
Cucsa.197230-SSR2	F: AGGGATTCTTTCTCCCATTTG R: TGCAGCTTCTTCCAGAGGTT	(GTT) ₄	185
Cs-SSR1	F: CTTGGTTTCTTGTTCCCTTAGTTT R: AGGCTGTTGAATTGGGTAATGT	(AT) ₈	194
Cs-SSR2	F: ACACGCAATCCCAAAAAGAA R: AAATTAGGAGATTTAGGGATTTCGAT	(AAT) ₆ (AT) ₇	235
CS-SSR3	F: GTGTGCGGCAGTTTGTAAAG R: ATCCCAGCGCAGATAAAGAA	(CT) ₉	189
CS-SSR4	F: TGAAACCCCCAAAACAAAAA R: CAACGAAGAAGAGGGTGGAG	(GA) ₁₂	194
Cs-SSR5	F: GGATGATGACTTCTTAACCTTACCC R: GGATCGAACGATATTCATCCA	(AT) ₁₄	189

CS-SSR6	F: TTGAGGTACCAACCACACTCA R: TGAAGGCAAAATGGATTTGTT	(AT) ₉	187
Cs-SSR7	F: TGAAGAAGGGTGTGAGGGAAT R: GAAGAAGAAGATGCCGGTGA	(AT) ₁₂	183
CS-SSR9	F: CCATCACAGTATAAGGAGTAAACAAAC R: TGCAGACACGCCTCAAGATA	(AT) ₉	169
CS-SSR10	F: TGACGGGGACGGATTAGTAG R: CGCATCGACTCAGAAGAACA	(CGG) ₆ (AAG) ₅	169
CS-SSR13	F: ATGATTGCACCCACTTTGTG R: TGAAATGTATGTCACATGGGTTG	(TA) ₈	102

Table 4 ไพรมเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNAP ที่ออกแบบสำหรับใช้ตรวจสอบ single nucleotide polymorphism ชนิด A/G ใน exon 5 ของยีน *CsBADH* ในแตงกวา (annealing temperature ของทุกไพรมเมอร์ เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส)

Primer name	Primer sequence	PCR product size (bp)
CsBADH2-A1	F: GCTGATGTCTATCTTTTATTGAAGGAACAA R: CACAATAAATAAAGTTCATAAAATCCATAATCAC	155
CsBADH2-A2	F: TGCTGATGTCTATCTTTTATTGAAGGAAATA R: CACAATAAATAAAGTTCATAAAATCCATAATCAC	156
CsBADH2-A3	F: TGCTGATGTCTATCTTTTATTGAAGGAATTA R: CACAATAAATAAAGTTCATAAAATCCATAATCAC	156
CsBADH2-G1	F: TGATGTCTATCTTTTATTGAAGGAACCG R: CACAATAAATAAAGTTCATAAAATCCATAATCAC	153
CsBADH2-G2	F: GCTGATGTCTATCTTTTATTGAAGGAACAG R: CACAATAAATAAAGTTCATAAAATCCATAATCAC	155
CsBADH2-G3	F: GCTGATGTCTATCTTTTATTGAAGGAATTG R: CACAATAAATAAAGTTCATAAAATCCATAATCAC	155

เมื่อพบตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่เฉพาะกับแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 แล้ว ทำการออกแบบไพรมเมอร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอ single nucleotide amplified polymorphism (SNAP; Drenkard et al. 2000) ที่จำเพาะกับการกลายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม WebSNAPPER (Drenkard et al. 2000; <http://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/snap3/websnaper3.cgi>) (ตารางที่ 4)

2.7 นำเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่พัฒนาขึ้นในข้อ 2.2.5 จำนวน 11 เครื่องหมาย และที่รายงานไว้โดย Ren et al. (2009) จำนวน 43 เครื่องหมาย ซึ่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกับยีน

BADH (โครโมโซมที่ 1) ของแตงกวา และเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNAP ที่พัฒนาขึ้นในข้อ 2.2.6 ไปวิเคราะห์ในพันธุ์ PK2011T202 และพันธุ์ 301176 เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทั้งสอง

วิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR โดยการเตรียมปฏิกิริยา PCR ขนาด of 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1× *Taq* buffer, $MgCl_2$ 2 mM, 0.2 mM dNTPs, 0.1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) และ forward primer และ reward primer อย่างละ 0.5 mM แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp PCR9700 System (Applied Biosystems) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 25 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ polyacrylamide gel 5% แล้วย้อมด้วยสารละลาย silver staining เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

วิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNAP โดยการเตรียมปฏิกิริยา PCR ขนาด of 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม, 1× *Taq* buffer, $MgCl_2$ 2 mM, 0.2 mM dNTPs, 0.1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) และ forward primer และ reward primer อย่างละ 0.5 mM แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp PCR9700 System (Applied Biosystems) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 28 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อากาโรสเจล 1% แล้วย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

หลังจากนั้นนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ PK2011T202 กับพันธุ์ 301176 ไปวิเคราะห์ในประชากร F_2 และ BC_1F_1

2.2.8 นำข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และ SNAP ที่ตรวจสอบในประชากร F_2 และ BC_1F_1 มาสร้างแผนที่พันธุกรรม ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ JoinMap 4.0 (Van Ooijen, 2006) โดยกำหนดค่า LOD (a minimum logarithm of the odds) เท่ากับหรือมากกว่า 3.0 และ ค่า r (a maximum recombination frequency) เท่ากับ 0.25 สำหรับจับกลุ่มลิงค์เกจ และคำนวณหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโดยใช้ Kosambi's mapping function (Kosambi, 1944)

วิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับความหอมในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ด้วยวิธี single marker regression analysis (Keasey and Pooni 1997) โดยใช้โปรแกรม R-Program 2.10.0 (R Development Core Team 2010)

วิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความหอมในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ด้วยวิธี composite interval mapping (Zeng 1994) โดยใช้โปรแกรม WinQTL Cartographer 2.5

(Wang et al. 2012) โดยกำหนดค่า LOD threshold โดยการทำ Permutation test จำนวน 10,000 รอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

การทดลองที่ 3: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม

3.1 ปลุกแตงกวาพันธุ์พื้นเมืองของไทยจำนวน 96 พันธุ์ (หอม 7 พันธุ์ และไม่หอม 89 พันธุ์) (ตารางที่ 5) ในแปลงทดลอง โดยพันธุ์หอมนั้นรวบรวมมาจากเกษตรกร และพันธุ์ไม่หอม นั้นรวบรวม (ขอ) มาจากศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน

ตารางที่ 5 เชื้อพันธุกรรมแตงกวา 96 พันธุ์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เลขที่ของตัวอย่าง	ชื่อพันธุ์	ประเทศที่มา	ลักษณะพันธุ์
1	1176	ฮ่องกง	ไม่หอม
2	PK2011T202	ไทย	หอม
3	PK2011T201-1	ไทย	หอม
4	PK2014T009	ไทย	หอม
5	PK2014T011	ไทย	ไม่หอม
6	PK2011T201-2	ไทย	หอม
7	PK2014T006-1	ไทย	หอม
8	PK2014T006-2	ไทย	หอม
9	CS006	ไทย	ไม่หอม
10	CS009	ไทย	ไม่หอม
11	CS010	ไทย	ไม่หอม
12	CS011	ไทย	ไม่หอม
13	CS012	ไทย	ไม่หอม
14	CS013	ไทย	ไม่หอม
15	CS014	ไทย	ไม่หอม
16	CS015	ไทย	ไม่หอม
17	CS016	ไทย	ไม่หอม
18	CS018	ไทย	ไม่หอม
19	CS019	ไทย	ไม่หอม
20	CS020	ไทย	ไม่หอม
21	CS020A	ไทย	ไม่หอม
22	CS021	ไทย	ไม่หอม
23	CS023	ไทย	ไม่หอม

24	CS024	ไทย	ไม่หอม
25	CS025	ไทย	ไม่หอม
26	CS026	ไทย	ไม่หอม
27	CS028	ไทย	ไม่หอม
28	CS030	ไทย	ไม่หอม
29	CS031	ไทย	ไม่หอม
30	CS032	ไทย	ไม่หอม
31	CS034A	ไทย	ไม่หอม
32	CS035	ไทย	ไม่หอม
33	CS036	ไทย	ไม่หอม
34	CS037	ไทย	ไม่หอม
35	CS038	ไทย	ไม่หอม
36	CS039	ไทย	ไม่หอม
37	CS040	ไทย	ไม่หอม
38	CS041	ไทย	ไม่หอม
39	CS041A	ไทย	ไม่หอม
40	CS043	ไทย	ไม่หอม
41	CS044	ไทย	ไม่หอม
42	CS045	ไทย	ไม่หอม
43	CS046	ไทย	ไม่หอม
44	CS048	ไทย	ไม่หอม
45	CS049	ไทย	ไม่หอม
46	CS051	ไทย	ไม่หอม
47	CS052	ไทย	ไม่หอม
48	CS054	ไทย	ไม่หอม
49	CS055	ไทย	ไม่หอม
50	CS057	ไทย	ไม่หอม
51	CS058	ไต้หวัน	ไม่หอม
52	CS059	ไต้หวัน	ไม่หอม
53	CS060	ไต้หวัน	ไม่หอม
54	CS062	ไต้หวัน	ไม่หอม
55	CS063	ไต้หวัน	ไม่หอม
56	CS064	ไต้หวัน	ไม่หอม
57	CS065	ไต้หวัน	ไม่หอม
58	CS066	ไต้หวัน	ไม่หอม

59	CS067	ไทย	ไม่หอม
60	CS068	ไต้หวัน	ไม่หอม
61	CS069	ไต้หวัน	ไม่หอม
62	CS070	ไต้หวัน	ไม่หอม
63	CS071	ไทย	ไม่หอม
64	CS072	ภูฐาน	ไม่หอม
65	CS073	เวียดนาม	ไม่หอม
66	CS074	เวียดนาม	ไม่หอม
67	CS076	จีน	ไม่หอม
68	CS077	จีน	ไม่หอม
69	CS078	ไทย	ไม่หอม
70	CS079	ไทย	ไม่หอม
71	CS080	ไทย	ไม่หอม
72	CS081	ไทย	ไม่หอม
73	CS082	ไทย	ไม่หอม
74	CS083	ไทย	ไม่หอม
75	CS084	ไทย	ไม่หอม
76	CS086	ไทย	ไม่หอม
77	CS087	ไทย	ไม่หอม
78	CS088	ไทย	ไม่หอม
79	CS089	ไทย	ไม่หอม
80	CS090	ไทย	ไม่หอม
81	CS091	เวียดนาม	ไม่หอม
82	CS092	เวียดนาม	ไม่หอม
83	CS093	ลาว	ไม่หอม
84	CS096	ไทย	ไม่หอม
85	CS097	ไทย	ไม่หอม
86	CS098	ไทย	ไม่หอม
87	CS099	ไทย	ไม่หอม
88	CS100	ลาว	ไม่หอม
89	CS102	ลาว	ไม่หอม
90	CS103	ไทย	หอม
91	CS104	ไทย	ไม่หอม
92	CS03-23	ไม่ทราบที่มา	ไม่หอม
93	ML064	ไม่ทราบที่มา	ไม่หอม

94	PK2014T044	ไทย	ไม่หอม
95	CU2015	ไทย	ไม่หอม
96	CS068A	ไต้หวัน	ไม่หอม

3.2 หลังการปลูก 30 วัน เก็บตัวอย่างใบอ่อนจากแตงกวาแต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Lodhi et al. (1994) ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเป็น 10 ng ต่อ ไมโครลิตร โดยการเปรียบเทียบกับ lamda ดีเอ็นเอ

3.3 สุ่มเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ simple sequence repeat (SSR) ของแตงกวาที่พัฒนาโดย Ren et al. (2009) และที่พัฒนาขึ้นในการทดลองที่ 2 จำนวนรวม 10 เครื่องหมายจาก 7 โครโมโซม (ตารางที่ 6) ไปวิเคราะห์ในตัวอย่างพันธุ์แตงกวาทั้ง 96 พันธุ์ ตามวิธีการของ Ren et al. (2009) บันทึกขนาดของอัลลีลที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR โดยการเปรียบเทียบกับ phi-X174 standard size (Fermentas, Lithuania)

ตารางที่ 6 คุณลักษณะของเครื่องหมาย SSR 10 เครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาพันธุ์หอมใบเตย และพันธุ์ไม่หอม ทั้ง 96 พันธุ์

เครื่องหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ชนิดซ้ำ	โครโมโซม
Cs-SSR1	F: CTTGTTTCTTGTTCCCTTAGTTT R:AGGCTGTTGAATTGGGTAATGT	(AT) ₈	1
Cs-SSR2	F: ACACGCAATCCCAAAAAGAA R: AAATTAGGAGATTTAGGGATTTCGAT	(AAT) ₆ (AT) ₇	1
CS-SSR3	F: GTGTGCGGCAGTTTGTAAG R: ATCCCAGCGCAGATAAAGAA	(CT) ₉	1
Cs-SSR5	F: GGATGATGACTTCTTAACCTTACCC R: GGATCGAACGATATTCATCCA	(AT) ₁₄	1
SSR16130	TGCCACAGGGATTCTTCTA TGAAACCCATTTGAGATCTCTTC	(AG) ₂₁	2
SSR15043	TGCACAAAGCATGGTGAGTT TACAGGCTTTTCACAAGGCA	(AC) ₂₃	3
SSR17406	GAGCCATCCATCAGAGAGAGA ACCCACAAGCTTCAGAGGTC	(AG) ₂₁	4
SSR02895	GAGTTGGCAAGTCACGTTGT TTTCCCTCATTATGCCATCC	(AT) ₁₉	5
SSR15802	CAACAAAGCCCTAACAAAAGC TGCATCTGGTCTCCTTCTTCT	(AG) ₁₃ (AAAG) ₈	6
SSR22593	CGTTGCATGGATAAAGAAACC ATTATGTTCCAGCTCCACGG	(AAGA) ₁₅	7

3.4 นำข้อมูลอัลลีลในข้อ 2.3.3 มาคำนวณจำนวนอัลลีล, observed heterozygosity (H_o), gene diversity (heterozygosity; H_E), Wright's fixation index (F_{IS}) และ allelic richness ต่อเครื่องหมาย ด้วยโปรแกรม FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2002) และนำค่า F_{IS} มาคำนวณอัตราการผสมข้าม (t) โดยใช้สมการ $t = (1 - F_{IS}) / (1 + F_{IS})$ (Weir 1996) คำนวณค่า Polymorphism information content (PIC), ตามสูตร $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$, ซึ่ง P_{ij}^2 คือความถี่ของอัลลีล j ของตำแหน่งยีนที่ i (Anderson et al. 1993)

