

## บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

แก่นตะวัน หรือ Jerusalem aitichoke (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชล้มลุก อยู่ในวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) ดอกสีเหลืองคล้ายกับทานตะวันแต่มีขนาดเล็กกว่า มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ เนื่องจากมีความสำคัญในอุตสาหกรรมน้ำตาล อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งใช้ส่วนของลำต้นใต้ดินที่สะสมอาหารไว้เป็นวัตถุดิบในการผลิต นอกจากนี้ในลำต้นของแก่นตะวันยังมีสารอินนูลิน (inulin) ซึ่งนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่ผ่านมามีการวิจัยเพื่อคัดแยกยีน lectin (Van Damme *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟรุคแตน (fructan) (var der Meer *et al.*, 1998) และได้มีการศึกษาบทบาทของเอนไซม์ Polyphenol oxidase ในแก่นตะวัน (Ziyan and Pekyardimci, 2001) จากความเป็นพืชที่มีคุณสมบัติช่นน้ำมันทั้งยังเป็นพืชที่มีความสามารถอยู่รอดสูงกว่าพืชเศรษฐกิจทั่วไป สามารถเติบโตได้ดีในเกือบทุกภูมิภาคตั้งแต่เขตหนาว เขตอบอุ่น จนถึงเขตร้อน ช่วงสองถึงสามปีที่ผ่านมายังไม่พบอุปสรรคในการปลูกแก่นตะวันในประเทศไทยมากนัก เนื่องจากความทนทานต่อสภาพแวดล้อมของพืชและเป็นการปลูกในพื้นที่เปิดใหม่ทำให้มีศัตรูพืชเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามในกรณีพื้นที่ที่มีการปลูกแก่นตะวันมาต่อเนื่อง เช่น สหรัฐอเมริกา ยุโรป และญี่ปุ่น ก็เริ่มมีรายงานการคุกคามจากศัตรูพืชมากขึ้นตามลำดับ จากรายงานศัตรูแก่นตะวันที่มีการสำรวจพบถึงปัจจุบันในประเทศที่เพาะปลูกมาแล้วก่อนหน้านี้ มีโรคติดเชื้ออยู่ไม่น้อยกว่า 50 โรค (พรทิพย์, 2549) เช่น เชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิด เป็นต้นว่า *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Sclerotiorum*, *Phymatotrichum* ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตแก่นตะวันอย่างมากในประเทศ สำหรับในประเทศไทยพบว่า *S. rolfsii* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่ารากเน่าซึ่งทำให้ผลผลิตของแก่นตะวันลดลง เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายแก่นตะวันได้ทั้งส่วนหัวและลำต้น และยังติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ทำให้ผลผลิตเสียหายและทำให้มีการแพร่ระบาดในฤดูปลูกถัดไป โดย Maccarter (1983) ได้รายงานว่าความเสียหายเนื่องจากเชื้อ *S. rolfsii* ทำให้ผลผลิตแก่นตะวันลดลง 60%

การเพิ่มศักยภาพในการต้านทานหรือทนทานต่อศัตรูพืชอาจทำได้หลายวิธี ซึ่งล้วนแต่เป็นการนำยีนซึ่งต้านทานต่อโรคได้จากพืชหนึ่งไปสู่อีกพืชหนึ่ง ความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมของพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากพบว่า ทานตะวันซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกับแก่นตะวันก็ไม่มีสายพันธุ์ใดที่ต้านทานต่อเชื้อ *Sclerotina* ได้อย่างสมบูรณ์ การทดลองของ Gulya (1985) ได้ทดสอบทานตะวันจำนวน 750 หมายเลข รวมทั้งพันธุ์การค้าจาก 35 ประเทศทั่วโลก