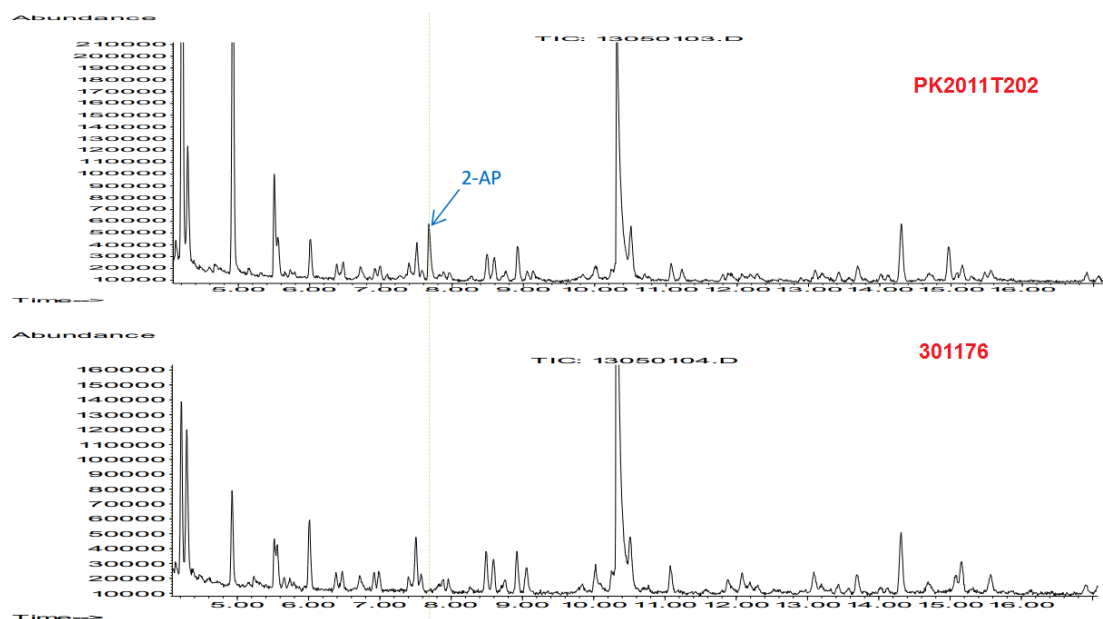
3.5 คำนวณค่า shared allele distance (D_{SA}) (Chakraborty and Jin 1993) โดยใช้โปรแกรม POPULATIONS 1.2.28 (Langella et al. 2001) แล้วนำ D_{SA} ที่ได้ไปวิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCoA) และ neighbour-joining analysis ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.2 (Rohlf 2005) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแตงกวาพันธุ์หอมและไม่หอม

3.6 วิเคราะห์โครงสร้างของประชากรด้วย Bayesian algorithm โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard et al. 2000, 2007) โดยทำ simulation run ที่กำหนดค่าประชากรย่อย (K) ระหว่าง 1-10 ค่า burn-in เท่ากับ 10,000 และค่า Markov Chain Monte Carlo เท่ากับ 50,000 จากนั้นวิเคราะห์หาค่า K ที่เหมาะสมตามวิธีของ Evanno et al. (2005) แล้วจัดกลุ่มประชากรย่อยตามค่า K ที่วิเคราะห์ได้ โดยใช้ค่า burn-in และค่า Markov Chain Monte Carlo เท่ากับ 100,000 และ 500,000 ตามลำดับ

ผลการทดลอง

1. การถ่ายทอดลักษณะกลิ่นหอมใบเตย

แตงกวาพันธุ์ PK2011T202 นั้นมีกลิ่นหอมใบเตย ส่วนพันธุ์ 301176 นั้นไม่มีกลิ่นหอมใบเตย และจากการส่งตัวอย่างเมล็ดและผลสดของแตงกวาทั้งสองพันธุ์ไปตรวจวิเคราะห์ค้นหาสาร 2-acetyl-1pyrroline (2AP) ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นหอมใบเตยที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่า เมล็ดของแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 นั้นไม่มีสาร 2AP ส่วนในผลสดนั้น ผลของพันธุ์ PK2011T202 มีสาร 2AP ส่วนผลของพันธุ์ 301176 นั้นไม่พบสาร 2AP (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณเมล็ดที่ใช้ทดสอบนั้นน้อยเกินไปจึงทำให้ไม่พบสาร 2AP ส่วนการวิเคราะห์โดยใช้ผลสดนั้นต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่าการตรวจสอบโดยใช้เมล็ด ดังนั้นจึงจะต้องมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ในผลสดที่เหมาะสมต่อไป



ภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์หาสาร 2-acetyl-1pyrroline (2AP) ในผลสดของแตงกวาพันธุ์หอม PK2011T202 (บน) และแตงกวาพันธุ์ไม่หอม 301176 (ล่าง) ด้วยวิธี head-space gas chromatography

ผลการทดสอบกลิ่นหอมในประชากรแตงกวา F_1 , F_2 , BC_1P_1 และ BC_1P_2 จากการผสมระหว่างพันธุ์หอม PK2011T202 และแตงกวาพันธุ์ไม่หอม 301176 นั้นแสดงไว้ในตารางที่ 1 การทดสอบกลิ่นหอมในใบ พบว่า F_1 ทุกต้นไม่มีการกระจายตัว และไม่มีกลิ่นหอม เหมือนกับกับพันธุ์ 301176 ในประชากร F_2 มีการกระจายตัวของลักษณะกลิ่นหอม โดยมีจำนวนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 90 ต้น และมีจำนวนต้นที่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 38 ต้น การทดสอบโคสแคว์ พบว่า อัตราส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมต่อต้นที่มีกลิ่นหอมเป็นแบบ 3:1 (ตารางที่ 7) ในประชากร

BC₁P₁ มีการกระจายตัวของลักษณะกลิ่นหอม โดยมีจำนวนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 56 ต้น และมีจำนวนต้นที่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 52 ต้น การทดสอบไคสแควร์ พบว่า อัตราส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมต่อต้นที่มีกลิ่นหอมในประชากรนี้เป็นแบบ 1:1 (ตารางที่ 7) ส่วนประชากร BC₁P₂ ไม่มีการกระจายตัว โดยทุกต้นไม่มีกลิ่นหอมเช่นเดียวกับพันธุ์ 301176 และต้น F₁ (ตารางที่ 7) ผลการทดสอบดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 เป็นลักษณะด้อย (recessive trait) และถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 ตำแหน่ง (single gene)

ตารางที่ 7 การกระจายตัวของลักษณะกลิ่นหอมและการทดสอบไคสแควร์ของประชากรแตงกวา F₁, F₂, BC₁P₁ และ BC₁P₂ ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง PK2011T202 กับ 301176

ส่วนของพืช ที่ทดสอบ	พันธุ์/ประชากร	จำนวนต้นที่ ทดสอบ	ต้นที่มีกลิ่นหอม : ต้นที่ไม่มีกลิ่นหอม	ค่า χ^2 (ค่า probability) ^a
ใบ	PK2011T202	10	10:0	ไม่ได้วิเคราะห์
	301176	4	0:4	ไม่ได้วิเคราะห์
	F ₁ (PK2011T202 x 301176)	17	0:17	ไม่ได้วิเคราะห์
	F ₂ (PK2011T202 x 301176)	128	38:90	1.500 (0.221)
	BC ₁ P ₁ [PK2011T202 x (PK2011T202 x 301176)]	108	52:56	0.148 (0.700)
	BC ₁ P ₂ [PK2011T202 x (PK2011T202 x 301176)]	86	0:86	ไม่ได้วิเคราะห์
ผล	PK2011T202	10	10:0	ไม่ได้วิเคราะห์
	301176	4	0:4	ไม่ได้วิเคราะห์
	F ₁ (PK2011T202 x 301176)	17	0:17	ไม่ได้วิเคราะห์
	F ₂ (PK2011T202 x 301176)	107	31:76	0.900 (0.343)
	BC ₁ P ₁ [PK2011T202 x (PK2011T202 x 301176)]	91	43:48	0.275 (0.600)

^aไคสแควร์สำหรับทดสอบอัตราการกระจายตัวแบบ 3:1 และ 1:1 ในประชากร F₂ และ BC₁P₁, ตามลำดับ

การทดสอบกลิ่นหอมโดยใช้ผลสดในพันธุ์ PK2011T202 และพันธุ์ 301176 และในประชากรแตงกวา F₁, F₂ และ BC₁P₁ นั้นให้ผลการทดลอง (ตารางที่ 1) ที่สอดคล้องกับการทดสอบกลิ่นหอมโดยใช้ใบ โดยพบว่า F₁ ทุกต้นไม่มีการกระจายตัว และไม่มีกลิ่นหอม ในประชากร F₂ มีการกระจายตัวของลักษณะกลิ่นหอม โดยมีจำนวนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 76 ต้น และมีจำนวนต้นที่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 31 ต้น การทดสอบไคสแควร์ พบว่า อัตราส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมต่อต้นที่มีกลิ่นหอมเป็นแบบ 3:1 (ตารางที่ 7) ในประชากร BC₁P₁ มีการกระจายตัวของลักษณะกลิ่นหอม โดยมีจำนวนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 48 ต้น และมีจำนวนต้นที่มีกลิ่น

หอมเท่ากับ 43 ต้น การทดสอบไคสแควร์ พบว่า อัตราส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมต่อต้นที่มีกลิ่นหอมในประชากรนี้เป็นแบบ 1:1 (ตารางที่ 7) ส่วนประชากร BC₁P₂ ไม่มีการกระจายตัว โดยทุกต้นไม่มีกลิ่นหอม ผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่ากลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 เป็นลักษณะด้อย และถูกควบคุมด้วยยีนตำแหน่งเดียว

2. การสืบค้นหายีนที่ควบคุมความหอมใบเตยในแตงกวา

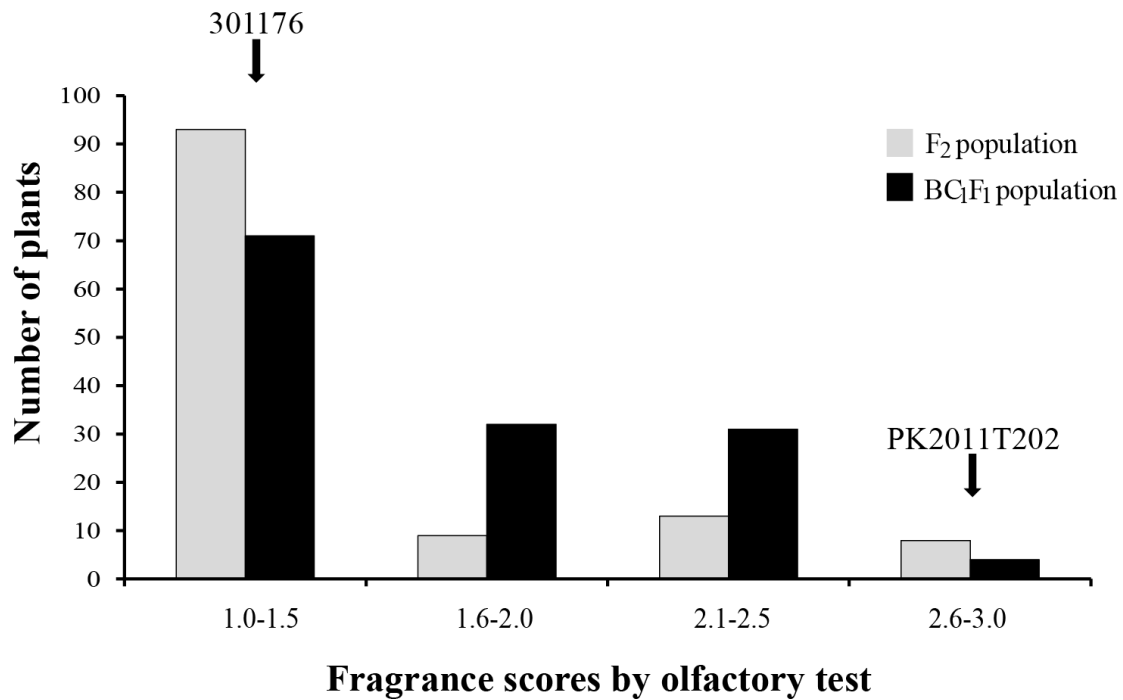
การทดสอบกลิ่นหอมด้วยวิธีการดมกลิ่นของแบบแล้วให้ระดับคะแนน 3 ระดับ คือ 1 = ไม่มีกลิ่นหอมใบเตย, 2 = มีกลิ่นหอมใบเตยน้อยจนถึงปานกลาง และ 3 = มีกลิ่นใบเตยมาก

ในประชากร F₂ พบว่า ประชากรมีคะแนนกลิ่นหอมระหว่าง 1.0 ถึง 2.8 และค่าเฉลี่ยคะแนนเท่ากับ 1.45 การกระจายตัวของคะแนนกลิ่นหอมในประชากรมีลักษณะเป็นแบบต่อเนื่องและเบ้ไปทางพันธุ์ไม่หอม (301176) (ภาพที่ 2) เมื่อทำการแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีกลิ่นหอม ซึ่งมีระดับคะแนนระหว่าง 1.6 ถึง 3.0 กลุ่มที่ไม่มีกลิ่นหอม ซึ่งมีระดับคะแนนระหว่าง 0 ถึง 1.5 พบว่า ประชากร F₂ มีจำนวนต้นที่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 30 ต้น และต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 93 ต้น การทดสอบไคสแควร์ พบว่า อัตราส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมต่อต้นที่มีกลิ่นหอมเป็นแบบ 3:1 (ค่าไคสแควร์เท่ากับ 0.0244 และ ค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.8759)

ในประชากร BC₁F₁ พบว่า ประชากรมีคะแนนกลิ่นหอมระหว่าง 1.0 ถึง 3.0 และค่าเฉลี่ยคะแนนเท่ากับ 1.64 การกระจายตัวของคะแนนกลิ่นหอมในประชากร BC₁F₁ มีลักษณะเป็นแบบต่อเนื่อง และเบ้ไปทางพันธุ์ไม่หอมเช่นเดียวกันกับประชากร F₂ (ภาพที่ 2) เมื่อทำการแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม พบว่า ประชากร F₂ มีจำนวนต้นที่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 71 ต้น และต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่ากับ 67 ต้น การทดสอบไคสแควร์ พบว่า อัตราส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมต่อต้นที่มีกลิ่นหอมเป็นแบบ 1:1 (ค่าไคสแควร์เท่ากับ 0.1159 และ ค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.7335)