พบว่า ไม่มีจีโนมไทป์ใดที่ต้านทานต่อโรคได้ มีเพียงแค่ inbred lines และ wild species ของ *Helianthus annuus* เท่านั้นที่สามารถต้านทานโรคได้ในระดับหนึ่ง wild species ของ *Helianthus* เป็นฐานพันธุกรรมที่ดีสำหรับยีนที่สามารถต้านทานโรคได้ในระดับต่างๆ (Skoric *et al.*, 1995) การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวันให้เหมาะสมกับการปลูกและการผลิตในประเทศไทย จึงควรมีการนำเทคโนโลยีที่เหมาะสมมาใช้ประโยชน์ร่วมกับการศึกษาเชื้อพันธุกรรมจำนวนมาก ซึ่งน่าจะช่วยให้เกษตรกรและประเทศโดยรวมได้รับประโยชน์สูงสุดในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1.1 เพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของแก่นตะวันในแหล่งเชื้อพันธุกรรมที่รวบรวมไว้
- 2.1.2 หาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อพ่อและแม่พันธุ์แก่นตะวันที่มีความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าต่างกัน
- 2.1.3 เพื่อหาศักยภาพของเครื่องหมายช่วยคัดเลือกในการเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่า

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ทราบข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคของแก่นตะวันในแหล่งเชื้อพันธุกรรม
- 1.3.2 เป็นองค์ความรู้ที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวันให้ต้านทานโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปได้ในอนาคต

## 1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะใช้แก่นตะวันที่มีแหล่งที่มาจากประเทศรัสเซีย ได้แก่ สายพันธุ์ CN052867 กับ HEL65 ประเทศแคนาดา ได้แก่ สายพันธุ์ JA6 กับ JA37 ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ สายพันธุ์ HEL278 กับ HEL280 ประเทศฝรั่งเศส ได้แก่ สายพันธุ์ JA89 กับ JA98 สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ได้แก่ สายพันธุ์ JA102 ประเทศโปแลนด์ ได้แก่ สายพันธุ์ HEL293 และสายพันธุ์ HEL246, HEL257 และ HEL286 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทราบแหล่งที่มาซึ่งได้จากแหล่งเก็บรวบรวมพันธุกรรมประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

## 1.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการกลาง 2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แก่นตะวัน หรือ Jerusalem artichoke มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. เป็นพืชในสกุล *Helianthus* เช่นเดียวกับทานตะวัน อยู่ในวงศ์ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดจากทวีปอเมริกาเหนือ สามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพอากาศเขตร้อน มีความแข็งแรงทนทาน แก่นตะวันในประเทศไทยยังมีชื่อเรียกอื่นๆ อีก เช่น หัวบัวตองหรือมันทานตะวัน เป็นต้น ปัจจุบันมีการปลูกทั่วไปในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา ฝรั่งเศส รัสเซีย จีนตอนเหนือ ประเทศในแถบแอฟริกากลางและทางตอนใต้ของทวีปออสเตรเลีย (Vervelde, 1996) แก่นตะวันเป็นพืชล้มลุก อายุสั้นประมาณ 90 ถึง 120 วัน มีลำต้นสะสมอาหารใต้ดิน ต้นสูงประมาณ 1.5 ถึง 3 เมตร มีขนคล้ายหนามกระจายทั่วลำต้นและใบ ลักษณะของดอกคล้ายดอกบัวตอง (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) แก่นตะวันเป็นพืชหัวซึ่งสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปของอินนูลิน ประมาณ 15-18% สารอินนูลินเป็นน้ำตาลฟรุคโตสต่อกันเป็นโมเลกุลยาว (Suzuki, 1993) มีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ยาก ส่งผลให้ไม่รู้สึกหิว รับประทานอาหารได้ไม่มาก ทำให้น้ำตาลในเลือดไม่สูงเกินไป จึงเป็นการช่วยลดไขมันในเลือดและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานและโรคหัวใจ (Coussemant, 1992) มีการนำส่วนของลำต้นสะสมอาหารของแก่นตะวันไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลที่มีความหวานสูง (high fructose syrup) อุตสาหกรรมอาหารและยา การผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ใช้เป็นอาหารเสริมชีวนะช่วยลดการใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะลูกสัตว์ซึ่งจะกระตุ้นการเจริญเติบโต และเสริมประสิทธิภาพในการผลิตสัตว์ (Gibson *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลอีกด้วย (Cosgrove *et al.*, 1991)

### 2.1 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

การศึกษาความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของพืชอาจใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) เครื่องหมายทางชีวเคมี (Biochemical marker) และเครื่องหมายระดับโมเลกุล (Molecular marker) ซึ่งเครื่องหมายระดับโมเลกุลที่จำเพาะต่อลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจมีความสำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะตามที่ต้องการ เครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction) มีหลายเทคนิค อาทิเช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Wangsomnuk *et al.*, 2011) amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Panguluri *et al.*, 2006) simple sequence repeat (SSR) (Liu *et al.*, 2007) inter simple sequence repeat (ISSR) (Okun *et al.*, 2008)

และ (SRAP) (Li and Quiros, 2001; คลรัชต์ สุดหล้า, 2554) โดยแต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป การเลือกใช้เทคนิคใดก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษา

เครื่องหมายโมเลกุล TRAP พัฒนาขึ้นในปี 2003 โดย Hu และ Vick โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ชนิดแรกออกแบบจากข้อมูลลำดับเบสของยีนในฐานะข้อมูลกับไพรเมอร์ชนิดที่สองเป็นลำดับเบสแบบสุ่ม ซึ่งออกแบบโดยวิธีเดียวกับไพรเมอร์ที่ใช้กับเครื่องหมายโมเลกุล SRAP ของ Li และ Quiros (2001) เครื่องหมายโมเลกุล TRAP สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะเป็นผลผลิตจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทั้งสองไพรเมอร์ หรือไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนและอีกไพรเมอร์หนึ่งเป็นแบบสุ่ม หรือเป็นไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งสองชนิด ที่ผ่านมาได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุล TRAP มาใช้ในการศึกษาพืชต่างๆ เช่น ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.), ถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.), อ้อย (*Saccharum* species), ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. and *Triticum turgidum* L.), ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.), และฝ้ายลูกผสม (*Gossypium hirsutum* L. × *G. barbadense* L.) Hu *et al.* (2005) ทำการจำแนกสายพันธุ์ผักกาดหอม 53 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล TRAP พบว่าปฏิกิริยา TRAP จำนวน 10 ปฏิกิริยาสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 107 แถบ และยังพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล TRAP เป็นเครื่องหมายที่มีความเที่ยงตรงค่อนข้างสูงในการจัดกลุ่มผักกาดหอมสายพันธุ์ปลูก Miklas *et al.* (2006) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล TRAP เพื่อระบุเครื่องหมายชนิดใหม่ที่เชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคในถั่ว Liu *et al.* (2005) ศึกษาข้าวสาลีโดยเปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล TRAP และ SSR พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองสามารถใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมเพื่อบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมและผลจากใช้เครื่องหมายโมเลกุล TRAP สามารถให้ข้อมูลได้มากกว่าเครื่องหมายโมเลกุล SSR ในหนึ่งปฏิกิริยา Palumbo *et al.* (2007) ทำการวิเคราะห์พืชสกุล *Pelargonium* จำนวน 46 หมายเลข รวม 9 ชนิด 22 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มสองชนิด ได้แก่ Sa12-700 (5'TTCTAGGTAATCCAACAACATTCTAGGTAATCCAACAACA3') และ Ga5-800 (5'GGAACCAAACACATGAAGAGGAACCAACACATGAAG3') กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนสามชนิด ได้แก่ QHA21B09a (5'TGTCATTCAATTCGGTGC3') และ QHF6H21L (5'ACAGGAAAGCCTGTCAC3') BEL1-like homeobox 1 protein ของ *Arabidopsis thaliana* พบว่า คู่ไพรเมอร์ w3a-700 (QHF6H21L / Sa12-700) สามารถผลิตแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมดจำนวน 148 แถบ ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ w1-700 (QHA21B09a / Sa12-700) และ w1-800 (QHA21B09a / Ga5-800) ผลิตแถบดีเอ็นเอได้จำนวน 160 แถบ เคนโดแกรมที่สร้างได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.11S โดยใช้วิธี unweighted pair group method arithmetic averages (UPGMA) มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน เท่ากับ ร้อยละ 92 สามารถจัดกลุ่ม *Pelargonium* ออกเป็น 2 กลุ่ม