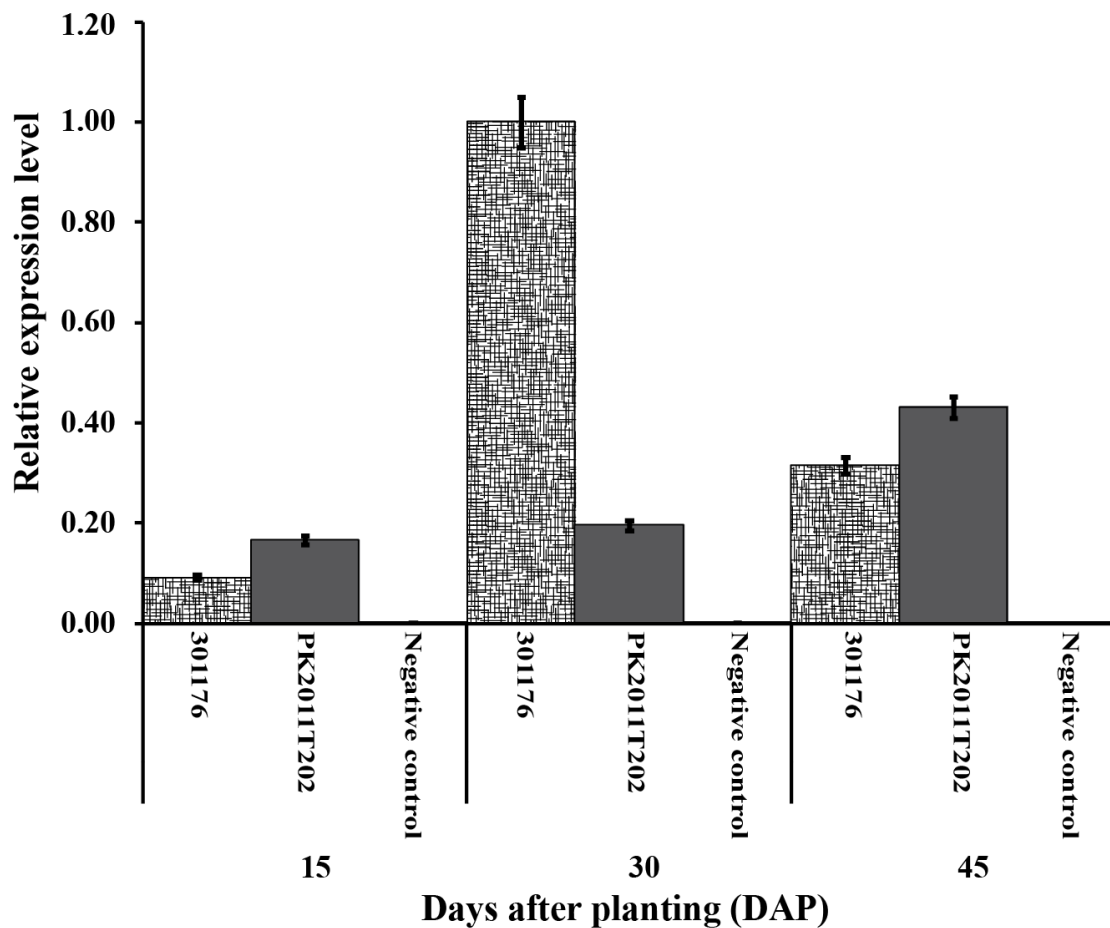
ผลการทดสอบกลิ่นหอมโดยการดมใบ แล้วให้ระดับคะแนน ในประชากร F₂ และ BC₁F₁ ให้ผลเหมือนกับการทดสอบกลิ่นหอมโดยการดมใบและผล แล้วตัดสินใจว่ามีกลิ่นหอมหรือไม่มีกลิ่นหอม คือ กลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 เป็นลักษณะด้อย และถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 ตำแหน่ง

การทำ Blast search เพื่อหาตำแหน่งของยีน *BADH* ของแตงกวาในฐานข้อมูลลำดับเบสอ้างอิง (reference genome sequence) 2 ฐานข้อมูล คือ Phytozome v9.1 และ Cucumber Genome Database โดยใช้ยีน *BADH* ของเมล่อน (*CmBADH*) เป็นต้นแบบในการค้นหา พบว่า ตำแหน่งที่เป็นยีน *BADH* ในแตงกวา คือ *Cucsa.197230* (scaffold01357:699724..704791) ในฐานข้อมูล Phytozome v9.1 และ *Csa005363* (chromosome01:1164184..1168771) ในฐานข้อมูล Cucumber Genome Database ซึ่งทั้งสองตำแหน่งน่าจะเป็นยีนเดียวกัน โดยเมื่อพิจารณาลำดับเบสของ *Cucsa.197230* พบว่า ยีน *BADH* นี้มีความยาวทั้งสิ้น 5,068 นิวคลีโอไทด์ โดยมีขนาดของ transcript เท่ากับ 2,003 นิวคลีโอไทด์ ขนาดของ coding sequence (CDS) เท่ากับ 1,512 นิวคลีโอไทด์ จาก exon จำนวนทั้งสิ้น 15 ชิ้น และโปรตีน *BADH* มีประกอบด้วยกรดอะมิโน 503 ตัว



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของคะแนนความหอมที่ทดสอบด้วยวิธีการดม (sensory test) ใบในประชากรแตงกวา F₂ ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง PK2011T202 (พันธุ์หอม) กับ 301176 (พันธุ์ไม่หอม)

การศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* ในใบของแตงกวาที่อายุ 15, 30 และ 45 วัน หลังการปลูก ของพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 ด้วยวิธี real-time PCR พบว่า PK2011T202 มีการแสดงออกสูงที่สุดที่ 45, 30 และ 15 วันตามลำดับ ส่วน 301176 มีการแสดงออกสูงที่สุดที่ 30, 45 และ 15 วันตามลำดับ (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์โคสแควร์เพื่อทดสอบความเหมือน (homogeneity test) พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *BADH* ในทุกระยะไม่มีความแตกต่างกัน ในทั้งสองพันธุ์ (ค่าโคสแควร์เท่ากับ 0.43 และ ค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.81) และการวิเคราะห์ *t*-test เพื่อทดสอบระดับการแสดงออกของยีน *BADH* ระหว่างพันธุ์ PK2011T202 กับ 301176 พบว่า แตงกวาทั้งสองพันธุ์มีการแสดงออกในระดับเดียวกัน ในแต่ละระยะที่ทดสอบ (ค่า *t* = 0.5384 และ ค่า *P* = 0.6189; ค่า *t* = -3.1884 และ ค่า *P* = 0.03327; และ ค่า *t* = 0.4819 และ ค่า *P* value = 0.6550, ตามลำดับ).



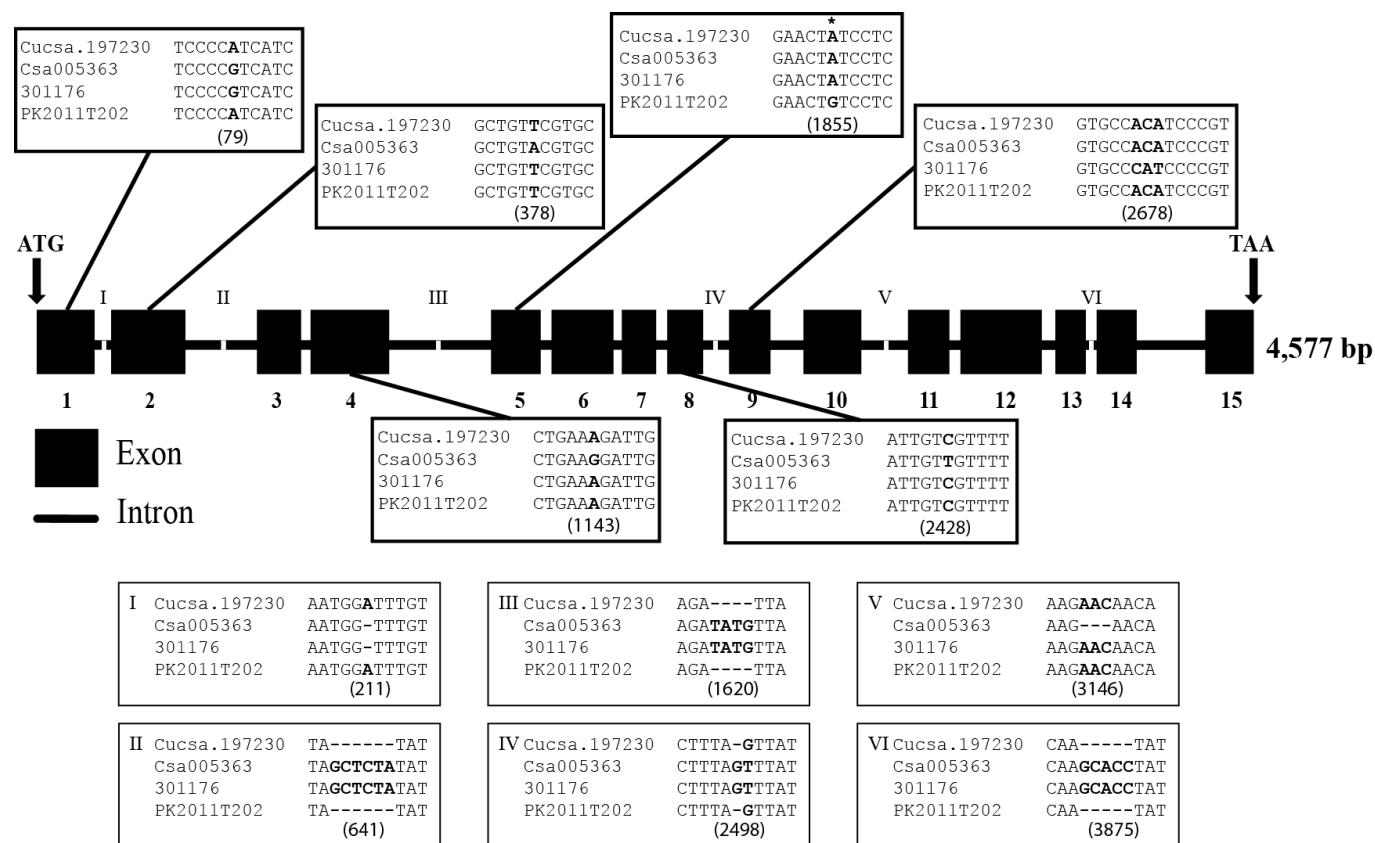
ภาพที่ 2. การแสดงออกของยีน *BADH* ในใบอ่อนที่ทางเต็มทีของแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 (พันธุ์หอม) กับ 301176 (พันธุ์ไม่หอม) ที่อายุ 15, 30 และ 45 วันหลังการปลูก (days after planting)

การค้นหาลำดับเบสของยีน *BADH* ของพันธุ์ PK2011T202 และ 301176 พบว่า ยีน *BADH* ในพันธุ์ทั้งสองมีความยาว 4,577 และ 4,594 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวของทั้งสองพันธุ์ไปเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH* พันธุ์ 9930 และ Gy14 ในฐานข้อมูลอ้างอิง (reference genome sequence) Phytozome v9.1 และ Cucumber Genome Database ตามลำดับ พบว่า มีการกลายพันธุ์ (mutation) ทั้งสิ้น 14 ตำแหน่ง โดย 6 ตำแหน่งเป็นแบบ single-base substitution (ภาพที่ 4) และ 8 ตำแหน่งเป็นแบบ indel (insertion/deletion) โดย single-base substitution ทั้งหมดอยู่ใน exon (exon 1, 2, 4, 5, 8 และ 9) และ indel ทั้งหมดอยู่ใน intron ซึ่ง single-base substitution ใน exon ที่ 1, 4, 5 และ 8 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม มีเพียงการกลายพันธุ์ใน exon ที่ 5 เท่านั้น ที่จำเพาะต่อแตงกวาพันธุ์หอม (PK2011T202) ซึ่งการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนี้เป็นการเปลี่ยนจากนิวคลีโอไทด์อะดีนีน (adenine; A) ที่ตำแหน่ง 1,855 ในแตงกวาพันธุ์ไม่หอม (พันธุ์ 9930, Gy14 และ 301176) ไปเป็นนิวคลีโอไทด์กวีนีน

(guanine; G) ในແຕງກວາພັນຊູ່ໂຮມ (PK2011T202) ແລະຳກັດຖອດມີໂນຕຳແໜ່ງທີ່ 163 ຂອງໂປຣຕີນ BADH ເປັນຈາກໄທໂຣຊີນ (Tyrosine; Y) ເປັນໄຮໂທຊີນ (Cytosine; C) (ຖານທີ່ 5)

ເມື່ອນຳລຳດັບນິວຄລີໂອໄທດ໌ຂອງຍີນ *BADH* ທີ່ເປັນສ່ວນທີ່ຈະຖືກຄອດຣັສເປັນໂປຣຕີນ/ເອີນໄຮມ໌ (coding sequence; CDS) ຂອງແຕງກວາພັນຊູ່ PK2011T202, 301176, 9930 ແລະ Gy14 ໄປຳນາຍລຳດັບຖອດມີໂນ ແລ້ວນຳເປີຍຍທຶຍບກັນ ພົບວ່າ ເອີນໄຮມ໌ BADH ໃນທຸກພັນຊູ່ມີຈຳນວນຖອດມີໂນເທົ່າກັນ ຄື 503 ຕົວ (ຖານທີ່ 5) ແລະພົບວ່າມີຕຳແໜ່ງຂອງຖອດມີໂນທີ່ແຕກຕ່າງກັນທັງສິ້ນ 5 ຕຳແໜ່ງ ຄື ຕຳແໜ່ງທີ່ 27, 127, 163, 297 ແລະ 298 ແຕ່ຕຳແໜ່ງຂອງຖອດມີໂນທີ່ເຈດຽວກັບແຕງກວາພັນຊູ່ໂຮມ PK2011T202 ຄື ຕຳແໜ່ງທີ່ 163

ຈາກການພັດທະນາເຄື່ອງໝາຍດີເອີນເອຊີນດີ SNAP ສຳລັບໃຊ້ຕົວຢ່າງການກວດສອບການກຳລັງພັນຊູ່ single-base substitution ທີ່ຕຳແໜ່ງ 1,855 ຈຳນວນ 6 ເຄື່ອງໝາຍ [3 ເຄື່ອງໝາຍສຳລັບພັນຊູ່ປັກຕີ (ຈຳເປາະກັບອັດຕິລ A) ແລະ 3 ເຄື່ອງໝາຍສຳລັບພັນຊູ່ທີ່ກຳລັງພັນຊູ່ (ຈຳເປາະກັບອັດຕິລ G)] (ຕາຣາງທີ່ 4) ພົບວ່າ ເຄື່ອງໝາຍທັງສາມທີ່ໃຊ້ຕົວຢ່າງການກວດສອບອັດຕິລ A ສາມາດກວດສອບອັດຕິລໄດ້ ສ່ວນ 2 ໃນ 3 ຂອງເຄື່ອງໝາຍທີ່ໃຊ້ຕົວຢ່າງການກວດສອບອັດຕິລ G ສາມາດກວດສອບອັດຕິລໄດ້ ຄື CsBADH_G1 ແລະ CsBADH_G3 (ຖານທີ່ 6a) ຖານທີ່ 6b ແສດຖະຍະການຕົວຢ່າງການກວດສອບການກະຈາຍຕົວຂອງອັດຕິລທັງສອງໃນປະຊາກຸນ F_2 (301176 x PK2011T202) ໂດຍໃຊ້ເຄື່ອງໝາຍ SNAP CsBADH_A1 ແລະ CsBADH_G1 ທີ່ພັດທະນາຂຶ້ນ