## 2.2 ยีนต้านทานโรค

ความสามารถในการต้านทานโรคพืชเป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน *Avirulence* (*Avr*) กับอัลลีลของพืชที่ต้านทานโรสดังกล่าว ซึ่งก็คือ *R* locus (Dangl and Jones, 2001) ซึ่งเป็นสมมติฐาน *gene-for-gene* (Flor, 1971) มีรายงานการคัดแยกและวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถต้านทานโรคในพืชหลายชนิด เช่น *Rubus idaeus* L. และพืชในวงศ์ *Rosaceae* (Samuelian *et al.*, 2008) กาแฟ (McFadden *et al.*, 2006) *Prunus armeniaca* L. (Soriano *et al.*, 2005) สตรอเบอร์รี่ (Martinez Zamora *et al.*, 2004) แอปเปิ้ล (Lee *et al.*, 2003) *Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don. (Liu and Ekramoddoullah, 2003) ทานตะวัน (Bouzidi, 2002) กาแฟ (Noir, 2001) ข้าวบาเลย์ (Collins *et al.*, 2001; Mammadov *et al.*, 2005) และข้าวสาลี (Dilbirligi and Gill, 2003) เป็นต้น ซึ่งการแสดงออกของยีนในกลุ่มดังกล่าวในระดับทรานสเลชันทำให้ได้โปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันซึ่งทำให้เกิดสมมติฐานว่า มีกลไกที่พบในพืชทุกชนิดร่วมกันในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (Baker *et al.*, 1997) ยีนต้านทานโรคส่วนมากเป็นรหัสของโปรตีนซึ่งมีโดเมน (domain) ที่อนุรักษ์ไว้ ได้แก่ Nucleotide-Binding-Site-Repeat (NBS) และ leucine rich repeat (LRR) ในบริเวณปลายด้านอะมิโนและด้านคาร์บอกซิล ตามลำดับ (Cannon and Young, 2003) โดยมีโปรตีนที่จัดเป็นกลุ่มย่อยของโปรตีน NBS-LRR ซึ่งมีโดเมนที่คล้ายกับ *Toll* and interleukin 1 receptor (TIF; Hammond-Kosack and Jones, 1997) ของแมลงหวี่ สำหรับในพืชเรียกว่า TIR คาดว่าโมทีฟ (motif) นี้เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ โปรตีนในกลุ่ม TIR-NBS-LRR พบเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่ ทั้งนี้มีรายงานว่า พบโดเมนที่หลายหลายที่มีขนาดเล็ก เช่น P-loop (kinase-1a) kinase-2 (Saraste *et al.*, 1990) kinase-3a และ Gly-Leu-Pro-Leu (GLPL) ภายในโดเมน NBS ของโปรตีนที่ต้านทานโรค

จากการคัดแยกยีนโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในโดเมนต่างๆของยีนต้านทานโรค ทำให้สามารถคัดแยกยีนในกลุ่มต่างๆออกมาจากจีโนมของพืชชนิดต่างๆได้ ช่วยให้การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและการวางยีนบนตำแหน่งต่างๆของโครโมโซมเป็นไปได้ ในปัจจุบันนี้มีรายงานว่ายีนต้านทานโรคมักจะอยู่เป็นกลุ่มบนโครโมโซมของพืชชนิดต่างๆ สำหรับในพืชที่ไม่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมรวมถึงจีโนมพืชที่มีขนาดใหญ่มาก เช่น ทานตะวันซึ่งจีโนมมีขนาดประมาณ 3,500 Mbp ก็มีตัวอย่างงานวิจัยในกลุ่มยีนดังกล่าว เช่น การศึกษาของ Radwan *et al.* (2008) ซึ่งวิเคราะห์ Expressed Sequence Tags (ESTs) ของทานตะวันจาก Compositae Genome Database (CGPdb; <http://compgenomics.ucdavis.edu/>) ทำการวิเคราะห์และจัดกลุ่มของยีน NBS-LRR ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ได้แก่ TIR-NBS-LRR และ non-TIR-NBS-LRR โดยพบว่าประมาณ 1

ใน 4 ของยีนดังกล่าวมีโพลิมอร์ฟิซึมเมื่อศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุล insertion-deletion (INDEL) หรือ single-strand conformational polymorphism (SSCP) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับยีน NBS-LRR จำนวน 758 หมายเลข ซึ่งเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันออกไปและนำยีนเพียง 69 หมายเลขมาจัดกลุ่มร่วมกับยีนจาก lettuce พบว่าสามารถแยกยีนของทานตะวันออกได้ 14 กลุ่ม การศึกษาของ Samuelian *et al.* (2008) ได้คัดแยกจีโนมิกโคลน (genomic clone) ของยีนต้านทานโรค NBS-LRR จาก *Rubus idaeus* L. โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ ที่ออกแบบจาก P-loop ของ *Rubus idaeus* L และไพรเมอร์จาก lettuce (Shen *et al.*, 1998; Baldi *et al.*, 2004; Lee and Lee, 2003) พบว่า โคลนที่คัดแยกได้จากไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NBS-LRR และสามารถแยกยีนที่เป็น NBS-LRR ซึ่งมีขนาด 197 ถึง 702 คู่เบส ซึ่งพบว่าเมื่อนำยีนดังกล่าวมาวิเคราะห์หาโพลิมอร์ฟิซึมพ่อแม่พันธุ์รุ่น F<sub>1</sub> ของประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่ยีนในการคัดเลือกหา QTL ที่สัมพันธ์กับการต้านทานต่อเชื้อ *P. fragariae* var *rubi* พบแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ เมื่อนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้ได้โพลิมอร์ฟิซึมในยีนต้านทานโรค ที่มี NBS-LRR จำนวน 7 ยีน ได้นำเครื่องหมายโมเลกุล CAPS ดังกล่าวไปใช้ในการวางแผนที่ยีน นอกจากนั้น Samuelian *et al.* (2008) ยังได้นำโปรตีน NBS-LRR จากพืชอื่นในวงศ์ Rosaceae ที่ได้มีการตีพิมพ์แล้วจาก GenBank มาวิเคราะห์ร่วม 75 ยีนของ *Rubus idaeus* L. ด้วย

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา

แก่นตะวันที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้มีจำนวน 13 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ของแก่นตะวันที่ใช้ในงานวิจัย

Line	Germplasm collection	Country origin
CN052867	Plant Gene Resource of Canada	Russian Federation
JA-6	Plant Gene Resource of Canada	Canada
JA-37	Plant Gene Resource of Canada	Canada
JA-89	Plant Gene Resource of Canada	France
JA-98	Plant Gene Resource of Canada	France
JA-102	Plant Gene Resource of Canada	Germany
HEL65	Gatersleben Genebank, Germany	Russian Federation
HEL246	Gatersleben Genebank, Germany	Unknown
HEL257	Gatersleben Genebank, Germany	Unknown
HEL278	Gatersleben Genebank, Germany	USA
HEL280	Gatersleben Genebank, Germany	USA
HEL286	Gatersleben Genebank, Germany	Unknown
HEL293	Gatersleben Genebank, Germany	Poland

#### 3.2 การสกัดดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อแก่นตะวัน

ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบและเมล็ดแก่นตะวัน จำนวน 5 วิธี ได้แก่ (1) วิธีดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) (2) Doyle and Doyle (1990) (3) Porebski et al. (1997) (4) วิธีดัดแปลงจาก Štorchová et al. (2000) และ (5) ชุดสกัดดีเอ็นเอ E.N.Z.A. Plant DNA Kit (Omega Bio-tek, USA) จากนั้นนำวิธีที่สกัดดีเอ็นเอจากแก่นตะวันได้ดีที่สุดมาใช้ตลอดการศึกษาวิจัยนี้ จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย TE buffer (ประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์

Tris-HCl pH 8 และ 1 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8) ทำการย่อยอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase A (ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร, US biological) 0.5 ไมโครลิตร บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที

วัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ โดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) นำผลที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร

$$\text{ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้} = 50 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้เป็นตัวดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา TRAP-PCR เจือจางดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 50 นาโนกรัม สำหรับเป็นต้นแบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