ภาพที่ 4 แผนภาพแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์แบบ single base substitution และ insetion/deletion (indel) ในยีน *BADH* ของแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 (พันธุ์หอม), 301176 (พันธุ์ไม่หอม), Gy14 (พันธุ์ไม่หอม) และ 9930 (พันธุ์ไม่หอม) กลุ่มสี่เหลี่ยมสีดำแทน exon และเส้นตรงแทน intron ตัวอักษรสีดำแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ เครื่องหมายดอกจันแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่จำเพาะกับพันธุ์ PK2011T20

9930	MAISIPTRQLFIDGEWREPVLLKKRIPV	INPTTEETIGSIPAATAEDVELAVDAARKALARNKGKDWSASGAVRAKYLRAIAAKITERKSELAKLEAIDCGKPLEEAAWMDDDVAGCFDY	120
Gy14	MAISIPTRQLFIDGEWREPVLLKKRIP	IINPTTEETIGSIPAATAEDVELAVDAARKALARNKGKDWSASGAVRAKYLRAIAAKITERKSELAKLEAIDCGKPLEEAAWMDDDVAGCFDY	120
301176	MAISIPTRQLFIDGEWREPVLLKKRIPV	INPTTEETIGSIPAATAEDVELAVDAARKALARNKGKDWSASGAVRAKYLRAIAAKITERKSELAKLEAIDCGKPLEEAAWMDDDVAGCFDY	120
PK2011T202	MAISIPTRQLFIDGEWREPVLLKKRIP	IINPTTEETIGSIPAATAEDVELAVDAARKALARNKGKDWSASGAVRAKYLRAIAAKITERKSELAKLEAIDCGKPLEEAAWMDDDVAGCFDY	120
9930	YADLAEGLDAKQKAPVDVPMDTFKSYVLKEPIGVVGLITPWN	YPLLMCAWKVAPALAAGCAAAILKPSELASVTSLELAEICKDVGLPSGILNVLTGYGPEAGAPLASHPHVDKVAFTGSS	240
Gy14	YADLAEGLDAKQKAPVDVPMDTFKSYVLKEPIGVVGLITPWN	YPLLMCAWKVAPALAAGCAAAILKPSELASVTSLELAEICKDVGLPSGILNVLTGYGPEAGAPLASHPHVDKVAFTGSS	240
301176	YADLAEGLDAKQKAPVDVPMDTFKSYVLKEPIGVVGLITPWN	YPLLMCAWKVAPALAAGCAAAILKPSELASVTSLELAEICKDVGLPSGILNVLTGYGPEAGAPLASHPHVDKVAFTGSS	240
PK2011T202	YADLAEGLDAKQKAPVDVPMDTFKSYVLKEPIGVVGLITPWN	CPLLMCAWKVAPALAAGCAAAILKPSELASVTSLELAEICKDVGLPSGILNVLTGYGPEAGAPLASHPHVDKVAFTGSS	240
9930	ATGSKIMASAAQLVKPVTMELGGKSPIVVFDDVDLDKAAEWAI	FGCFWTNGQICSATSRLLVHENIADEF	FLDKIVQWCKNIKISDPLEEGCRLGPVVSAGQYEKVLK FVSTAEQEGAKIL 360
Gy14	ATGSKIMASAAQLVKPVTMELGGKSPIVVFDDVDLDKAAEWAI	FGCFWTNGQICSATSRLLVHENIADEF	FLDKIVQWCKNIKISDPLEEGCRLGPVVSAGQYEKVLK FVSTAEQEGAKIL 360
301176	ATGSKIMASAAQLVKPVTMELGGKSPIVVFDDVDLDKAAEWAI	FGCFWTNGQICSATHPRLLVHENIADEF	FLDKIVQWCKNIKISDPLEEGCRLGPVVSAGQYEKVLK FVSTAEQEGAKIL 360
PK2011T202	ATGSKIMASAAQLVKPVTMELGGKSPIVVFDDVDLDKAAEWAI	FGCFWTNGQICSATSRLLVHENIADEF	FLDKIVQWCKNIKISDPLEEGCRLGPVVSAGQYEKVLK FVSTAEQEGAKIL 360
9930	YGGVRPKHLKKGYFVEPAIITNVTTSMQIWKEEVFGPVL	CVKTFSSSEDAIELANDTIYGLGAAVISNDLERCDRVAKAFQAGIVWINCSQPCFTQAPWGGIKRSGFGRELGEWGLD	TYL 480
Gy14	YGGVRPKHLKKGYFVEPAIITNVTTSMQIWKEEVFGPVL	CVKTFSSSEDAIELANDTIYGLGAAVISNDLERCDRVAKAFQAGIVWINCSQPCFTQAPWGGIKRSGFGRELGEWGLD	TYL 480
301176	YGGVRPKHLKKGYFVEPAIITNVTTSMQIWKEEVFGPVL	CVKTFSSSEDAIELANDTIYGLGAAVISNDLERCDRVAKAFQAGIVWINCSQPCFTQAPWGGIKRSGFGRELGEWGLD	TYL 480
PK2011T202	YGGVRPKHLKKGYFVEPAIITNVTTSMQIWKEEVFGPVL	CVKTFSSSEDAIELANDTIYGLGAAVISNDLERCDRVAKAFQAGIVWINCSQPCFTQAPWGGIKRSGFGRELGEWGLD	TYL 480
9930	TVKQVTQYISDEPWGWYKSPSKL	503	
Gy14	TVKQVTQYISDEPWGWYKSPSKL	503	
301176	TVKQVTQYISDEPWGWYKSPSKL	503	
PK2011T202	TVKQVTQYISDEPWGWYKSPSKL	503	

ภาพที่ 5 แผนภาพแสดงการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนที่สร้างจากยีน *BADH* ของแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 (พันธุ์หอม), 301176 (พันธุ์ไม่หอม), Gy14 (พันธุ์ไม่หอม) และ 9930 (พันธุ์ไม่หอม) ตัวอักษรสีดำแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ เครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่จำเพาะสำหรับพันธุ์หอม

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR จำนวน 43 เครื่องหมาย ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ของแตงกวา (Ren et al. 2009) พบว่า มี 11 เครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ PK2011T202 กับ 301176 และเมื่อนำเครื่องหมายทั้ง 11 เครื่องหมาย ไปวิเคราะห์ในประชากร F_2 และ BC_1F_1 เพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรม ร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNAP (CsBADH_A1/CsBADH_G1) ที่พัฒนาขึ้น พบว่า เครื่องหมายทั้งหมดอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจ (linkage group) เดียวกัน โดยกลุ่มลิงค์เกจของประชากร F_2 และ BC_1F_1 มีความยาว 61.0 และ 152.0 เซ็นติมอร์แกน (centimorgan; cM) ตามลำดับ

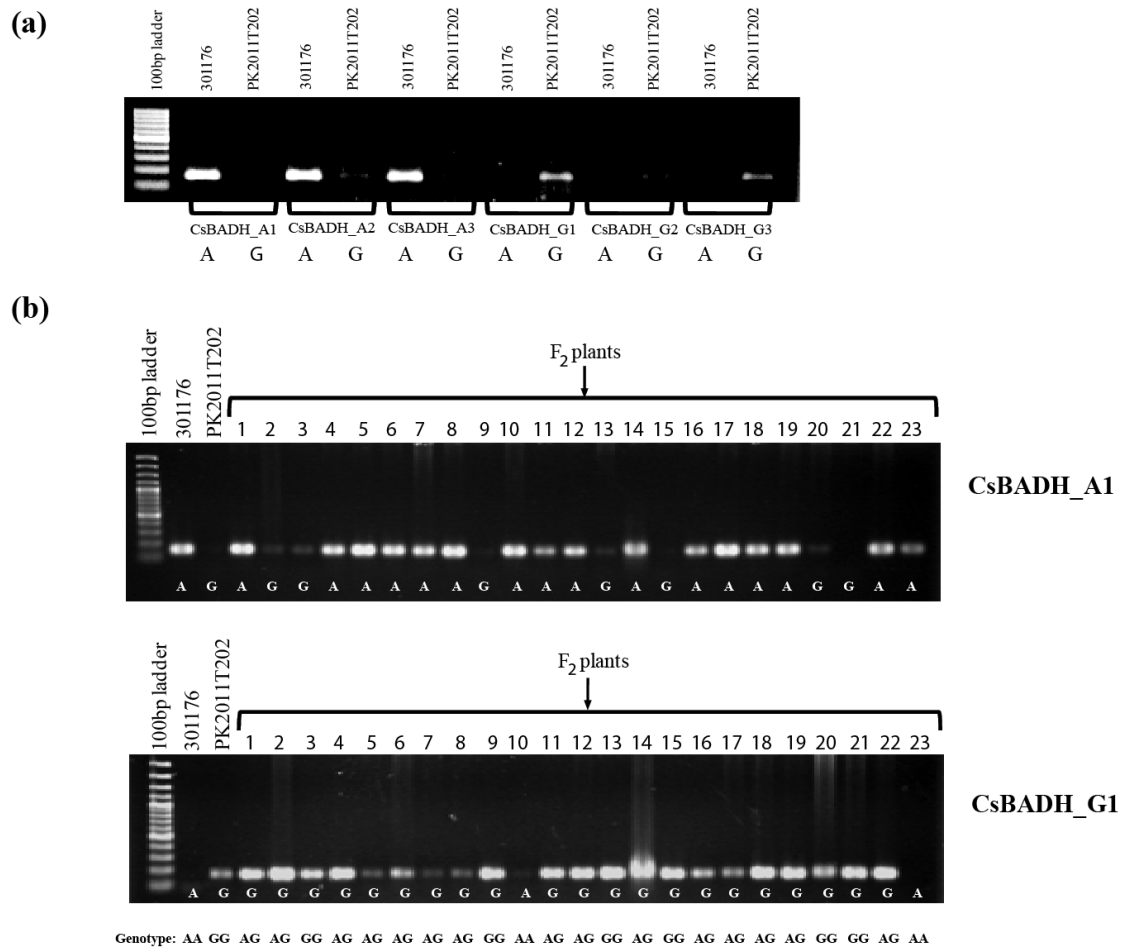
เมื่อทำการวิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับกลิ่นหอม ในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ด้วยวิธี single marker regression analysis พบว่า มี 11 เครื่องหมายที่สัมพันธ์กับกลิ่นหอมในประชากร F_2 และ BC_1F_1 (ตารางที่ 8) โดยในประชากร F_2 เครื่องหมายเหล่านั้นอธิบายความแปรปรวนของกลิ่นหอมได้ระหว่าง 9.74 (เครื่องหมาย SSR01115) ถึง 56.76% (เครื่องหมาย CS-SSR7) ส่วนในประชากร BC_1F_1 เครื่องหมายทั้ง 11 เครื่องหมายอธิบายความแปรปรวนของกลิ่นหอมได้ระหว่าง 6.26 (เครื่องหมาย SSR01115) ถึง 55.14% (เครื่องหมาย CS-SSR5 และ CsBADH_A1/CsBADH_G1)

เมื่อทำการวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมกลิ่นหอมในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ด้วยวิธี composite interval mapping พบว่า ค่า LOD threshold สำหรับการตรวจสอบ QTL ในประชากรทั้งสองมีค่าเท่ากับ 6.1 และ 5.7 ตามลำดับ โดยในประชากร F_2 ตรวจพบตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะกลิ่นหอมวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 1 มีค่า LOD score เท่ากับ 44.45 และวางตัวห่างจากตำแหน่งของเครื่องหมาย CsBADH_A1/CsBADH_G1 (ตำแหน่งของยีน BADH) เป็นระยะทาง 1.1 เซ็นติมอร์แกน (ภาพที่ 7a) และอธิบายความแปรปรวนของคะแนนความหอมในประชากร F_2 ได้ 80.85% โดยมีค่า additive effect และ dominant effect เท่ากับ -0.34 และ 0.58 ตามลำดับ และได้ตั้งชื่อตำแหน่งนี้ว่า *qFgr*