### 3.3 การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันด้วยเทคนิค TRAP-PCR

ตรวจสอบหาปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 278 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ FC1(R) (ตารางที่ 3.4) กับ WNKK(F) (ตารางที่ 3.5) ในการทำปฏิกิริยา TRAP-PCR โดยเตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง ประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอต้นแบบของแก่นตะวันที่ระดับความเข้มข้น 10 25 50 75 และ 100 นาโนกรัม ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร
2. 10X buffer S ประกอบด้วย  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  ความเข้มข้น 160 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ pH 9.2 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส  $\text{MgCl}_2$  ความเข้มข้น 17.5 มิลลิโมลาร์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Triton™ X-100) ปริมาตร 1.6 ไมโครลิตร
3. dNTP mix ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร
4. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 4.32 ไมโครลิตร
5. ไพรเมอร์ WNKK (Forward) ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร
6. ไพรเมอร์ FC1 (Reverse) ความเข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร
7. Taq DNA polymerase (Vivantis) ความเข้มข้น 5 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.08 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นเหวี่ยงแบบ Quick centrifuge เพื่อรวบรวมสารละลายที่ติดอยู่ข้างหลอดและ ฝาปิด จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องพีซีอาร์ (Corbett Research, Germany) โดยกำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที

ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 นาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 5 รอบ ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 จำนวน 35 รอบ และขั้นสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ความเข้มข้น 0.5 เท่า แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis)

### 3.4 การตรวจสอบความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่่นตะวัน โดยใช้เทคนิค TRAP-PCR

ตรวจสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่่นตะวัน โดยใช้ดีเอ็นเอของแก่่นตะวันพันธุ์ HEL 278 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ FC1(R) (ตารางที่ 3.4) กับ WNKK(F) (ตารางที่ 3.5) ในการตรวจสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสม สาระละลายในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 3.3 ใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้น 1 2 3 4 หรือ 5 ไมโครโมลาร์ ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา TRAP-PCR

### 3.5 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่่นตะวัน โดยใช้เทคนิค TRAP-PCR

ตรวจสอบประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ระหว่างไพรเมอร์แบบสุ่มกับไพรเมอร์แบบจำเพาะ กับยีนโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 17 ถึง 21 คู่เบสจำนวน 10 ชนิด (ตารางที่ 3.4) กับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคในแก่่นตะวันจำนวน 9 ชนิด (ตารางที่ 3.5) โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของแก่่นตะวันเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทั้งนี้จากแก่่นตะวันจำนวน 8 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็นดีเอ็นเอรวม 2 กลุ่ม ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 สายพันธุ์ແກ່ນຕະວັນໃນແຕ່ລະຫຸດດີເອັນເອວຣາມ

ດີເອັນເອວຣາມ	ຈຳນວນສາຍພັນຮູ້ແກ່ນຕະວັນ (ສາຍພັນຮູ້)	ສາຍພັນຮູ້ແກ່ນຕະວັນໃນຫຸດດີເອັນເອວຣາມ
ຫຸດທີ່ 1	5	HEL246, HEL278, HEL280, HEL293, JA98
ຫຸດທີ່ 2	3	JA6, JA37, JA102

ตารางที่ 3.3 ໄຟຣເມຣ໌ແບບສຸ່ມອອກແບບໂດຍ Ziqin et al. (2009) ຈຳນວນ 10 ຫຸນິດ

ລຳດັບທີ່	ໄຟຣເມຣ໌	ລຳດັບເບສ (5'-->3')	Tm (°C)	Ta (°C)	CG%
1	FC1	TCAAGGGCAGGTAAGAACAA	58.4	50.0	45
2	SA7	CGCAAGACCCACCACAA	54.6	50.0	59
3	BG23	ATTCAAGGAGAGTGCCTGG	60.0	50.0	53
4	ODD20	TCGTTGTTATGGCTGGAGA	58.0	50.0	47
5	ODD4	AGGGTAGCGTCTGAGGA	58.4	50.0	59
6	BG39	AACAACAAAGACTACCTCCC	58.4	50.0	45
7	BG92	AGGTGAGTAAGTTCGGACAT	56.4	50.0	45
8	BG66	GATTTTGATTTACAGGAGAGA	56.4	50.0	30
9	BG56	GAGAAAGGTATGAGTTGAAC	56.3	50.0	40
10	BG68	AAAGGGAGACAGATATTTACA	54.8	50.0	33