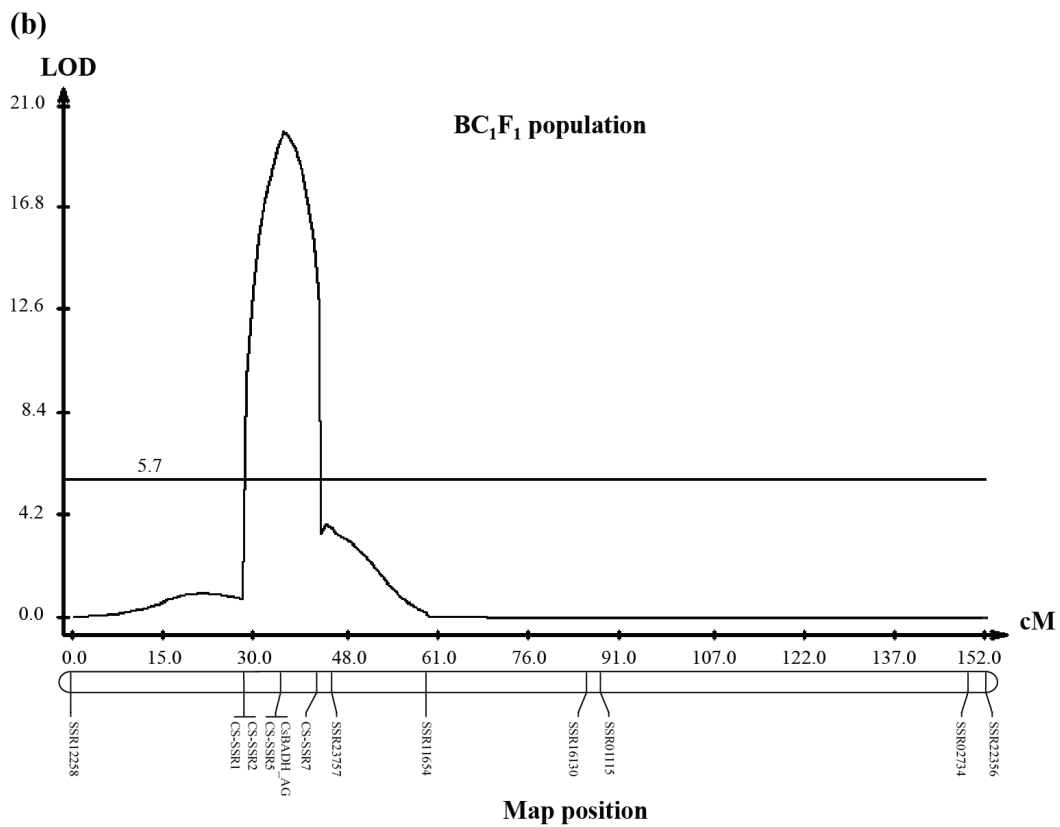
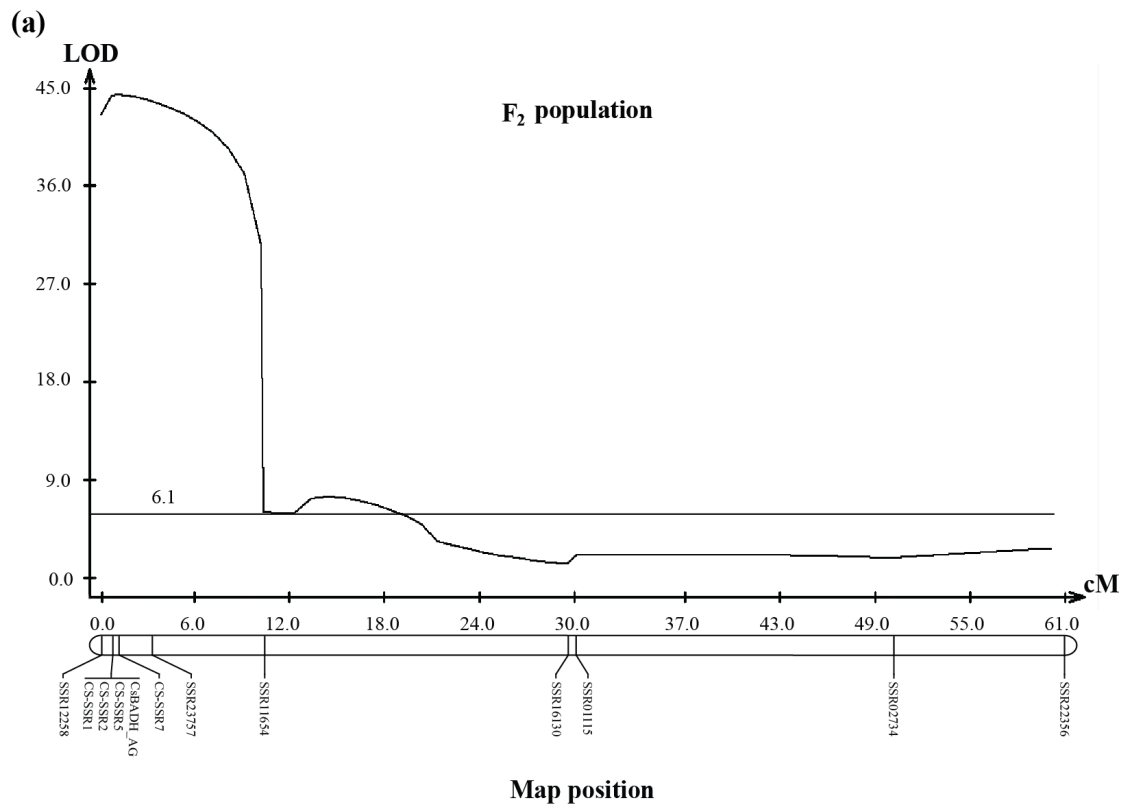
ส่วนในประชากร BC_1F_1 พบว่า *qFgr* วางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 1 มีค่า LOD score เท่ากับ 19.96 โดยมีตำแหน่งห่างจากเครื่องหมาย CsBADH_A1/CsBADH_G1 (ตำแหน่งของยีน BADH) เป็นระยะทาง 1.0 เซ็นติมอร์แกน (ภาพที่ 7b) และอธิบายความแปรปรวนของคะแนนความหอมในประชากร F_2 ได้ 43.27% โดยมีค่า additive effect เท่ากับ -0.72

ตารางที่ 8 เครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมที่ 1 ของแตงกวา ที่สัมพันธ์กับความหอมใน
ประชากร F_2 (301176 x PK2011T202) และ BC_1F_1 [(301176 x PK2011T202) x
PK2011T202] ที่ตรวจสอบด้วยวิธี single regression marker analysis

ชื่อเครื่องหมาย	ประชากร F_2		ประชากร BC_1F_1	
	ค่าความน่าจะเป็น	R^2 (%)	ค่าความน่าจะเป็น	R^2 (%)
SSR12258	0.0001	53.88	0.0001	12.66
CS-SSR1	0.0001	55.83	0.0001	36.78
CS-SSR2	0.0001	55.83	0.0001	36.78
CS-SSR5	0.0001	55.83	0.0001	55.14
CsBADH_AG1	0.0001	55.83	0.0001	55.14
CS-SSR7	0.0001	56.76	0.0001	42.52
SSR23757	0.0001	53.03	0.0001	41.17
SSR11654	0.0001	38.01	0.0001	17.38
SSR16130	0.0002	11.12	0.0008	7.89
SSR01115	0.0003	9.74	0.0031	6.26



ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอ (อัลลีล) ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SNAP จำนวน 6 เครื่องหมายที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ใน exon ที่ 5 ของยีน *BADH* ใน แตงกวาพันธุ์ PK2011T202 (พันธุ์หอม) และ 301176 (พันธุ์ไม่หอม) (a) การกระจายตัวของเครื่องหมาย *CsBADH-A1* และ *CsBADH-G1* ในประชากร F_2 จำนวน 23 ต้น ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง PK2011T202 (พันธุ์หอม) กับ 301176 (พันธุ์ไม่หอม) (b)



ภาพที่ 7 แผนที่ยืนและตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมความหอม (*qFgr*) บนโครโมโซมที่ 1 ที่ตรวจสอบด้วยวิธี composite interval mapping ในประชากร F₂ (301176 x PK2011T202) (a) และ BC₁F₁ [(301176 x PK2011T202) x PK2011T202] (b)

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวากลิ่นหอมใบเตย

โครงการได้ทำการรวบรวมแตงกวาพันธุ์พื้นเมืองที่มีกลิ่นหอมใบเตยในอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยทำการสอบถามเกษตรกรผู้ปลูกแตงกวา และชาวบ้านทั่วไป พบว่า มีเกษตรกร และชาวบ้านเพียงไม่กี่รายเท่านั้นที่ปลูกแตงกวาพันธุ์กลิ่นหอม เนื่องจากพันธุ์แตงกวากลิ่นหอมใบปลุกยาก อ่อนแอต่อโรคแมลงและสภาพแวดล้อม และให้ผลผลิตน้อย ส่วนใหญ่จะปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนเป็นหลัก โดยจะปลูกร่วมกับข้าวไร่ หรือปลูกในแปลงผักสวนครัว (ภาพที่ 8) ผลผลิตที่เหลือจึงจะนำไปขาย นอกจากนี้ยังพบว่า เกษตรกรผู้ปลูกจะเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้เองเพื่อปลูกต่อ และไม่นิยมที่จะให้หรือแจกจ่ายเมล็ดพันธุ์ให้กับคนอื่นๆ อย่างไรก็ตามทางโครงการสามารถเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ไว้ได้จาก 3 ตัวอย่างจากเกษตรกร 3 ราย โดยวิธีการขอและซื้อ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำแตงกวาทั้ง 3 พันธุ์มาปลูก พบว่า มีเพียง 2 สายพันธุ์ คือ PK2014T006 และ PK2014T009 มีกลิ่นหอมใบเตย

เมื่อทำการขอซื้อพันธุกรรมแตงกวาจากศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 105 สายพันธุ์มาปลูก เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า มีแตงกวา 1 สายพันธุ์ คือ CS103 มีกลิ่นหอมใบเตย



ภาพที่ 7. แปลงผักสวนครัวของเกษตรกรที่ปลูกแตงกวากลิ่นหอมใบเตย จังหวัดเพชรบูรณ์

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวา 96 พันธุ์ (หอมจำนวน 7 พันธุ์ และไม่หอม 89 พันธุ์) โดยการใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย พบว่า ตรวจพบจำนวนอัลลีล (N_A) ทั้งสิ้น 36 อัลลีล โดยมีจำนวนอัลลีลต่อเครื่องหมายระหว่าง 2 (เครื่องหมาย SSR02895) ถึง 6 (เครื่องหมาย CS-SSR3) และค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อเครื่องหมายเท่ากับ 3.6 (ตารางที่ 9) ค่า PIC ของเครื่องหมาย SSR มีค่าระหว่าง 0.27 (เครื่องหมาย SSR22593) ถึง 0.76 (เครื่องหมาย SSR17406) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 อย่างไรก็ตาม (ตารางที่ 9) ค่า allelic richness ของแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมกับพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม มีค่าใกล้เคียงกัน เท่ากับ 27.78 และ 23.43 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ความหลากหลายของยีน (gene diversity) ของแตงกวาทั้ง 96 พันธุ์ อยู่ในระดับปานกลาง มีค่าเท่ากับ 0.52 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมกับพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่น

หอมพบว่า พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.52 และ 0.37 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมมีความหลากหลายอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำถึงปานกลาง (ตารางที่ 9)

อัตราการผลิตข้ามของแตงกวาทั้ง 96 พันธุ์ ที่ประเมินจากค่า F_{IS} มีค่าเท่ากับ 22.47 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม และพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม เท่ากับ 23.53 และ 15.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

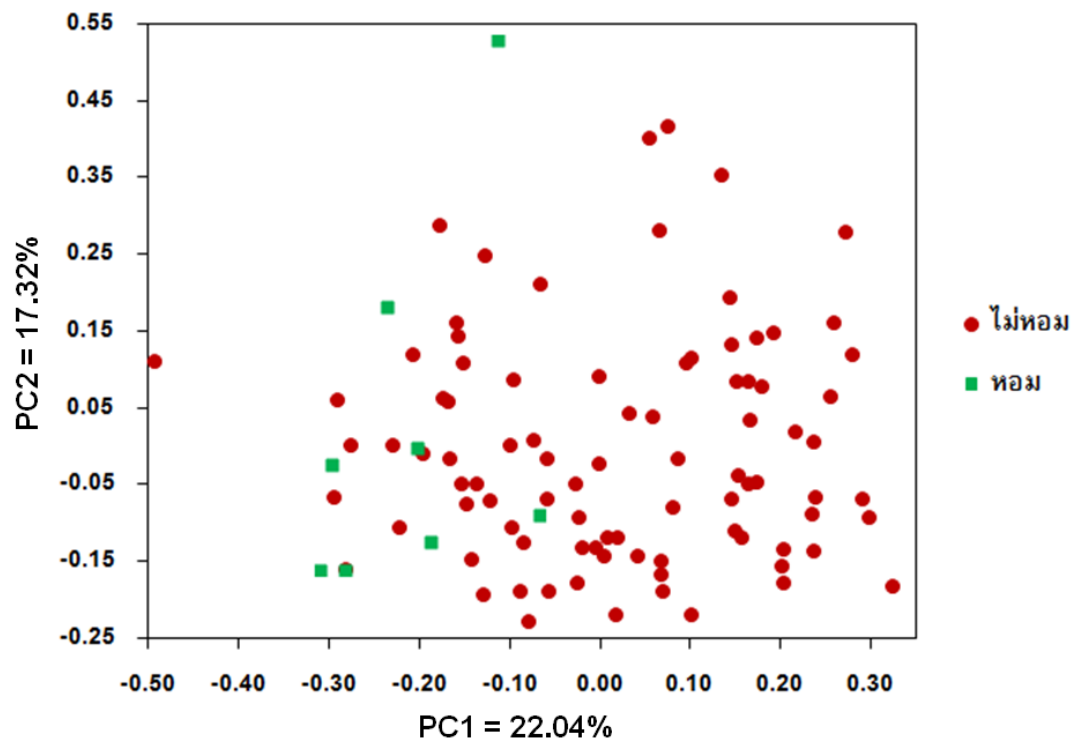
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบแกนหลัก (PCoA) จากค่า Shared allele distance ที่คำนวณมาจากข้อมูล SSR อัลลีลของแตงกวาทั้ง 96 พันธุ์ พบว่า แกนหลักสามแกนแรก (PC1, PC2 และ PC3) อธิบายความแปรปรวนรวมกันได้เท่ากับ 56.08 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละแกนอธิบายได้เท่ากับ 22.04 17.32 และ 16.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำค่า eigenvalue ของแต่ละแตงกวาแต่ละพันธุ์บนแกน PC1 และ PC2 มาสร้างกราฟการกระจายตัว พบว่า ไม่สามารถแบ่งกลุ่มแตงกวาได้ (ภาพที่ 9) อย่างไรก็ตาม พบว่า แตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมส่วนใหญ่กระจายตัวอยู่ทางด้านขวาของกราฟ และมีความแตกต่างกัน และมี 1 พันธุ์ (PK2011T202) ที่แตกต่างจากแตงกวาพันธุ์อื่นๆ อย่างชัดเจน

การจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ Neighbor-joining analysis ของแตงกวาทั้ง 96 พันธุ์จากค่า Shared allele distance ที่คำนวณมาจากข้อมูล SSR อัลลีล แสดงให้เห็นว่า อาจแบ่งแตงกวาทั้งหมดออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก (Cluster I, II และ III) (ภาพที่ 10) ใน Cluster I และ II ต่างก็มีแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมรวมอยู่ด้วย แต่เกือบทั้งหมดอยู่ใน Cluster I และมีเพียง 1 พันธุ์อยู่ใน Cluster II (PK2011T201-2) พันธุ์ที่มีกลิ่นหอมใน Cluster I นั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (subcluster) (ภาพที่ XXX) โดยกลุ่มหนึ่งนั้นมีพันธุ์หอม 4 พันธุ์ (PK2014T009, CS103, PK2014T006-1 และ PK2014T006-2) ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง และอีกกลุ่มหนึ่งมีพันธุ์หอม 2 พันธุ์ (PK2011T201-1 และ PK2012T202) ซึ่งมีความแตกต่างกันพันธุกรรมในระดับปานกลาง

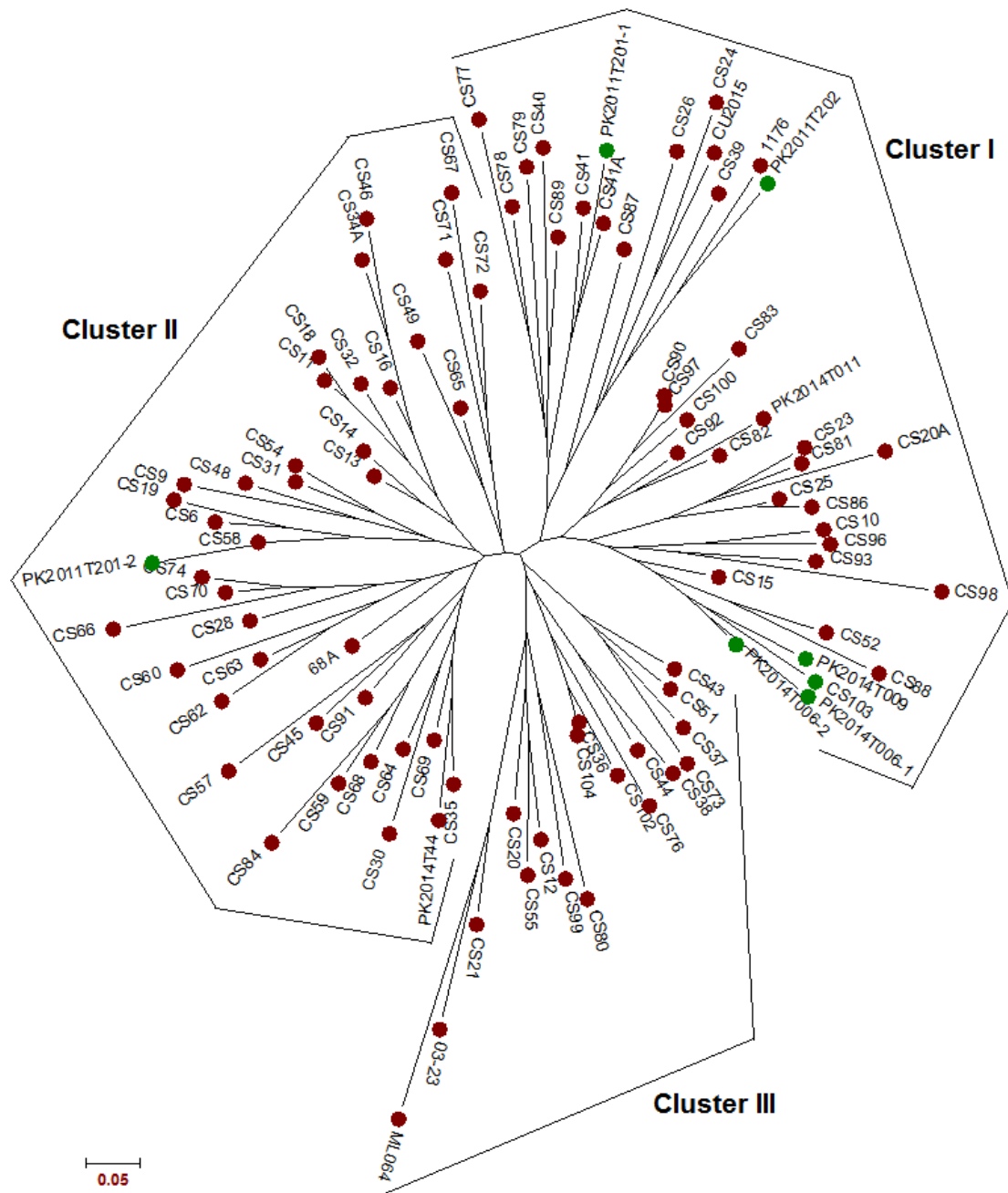
การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของแตงกวาทั้ง 96 พันธุ์ โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE ตามวิธีของ Evanno et al. (2005) พบว่า แตงกวาทั้งหมดประกอบด้วย 3 (delta $K = 3$) ประชากรย่อย (subpopulation I, II และ III) (ภาพที่ 11) และการจัดกลุ่มประชากรพบว่า ประชากรย่อย I, II และ III ประกอบด้วยแตงกวาจำนวน 37, 25 และ 34 พันธุ์ตามลำดับ พันธุ์ที่มีกลิ่นหอมนั้นอยู่ในประชากรย่อย I ได้แก่ PK2011T201-1 และ PK2012T202 และประชากรย่อย II ได้แก่ (PK2011T201-2, PK2014T009, CS103, PK2014T006-1 และ PK2014T006-2) (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 9 จำนวนอัลลีล ค่า PIC ค่า gene diversity และค่า allelic richness ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 12 เครื่องหมายที่วิเคราะห์ในแตงกวาจำนวน 96 พันธุ์ (ไม่หอม 89 พันธุ์ และหอม 7 พันธุ์)

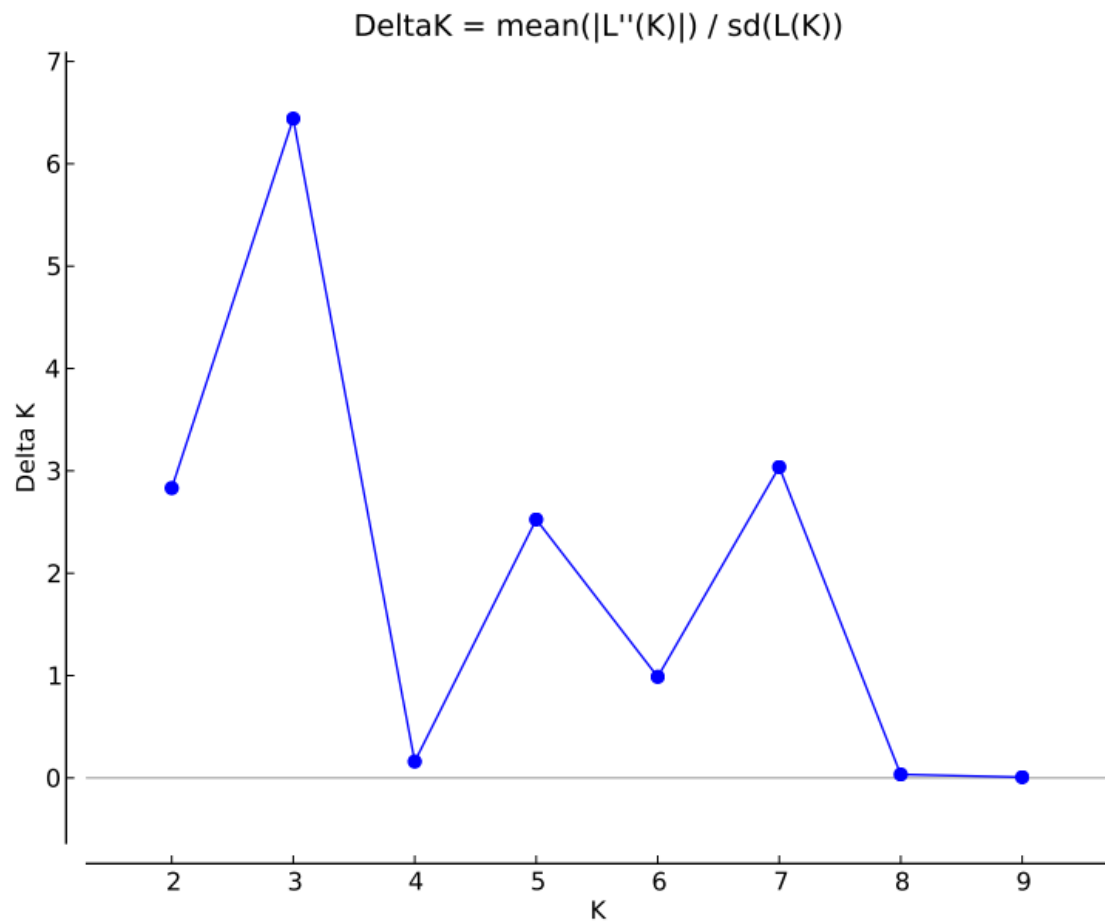
เครื่องหมาย	จำนวนอัลลีล (N_A)			PIC			Gene diversity (H_E)			Allelic richness (A_R)		
	ทั้งหมด	ไม่หอม	หอม	ทั้งหมด	ไม่หอม	หอม	ทั้งหมด	ไม่หอม	หอม	ทั้งหมด	ไม่หอม	หอม
CS-SSR1	4.00	3.00	4.00	0.53	0.53	0.29	0.54	0.53	0.33	2.38	2.35	3.00
CS-SSR2	4.00	2.00	3.00	0.59	0.59	0.15	0.60	0.59	0.17	2.82	2.84	2.00
CS-SSR3	6.00	5.00	5.00	0.76	0.75	0.72	0.77	0.76	0.80	4.36	4.33	4.49
CS-SSR5	3.00	4.00	4.00	0.56	0.52	0.73	0.56	0.53	0.82	3.41	3.32	3.95
SSR02895	2.00	2.00	3.00	0.56	0.56	0.46	0.56	0.56	0.52	2.67	2.70	2.00
SSR15043	3.00	1.00	3.00	0.48	0.49	0.00	0.48	0.49	0.00	2.13	2.14	1.00
SSR15802	3.00	1.00	6.00	0.62	0.64	0.00	0.63	0.65	0.00	3.54	3.62	1.00
SSR16130	3.00	2.00	3.00	0.48	0.49	0.41	0.49	0.49	0.48	2.33	2.35	2.00
SSR17406	5.00	2.00	2.00	0.32	0.32	0.28	0.32	0.32	0.33	1.94	1.94	2.00
SSR22593	3.00	2.00	3.00	0.27	0.27	0.25	0.27	0.27	0.29	2.19	2.21	1.99
เฉลี่ย	3.60	3.60	2.40	0.52	0.52	0.33	0.52	0.52	0.37	2.77	2.78	2.34
ทั้งหมด	36.00	36.00	24.00	-	-	-	-	-	-	27.75	27.78	23.43



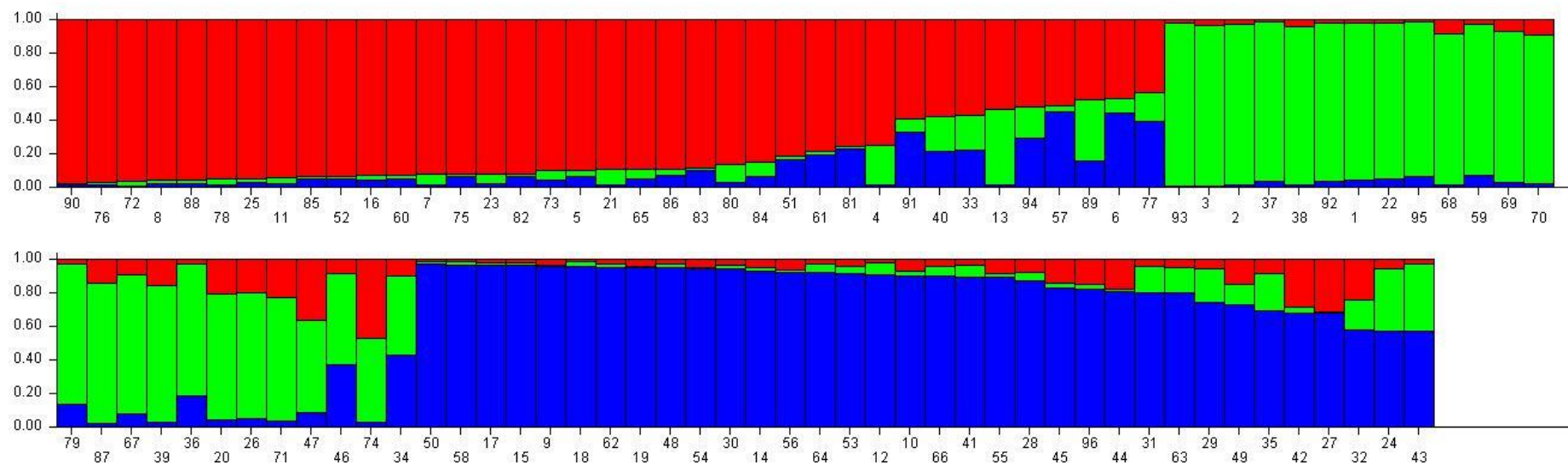
ภาพที่ 9 การกระจายตัวและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตงกวา 96 พันธุ์ บนแกนองค์ประกอบหลักที่ 1 และ แกนองค์ประกอบหลักที่ 2 ที่วิเคราะห์จากค่า Shared allele distance (Chakraborty and Jin 1993) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย



ภาพที่ 10 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตงกวา 96 พันธุ์ ที่วิเคราะห์จากค่า Shared allele distance (Chakraborty and Jin 1993) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย โดยวงกลมสีแดงเป็นพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอมใบเตย และวงกลมสีเขียวเป็นพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม



ภาพที่ 11 ค่า delta K ของจำนวนประชากรย่อย 2 ถึง 10 ของเตงกวาจำนวน 96 พันธุ์ ที่วิเคราะห์ตามวิธีการของ Evanno et al. (2005) ด้วยข้อมูลอัลลีลจากเครื่องหมาย SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย ค่า delta K ของจำนวนประชากรย่อยเท่ากับ 3 มีค่าสูงที่สุด



ภาพที่ 12 Bar plot แสดงความโครงสร้างประชากรของแท่งทาว 96 พันธ์ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 ประชากรย่อย ที่วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE ด้วยข้อมูล อัลลีลจากเครื่องหมาย SSR จำนวน 10 เครื่องหมาย (หมายเลขแต่ละ Bar นั้นตรงกับหมายเลขของพันธุ์แท่งทาวที่ระบุไว้ในตารางที่ XX; หมายเลข 2, 3, 4, 6, 7, 8 และ 90 เป็นพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมใบเตย)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การถ่ายทอดลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวา

กลิ่นหอมใบเตยเป็นลักษณะพิเศษที่ช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตในพืชได้ ข้าว ถั่วเหลือง ผักสด และข้าวฟ่าง พันธุ์ที่มีกลิ่นหอมใบเตย จะมีราคาแพงกว่าพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่น การปรับปรุงพันธุ์ให้มีกลิ่นหอม จึงเป็นวัตถุประสงค์หลักอย่างหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชเหล่านี้ แตงกวาเป็นพืชผักชนิดหนึ่งที่มีการปลูก และนิยมบริโภค กันทั่วไปทั่วโลก พันธุ์แตงกวาที่มีกลิ่นหอมใบเตยที่พบ เป็นพันธุ์ที่มีเฉพาะในประเทศเท่านั้น (native cultivar) ดังนั้น พันธุ์แตงกวาที่มีกลิ่นหอมนี้จึงเป็นเชื้อพันธุกรรมที่มีค่าและหายาก

การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในการวิจัยนี้ พบว่า กลิ่นหอมใบเตยเป็นลักษณะด้อย และถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง ผลการทดลองดังกล่าว เหมือนกับผลการศึกษาในข้าว (Sood and Siddiq 1978) ข้าวฟ่าง (Murty et al. 1982) และถั่วเหลืองผักสด (AVRDC 2003; Juwattanasomeran et al. 2012) ที่พบว่า กลิ่นหอมใบเตยเป็นลักษณะด้อย และถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 ตำแหน่ง เนื่องจากกลิ่นหอมใบเตยในพืชทั้งสี่ชนิดนี้ ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมที่เหมือนกัน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าการเกิดกลิ่นหอมใบเตยในพืชเหล่านี้มีกลไกที่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามทางโครงการได้ตั้งชื่อยีนที่ควบคุมกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาว่ายีน “*fgt*”

แม้ว่ากลิ่นหอมใบเตยจะถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 ตำแหน่ง แต่เนื่องจากลักษณะนี้เป็นลักษณะด้อย ทำให้การปรับปรุงพันธุ์นั้นยาก อีกทั้งพันธุ์การค้าของแตงกวาที่ปลูกอยู่ในปัจจุบัน ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ดังนั้น ในการพัฒนาพันธุ์จำเป็นจะต้องทำให้ยีน *fgt* ในพันธุ์พ่อและแม่ อยู่ในสภาพ homozygous เสียก่อน โดยวิธีการผสมกลับ ซึ่งในทุกชั่วรุ่นของการผสมกลับตั้งแต่ BC_2 เป็นต้นไป จะต้องมีการผสมตัวเองเพื่อคัดเลือกต้นที่มียีน *fgt* อยู่ในสภาพ homozygous สำหรับใช้ผสมกลับต่อไป ทำให้เสียเวลานาน และยุ่งยาก อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้ โดยการใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection)

Xenia effect เป็นปรากฏการณ์ทางพันธุศาสตร์ที่พบในพืชบางชนิด เป็นปรากฏการณ์ที่พันธุกรรมของละอองเกสรจากต้นพ่อไปมีผลต่อลักษณะต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง สี ระยะการพัฒนา และองค์ประกอบทางเคมีของผล และเมล็ดที่เกิดบนต้นแม่ โดยลักษณะที่เกิดขึ้นมีลักษณะเหมือนกับต้นพ่อ (Denney) ตัวอย่าง ได้แก่ เมื่อต้นข้าวโพดหวานถูกผสมพันธุ์โดยละอองเกสรจากข้าวโพดไร่ (ข้าวโพดปกติ) จะทำให้เมล็ดที่เกิดขึ้นบนต้นข้าวโพดหวานมีลักษณะเหมือนกับข้าวโพดไร่ จากการผสมพันธุ์ระหว่างแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 กับ 301176 ทั้งการผสมตรง (direct cross; PK2011T202 x 301176) และผสมสลับ (reciprocal cross; 301176 x PK2011T202) พบว่า ผลของแตงกวาที่เกิดบนต้น PK2011T202 และ 301176 จากการผสมตรงและผสมสลับมีกลิ่นหอม และไม่มีกลิ่นหอม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไม่มี xenia effect สำหรับลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวา การไม่มี xenia effect ในลักษณะ

ดังกล่าว เป็นผลดีกับเกษตรกรผู้ปลูกแตงกวาพันธุ์กลิ่นหอมใบเตย เพราะถึงแม้จะมีละอองเกสรของพันธุ์ที่ไม่มียีน *fgr* มาผสมกับพันธุ์ที่ปลูกไว้ ผลแตงกวาที่ได้ก็จะมีกลิ่นหอมตามพันธุ์ของต้นแม่ อย่างไรก็ตาม เป็นผลเสียในกรณีที่เกษตรกรปลูกแตงกวาพันธุ์หอมเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการค้า โดยใช้เมล็ดที่เก็บไว้เอง แล้วมีละอองเกสรของพันธุ์ที่ไม่มียีน *fgr* มาผสม ก็จะทำให้ผลแตงกวาที่เกิดขึ้นมีกลิ่นหอม แต่เมล็ดที่เกิดในผลที่มีกลิ่นหอมนั้นจะมียีนอยู่ในสภาพ heterozygous (*Fgr/fgr*) และ เมื่อนำไปปลูกก็จะสร้างผลที่ไม่มีกลิ่นหอม ซึ่งผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เสียชื่อเสียงได้

ยีนที่ควบคุมความหอมใบเตยในแตงกวา

การค้นหายีนที่ควบคุมกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 ซึ่งพิจารณาดังกล่าวเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) แทนการพิจารณาว่าเป็นลักษณะเชิงคุณภาพ (quantitative trait) โดยการดมใบแล้วให้ระดับคะแนนระดับต่างๆ 3 ระดับ คือ 1 = ไม่หอม, 2 = มีกลิ่นหอมน้อยจนถึงปานกลาง และ 3 = มีกลิ่นหอมมาก ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือ กลิ่นหอมใบเตยเป็นลักษณะด้อย และถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง ดังนั้น การเกิดกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 จึงน่าจะเกิดจากการสูญเสียหน้าที่การทำงานของยีน

การศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์ในพืชไร่ ได้แก่ ข้าว (Bradbury et al. 2005; Shi et al. 2008; Shao et al. 2011; Amarawathi et al. 2008; Kovach et al. 2009) ถั่วเหลือง (Juwattanasomran et al. 2011, 2012) และข้าวฟ่าง (Yundaeng et al. 2013) พบว่า กลิ่นหอมใบเตยและการสร้างสาร 2AP เกิดจากการที่เอ็นไซม์ (โปรตีน) BADH2 ในพืชเหล่านี้สูญเสียหน้าที่การทำงานหรือทำงานได้น้อยลง นอกจากนี้ การทำให้ยีน *BADH2* ในพันธุ์ข้าวและถั่วเหลืองที่ไม่มีกลิ่นหอมใบเตยสูญเสียการทำงานด้วยวิธี RNA interference (RNAi) ทำให้ข้าวและถั่วเหลืองดังกล่าวมีการสร้างสาร 2AP และมีกลิ่นหอมใบเตยเกิดขึ้น (Niu et al. 2008; Arikiti et al. 2010) ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่ายีน *BADH2* มีความสัมพันธ์กับการเกิดกลิ่นหอมใบเตยในพืช การค้นหายีนที่ควบคุมกลิ่นหอมใบเตย ในโครงการนี้ พบว่า การกลายพันธุ์แบบ single base substitution ในส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนของยีน *BADH2* มีความสัมพันธ์กับการเกิดกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 การกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนจากนิวคลีโอไทด์อะดีนีน (A) ที่ตำแหน่ง 1,855 ในแตงกวาพันธุ์ไม่หอมไปเป็นนิวคลีโอไทด์กวานีน (G) ในแตงกวาพันธุ์หอม (PK2011T202) (A1855G) และส่งผลให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 163 ของเอ็นไซม์ BADH เปลี่ยนจากไทโรซีน (Y) เป็นไซโทซีน (C) (Y163C) (ภาพที่ 4)

เอ็นไซม์ BADH (เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH)) จัดอยู่ในกลุ่มเอ็นไซม์ aldehyde dehydrogenase (ALDH) family 9 และ family 10 (Kirch et al. 2005) สารตั้งต้น (substrate) ของเอ็นไซม์ BADH ประกอบด้วย betaine aldehyde, 3-aminopropionaldehyde, 3-dimethyl-sulfoniopropionaldehyde, γ -guanidinobutyraldehyde

และ γ -aminobutyraldehyde (GABald) (Fitzgerald et al. 2008) การศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์นี้ในถั่วลิ้นเตา (Kopečný et al. 2011) ผักโขม (Díaz-Sánchez et al. 2012) มะเขือเทศ และข้าวโพด (Kopečný et al. 2013) เผยให้เห็นว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 163 (Y163) (ตรงกับ Y160 ในผักโขม; Díaz-Sánchez et al. 2012) มีความจำเป็นและความสำคัญในการทำงานให้เอ็นไซม์ BADH จับกับสารตั้งต้นได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดย Y163 จะรักษารูปร่างและโครงสร้างของช่องทางเข้าของสารตั้งต้น (geometry of the substrate channel) ของเอ็นไซม์ BADH ซึ่งจะทำให้เกิดอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นกับเอ็นไซม์ BADH เป็นไปอย่างเหมาะสม (Kopečný et al. 2011) Kopečný et al. (2011) และ Kopečný et al. (2013) แสดงให้เห็นว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 163 ของเอ็นไซม์ BADH จากไทโรซีน (Y) เป็นอะลานีน (alanine) (A) (Y163A) ในถั่วลิ้นเตา (เรียกว่า AMADH2 ในรายงานดังกล่าว) และผักโขม ส่งผลให้เอ็นไซม์ดังกล่าวจับกับสารตั้งต้น (รวม GABald ด้วย) ได้น้อยลง เนื่องจากในวิถี (pathway) ของการสร้างสาร 2AP ในพืชที่เสนอไว้โดย Bradbury et al. (2008) นั้น เอ็นไซม์ BADH2 ที่มีการทำงานปกติจะทำหน้าในการเปลี่ยน GABald ไปเป็นกรด γ -aminobutyric แต่ถ้าเอ็นไซม์ BADH2 สูญเสียหน้าที่การทำงาน จะทำให้เกิดการสะสม GABald ซึ่งจากนั้น GABald จะถูกเติมหมู่อะซิเตต (acetate) แล้วเกิดการสร้าง 2AP ขึ้น ดังนั้น การกลายพันธุ์แบบ Y163C ในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 จึงน่าจะทำให้การจับกันระหว่างเอ็นไซม์ BADH กับ GABald เกิดน้อยลงหรือไม่เกิดขึ้น ซึ่งนำไปสู่การสร้างสาร 2AP และกลิ่นหอมใบเตยขึ้น ผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับผลการทดลองที่รายงานไว้โดย Juwattanasomran et al. (2011) ซึ่งรายงานว่าการกลายพันธุ์แบบ single base substitution จำนวน 1 ตำแหน่งในยีน *BADH2* ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษของเอ็นไซม์ *BADH2* จำนวน 1 ตำแหน่ง (G334D) และส่งผลให้เกิดการสร้างสาร 2AP และกลิ่นหอมใบเตยขึ้นในถั่วเหลือง ผักสดพันธุ์ “Kaori”

ดังที่ได้กล่าวไว้ก่อนแล้วว่า การค้นหายีนที่ควบคุมกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวานั้น พิจารณาลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเชิงปริมาณ แล้วประเมินกลิ่นหอมโดยการดม การวิเคราะห์ QTL เพื่อหาตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมกลิ่นหอมใบเตย พบว่า QTL ที่ควบคุมกลิ่นหอมใบเตย (*qFgr*) อธิบายความแปรปรวนของคะแนนกลิ่นหอมในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ได้ 80.85 และ 43.27% ตามลำดับ และตำแหน่งของ *qFgr* ตรงกับบริเวณของจีโนม (โครโมโซม) ที่ยีน *BADH* ของแตงกวาตั้งอยู่ ดังนั้น การวิเคราะห์ QTL จึงสนับสนุนว่า การกลายพันธุ์แบบ A1855G ในยีน *BADH* ซึ่งทำให้เกิดกลายพันธุ์แบบ Y163C ของเอ็นไซม์ BADH ทำให้เกิดกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาพันธุ์ PK2011T202 อย่างไรก็ดีตาม การที่ *qFgr* อธิบายความแปรปรวนของคะแนนกลิ่นหอมในประชากร BC_1F_1 ได้เพียง 43.27% นั้น อาจเป็นไปได้ว่ามียีนอื่นอีกที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวา และจากการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์แบบ A1855G ในยีน *BADH* (โดยพิจารณาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ CsBADH-AG ซึ่งใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ดังกล่าว) กับ คะแนนความหอม ในทั้งประชากร F_2 และ BC_1F_1 พบว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายดังกล่าวกับคะแนนความหอมสัมพันธ์กัน แต่ไม่สมบูรณ์แบบ ใน

ทั้งสองประชากร โดยในประชากร F_2 มีต้นที่มียีน *fgr* อยู่สภาพโฮโมไซกัส จำนวน 1 ต้น ที่มีคะแนนความหอมเพียง 1.2 (ถือว่าไม่หอม) และมีต้นที่มียีนแบบ *Fgr/fgr* จำนวน 1 ต้น แต่มีคะแนนความหอมมากกว่า 1.5 (ถือว่าหอม) ขณะที่ในประชากร BC_1F_1 มีต้นที่มียีน *fgr* อยู่สภาพโฮโมไซกัส จำนวนมากถึง 6 ต้น ที่มีคะแนนความหอมน้อยกว่า 1.5 (ถือว่าไม่หอม) และมีต้นที่มียีนแบบ *Fgr/fgr* จำนวน 8 ต้น แต่มีคะแนนความหอมมากกว่า 1.5 (ถือว่าหอม) ผลการทดลองนี้คล้ายกับการศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมความหอมในข้าว (Amarawathi et al. 2008) และในถั่วเหลือง (Juwattanasomran et al. 2011, 2012) ซึ่งความสัมพันธ์ที่ไม่สมบูรณ์แบบระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ในยีน *BADH* กับ คะแนนความหอม นั้นอาจเกิดขึ้นจากความไม่เที่ยงตรงของการให้คะแนนความหอมด้วยวิธีการดม อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจบ่งบอกได้ว่า นอกเหนือไปจากยีน *BADH* ที่เป็นยีนหลักในการทำให้เกิดกลิ่นหอมใบเตยแล้ว น่าจะมียีนอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องอีก เนื่องจากในวิธีการสร้างสาร 2AP นั้นมีสารเคมีอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เช่น โพรลีน (proline) (Bradbury et al. 2008) ซึ่งปริมาณโพรลีนนั้นมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง และยีนที่ควบคุมปริมาณโพรลีนก็อาจมีผลต่อระดับความหอมในแตงกวา และนอกวิธีการสร้างสาร 2AP ที่เสนอโดย Bradbury et al. (2008) แล้วยังมีวิธีการสร้าง 2AP ที่เสนอขึ้นอีก 2 วิธี โดย Huang et al. (2008) และ Wu et al. (2009) ซึ่งเอนไซม์ *BADH* ไม่มีความเกี่ยวข้องกับทั้ง 2 วิธีหลังนี้ Huang et al. (2008) แสดงให้เห็นว่า ในข้าว เอนไซม์ Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid synthetase (*P5CS*) อาจทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ methylglyoxal (*MG*) แล้วทำให้เกิดการสร้าง 2AP ขึ้น ในขณะที่ Wu et al. (2009) แสดงให้เห็นว่า ในถั่วเหลือง เอนไซม์ *P5CS* อาจเสื่อมสภาพกลายเป็น 1-pyrroline และทำปฏิกิริยากับ *MG* แล้วทำให้เกิดการสร้าง 2AP ขึ้นมาได้ ดังนั้น ยีนที่ควบคุมการสร้างและอาจมีผลต่อระดับของเอนไซม์ *PC5S* และ *MG* อาจเกี่ยวข้องกับกลิ่นหอมในแตงกวาด้วย ซึ่งการทำแผนที่ยีนที่ควบคุมความหอมในข้าว พบว่า นอกเหนือจากยีน *BADH2* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 แล้ว ยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 3, 4 และ 12 ก็มีอิทธิพลต่อระดับความหอมด้วย ถึงแม้อิทธิพลของยีนทั้งสามนี้จะน้อยกว่ายีน *BADH2* (Amarawathi et al. 2008; Lorieux et al. 1996)

แม้กลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาจะถูกควบคุมด้วยเพียงด้อย 1 ตำแหน่ง และการประเมินกลิ่นหอมสามารถทำได้โดยการดม แต่การปรับปรุงลักษณะดังกล่าวโดยการผสมกลับ จะต้องเสียเวลาในการผสมตัวเอง เพื่อผสมกลับในแต่ละครั้ง การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection; *MAS*) ต้นที่มียีนความหอมในแตงกวาสามารถช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด “functional marker” สามารถใช้ช่วยคัดเลือกพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากเครื่องหมายจะสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้องการคัดเลือกอย่างสมบูรณ์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ *SNAP* ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *BADH* ในแตงกวาในโครงการนี้จึงมีประโยชน์ยิ่งในการใช้คัดเลือกและพัฒนาแตงกวาพันธุ์ใหม่ให้มีกลิ่นหอมใบเตย โดยเครื่องหมาย *SNAP* มีข้อดี คือ ตรวจสอบได้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก และใช้ได้กับเครื่องมือทางอณูพันธุศาสตร์พื้นฐานทั่วไป

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวากลิ่นหอมใบเตย

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมใบเตย 7 พันธุ์ ร่วมกับพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม 89 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ที่มีกลิ่นหอมมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม แต่แตกต่างกันไม่มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อพิจารณาค่า allelic richness ซึ่งมีความใกล้เคียงกันมากในแตงกวาทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่า แตงกวาพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมมีความหลากหลายภายในกลุ่มในระดับใกล้เคียงกับแตงกวาทั่วไป และมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 9, 10 และ 12) อย่างไรก็ตาม พันธุ์ที่มีกลิ่นหอมที่มาจากจังหวัดเพชรบูรณ์ (PK2014T006-1, PK2014T006-2, PK2014T009 และ CS103) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ดังนั้น จึงควรมีการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมที่มีกลิ่นหอมให้มีจำนวนมากขึ้น และนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมอีกครั้ง เพื่อให้ทราบถึงแหล่งกำเนิดของแตงกวากลิ่นหอมใบเตยที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Amarawathi Y, Singh R, Singh AK, Singh VP, Mohapatra T, Sharma TR, Singh NK (2008) Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed* 21:49–65
- Arikrit S, Yoshihashi T, Wanchana S, Uyen TT, Huong NTT, Wongpornchai S, Vanavichit A (2010) Deficiency in the amino aldehyde dehydrogenase encoded by *GmAMADH2*, the homologue of rice *Os2AP*, enhances 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in soybeans (*Glycine max* L.). *Plant Biotechnol J* 9:75–87
- Arumanagathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:229–241
- AVRDC (2003) AVRDC progress report 2002. AVRDC-The World Vegetable Center, Shanhua Ayyangar GNR (1938) Studies in sorghum. *J Madras Univ* 11:131–143
- Berner DK, Hoff BJ (1986) Inheritance of scent in American long grain rice. *Crop Sci* 26:876–878
- Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin QS, Waters DLE (2005) The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnol J* 3:363–370
- Bradbury LMT, Gillies SA, Brushett DJ, Waters DLE, Henry RJ (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for the fragrance in rice. *Plant Mol Biol* 68:443–449
- Buttery RG, Ling LC, Juliano BO, Turnbaugh JG (1983) Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *J Agric Food Chem* 31:823–826
- Chen S, Yang Y, Shi W, Ji Q, He F, Zhang Z, Cheng Z, Liu X, Xu M (2008) *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *Plant Cell* 20:1850–1861
- Denney JO (1992) *Xenia* includes *metaxenia*. *Hort Sci* 27:722–728
- de Wilde WJJO, Duyfjes BEE (2010) *Cucumis sativus* L. forma *hardwickii* (Royle) W.J. de Wilde & Duyfjes and feral forma *sativus*. *Thai For Bull (BOT)* 38:98–107
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:465–469
- Díaz-Sánchez ÁG, González-Segura L, Mújica-Jiménez C, Rudiño-Piñera E, Montiel C, Martínez-Castilla LP, Muñoz-Clares RA (2012) Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine. *Plant Physiol* 158:1570–1582
- Drenkard E, Richter BG, Rozen S, Stutius LM, Angell NA, Mindrinos M, Cho RJ, Oefner

- PJ, Davis RW, Ausubel FM (2000) A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in Arabidopsis. *Plant Physiol* 124:1483–1492
- Fitzgerald TL, Waters DLE, Henry RJ (2008) The effect of salt on betaine aldehyde dehydrogenase transcript levels and 2-acetyl-1-pyrroline concentration in fragrant and non-fragrant rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci* 174:539–546
- Food and Agriculture Organization (2013) FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>. [Accessed 5 March 2014]
- Fushimi T, Masuda R (2001) 2-acetyl-1-pyrroline concentration of the vegetable soybean. In: Lumpkin T, Shanmugasundaram S (eds) *Proceeding of the 2nd international vegetable soybean conference*. Washington State University, Pullman, p 39
- Huang TC, Teng CH, Chang JL, Chuang HS, Ho CT, Wu ML (2008) Biosynthetic mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline and its relationship with Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid and methylglyoxal in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) callus. *J Agric Food Chem* 56:7399–7404
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan Lucas WJ, Wang X, Xie B, Ni P, Ren Y, Zhu H, Li J, Lin K, Jin W, Fei Z, Li G, Staub J, Kilian A, van der Vossen EAG, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z, Ren Y, Tian G, Lu Y, Ruan J, Qian W, Wang M, Huang Q, Li B, Xuan Z, Cao J, Asan WZ, Zhang J, Cai Q, Bai Y, Zhao B, Han Y, Li Y, Li X, Wang S, Shi Q, Liu S, Cho WK, Kim J, Xu Y, Heller-Uszynska K, Miao H, Cheng Z, Zhang S, Wu J, Yang Y, Kang H, Li M, Liang H, Ren X, Shi Z, Wen M, Jian M, Yang H, Zhang G, Yang Z, Chen R, Liu S, Li J, Ma L, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X, Li G, Fang L, Li Y, Liu D, Zheng H, Zhang QN, Li Z, Yang G, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H, Li S, Zhang X, Yang H, Wang J, Sun R, Zhang B, Jiang S, Wang J, Du Y, Li S (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat Genet* 41:1275–1281
- Jantaboon J, Siangliw M, Im-mark S, Jamboonsri W, Vanavichit A, Toojinda T (2011) Ideotype breeding for submergence tolerance and cooking quality by marker-assisted selection in rice. *Field Crops Res* 123: 206–213
- Juwattanasomran R, Somta P, Chankaew S, Shimizu T, Wongpornchai S, Kaga A, Srinives P (2011) A SNP in GmBADH2 gene associates with fragrance in vegetable soybean variety “Kaori” and SNAP marker development for the fragrance. *Theor Appl Genet* 122:533–541
- Juwattanasomran R, Somta P, Kaga A, Chankaew S, Shimizu T, Sorajjapinun W,

- Srinives P (2012) Identification of a new fragrance allele in soybean and development of its functional marker. *Mol Breed* 29:13–21
- Kirch HH, Schlingensiepen S, Kotchoni S, Sunkar R, Bartels D (2005) Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 57:315–332
- Kopečný D, Tylichová M, Snegaroff J, Popelková H, Šebela M (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of α -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS J* 278:3130–3139
- Kopečný D, Končítíková R, Tylichová M, Vigouroux A, Moskalíková H, Soral M, Šebela M, Moréra S (2013) Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *J Biol Chem* 288:9491–9507
- 1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172–175
- Kovach MJ, Calingacion MN, Fitzgerald SR McCough (2009) The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14444–14449
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg LA (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174–181
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25:402–408
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol Biol Rep* 12:6–13
- Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E, Ghesquiere A (1996) Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. *Theor Appl Genet* 93:1145–1151
- Mather, K (1951) The measurement of linkage in heredity. Methuen, London, UK
- Murty DS, Nicodemus KD, House LR (1982) Inheritance of basmati and dimpled seed in sorghum. *Crop Sci* 22:1080–1082
- Niu X, Tang W, Huang W, Ren G, Wang Q, Luo D, Xiao Y, Yang S, Wang F, Lu BL, Gao F, Lu T, Liu Y (2008) RNAi-directed downregulation of *OsBADH2* results in aroma (2-acetyl-1-pyrroline) production in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol* 8:100. doi:10.1186/1471-2229-8-100

- R Development Core Team (2010) A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ren Y, Zhang Z, Liu J, Staub JE, Han Y, Cheng Z, Li X, Lu J, Miao H, Kang H, Xie B, Gu X, Wang X, Du Y, Jin W, Huang S (2009) An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. PLoS ONE 4:e5795
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, pp 365–386
- Shao GN, TangA Tang SQ, Luo J, Jiao GA, Wu JL, Hu PS (2011) A new deletion mutation of fragrant gene and the development of three molecular markers for fragrance in rice. Plant Breed 130:172–176
- Shi WW, Yang Y, Chen SH, Xu ML (2008) Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. Mol Breed 22:185–192
- Somta P, Musch W, Kongsamai B, Chanprame S, Nakasathien S, Toojinda T, Sorajjapinun W, Seehaluk W, Tragoonrung S, Srinives P (2008) New microsatellite markers isolated from mungbean (*Vigna radiata*(L.) Wilczek). Mol Ecol Resour 8:1155–1157
- Sood BG, Siddiq EA (1978) A rapid technique for scent determination in rice. Indian J Genet 38:268–275
- Wanchana S (2005) Identification of genes controlling grain aroma and amylose content for positional cloning and marker-assisted selection program in rice (*Oryza sativa* L.). Ph.D. Thesis, Kasetsart University, ไทย
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2012) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics. North Carolina State University, Raleigh
- Wu ML, Chou KL, Wu CR, Chen JK, Huang TC (2009) Characterization and the possible formation mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline in aromatic vegetable soybean. J Food Sci 74:192–197
- Yundaeng C, Somta P, Tangphatsornruang S, Wongpornchai S, Srinives P (2013) Gene discovery and functional marker development for fragrance in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Theor Appl Genet 126:2897–2906

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ยีนและเอ็นไซม์ที่ควบคุมความหอมในแตงกวา

เนื่องจากโครงการค้นวิจัยนี้ค้นพบว่า การกลายพันธุ์แบบ A1855G ในยีน *BADH* ทำให้เกิดกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวา แต่ยังไม่ได้ทำการพิสูจน์อย่างชัดเจนว่ากลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้เกิดกลิ่นหอมจริง ดังนั้น การศึกษาต่อไปจึงควรที่ทำการพิสูจน์การเกิดกลิ่นหอมโดยทำให้ยีน *BADH* ในแตงกวาสูญเสียหน้าที่การทำงาน ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เช่น RNA interference เป็นต้น และควรมีการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของเอ็นไซม์ *BADH* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ Y163C ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบในแตงกวาที่มีกลิ่นหอมใบเตย อันจะทำให้ทราบได้ถึง ความสำคัญและหน้าที่ของ Y163 ในปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ *BADH*

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงกวาพันธุ์หอม

เนื่องจากจำนวนแตงกวาพันธุ์หอมที่โครงการรวบรวมได้นั้นมีจำนวนเพียง 7 พันธุ์ (ตัวอย่าง) ทำให้ผลการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้นั้น ยังไม่สามารถระบุแหล่งกำเนิดและความหลากหลายของแตงกวาหอมได้ ดังนั้น จึงควรมีการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมแตงกวาของประเทศไทยให้เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งแตงกวาพันธุ์หอม ซึ่งจำนวนแตงกวาพันธุ์หอมที่มากขึ้นน่าจะช่วยให้ได้ข้อมูลแหล่งกำเนิดของแตงกวาพันธุ์หอมได้ดีมากขึ้น และอาจทำให้พบยีนอื่นๆ ที่ควบคุมความหอมในแตงกวา หรือการกลายพันธุ์แบบอื่นๆ ในยีน *BADH* นอกเหนือจาก A1855G ที่ทำให้เกิดความหอม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์แตงกวากลิ่นหอมใบเตยในอนาคต

คำหลัก : แตงกวา, กลิ่นหอมใบเตย, ยีนความหอม, 2-acetyl-1-pyrroline, betaine aldehyde dehydrogenase,

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 Chutintorn Yundaeng, Prakrit Somta, Sithichoke Tangphatsornruang, Sompong Chankaew and Peerasak Srinives. A single base substitution in BADH/AMADH is responsible for fragrance in cucumber (*Cucumis sativus* L.), and development of SNAP markers for the fragrance. Theoretical and Applied Genetics, 2015, DOI: 10.1007/s00122-015-2554-5

1.2 Pornkamol Pramnoi, Prakrit Somta, Sompong Chankaew, Ruangchai Juwattanasomran and Srinives P. A single recessive gene controls fragrance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of Genetics, 2013, 92, 147–149

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงพาณิชย์

- บริษัท H.M.CLAUSE ได้นำพันธุ์แตงกวากลิ่นหอมใบเตยที่โครงการรวบรวมไว้จำนวน 1 พันธุ์ (accession) ไปปลูกทดสอบกลิ่นหอม การเจริญเติบโต และการปรับตัว เพื่อดูว่าอาจนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการพัฒนาพันธุ์แตงกวากลิ่นหอมของบริษัทได้หรือไม่
- บริษัท อีสท์ เวสต์ ซีด จำกัด นำพันธุ์แตงกวากลิ่นหอมใบเตยที่รวบรวมไว้จำนวน 1 พันธุ์ (accession) ไปปลูกทดสอบเปรียบเทียบกับพันธุ์พันธุ์แตงกวากลิ่นหอมใบเตยของบริษัท เพื่อดูว่าพันธุ์ของบริษัทมีระดับกลิ่นหอมใบเตยมากหรือน้อย

2.2 เชิงวิชาการ

- ผลิตินิสิตระดับปริญญาเอก 1 คน

3. อื่นๆ

ไม่มี