ตารางที่ 3.4 ໄຟຣເມຣ໌ທີ່ຈຳພະກັບຂົນດ້ານທານໂຣດໃນແກ່ນຕະວັນ ຈຳນວນ 9 ຫຸນິດ ທີ່ໃຊ້ໃນປຸກິກິຣິຍາ TRAP-PCRs

Accession numbers	Conserved domains	Primer name
Heli_tube.EL436736	NBS	HEL436736
Heli_tube.EL438367	NBS	WNKK
Heli_tube.EL438755	NBS	WTNP
Heli_tube.EL440001	NBS	HEL440001
Heli_tube.EL444590	NBS	CAN
Heli_tube.EL446443	NBS	HEL446443
Heli_tube.EL449466	TIR	HEL449466
Heli_tube.EL455346	NBS	HEL455346
Heli_tube.EL472778	NBS	NLA

### 3.6 การสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของแก่นตะวันด้วยเทคนิค TRAP-PCR

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค TRAP-PCR โดยเตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 3.3 ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอและไพรเมอร์ชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวันจากผลการทดลองในข้อ 3.3, 3.4 และ 3.5 โดยแบ่งเป็นสองชุด การทดลอง คือ ชุดที่ 1 สังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 9 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังตารางที่ 4.2 และชุดที่ 2 เพิ่มจำนวนแก่นตะวันเป็น 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) โดยใช้คู่ไพรเมอร์จากตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วนำมาตรวจสอบผลโดยเทคนิคอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสและวิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม PhotoCaptMw (Villber Lourmat, France)

### 3.7 การวิเคราะห์พันธุกรรมของแก่นตะวันด้วยเทคนิค TRAP-PCR

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนด้านทานโรคในแก่นตะวันจากผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาดเดียวกันในทุกตัวอย่างที่ศึกษา (monomorphic DNA) นับเป็น 1 แถบเท่านั้น คำนวณจำนวนแถบและเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันตัวอย่างที่ศึกษา เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลมาจากเทคนิค TRAP-PCR โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 0 ในกรณีที่ปฏิกิริยาที่ให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่สม่ำเสมอจะไม่นำผลการทดลองมาใช้ในการวิเคราะห์คำนวณค่า PIC (Polymorphic information content) ตามวิธีของ Botstein *et al.* (1980) ซึ่งมีสมการดังนี้

$$PIC = 1 - \sum (P_{ij})^2$$
 เมื่อ  $P_{ij}$  คือ ความถี่ที่แถบดีเอ็นเอปรากฏจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แต่ละชนิด คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index, S.I.) ตามวิธีของ Nei และ Li (1979) ซึ่งมีสมการดังนี้

$$S.I. = 2n_{ab} / (n_a + n_b)$$
 เมื่อ  $n_a$  และ  $n_b$  แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ และ  $n_{ab}$  คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยใช้ Jaccard's coefficient และนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของแก่นตะวันด้วยวิธีวิเคราะห์ Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม PC-ORD 5.1 (MjM software Design, Glenden Beach, OR, USA)

### 3.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน

#### 3.8.1 การสกัดอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อของแก่นตะวัน

นำเนื้อเยื่อ ใบอ่อน ปล้อง ราก และลำต้นสะสมอาหารของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี TRIZOL Extraction (Invitrogen) ละลายอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase-free water) นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.8.2 ทำปฏิกิริยา Reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอ

ทำการสังเคราะห์ Frist strand cDNAs โดยใช้สารละลายดังต่อไปนี้

5x VILO™ Reaction Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (Invitrogen)

10x superscript enzyme mix 1 ไมโครลิตร (Invitrogen)

RNA (1.25 ไมโครกรัม) 2.5 ไมโครลิตร

DEPC- treated H<sub>2</sub>O ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร

ใช้อาร์เอ็นเอ 1.25 ไมโครกรัม, 5x VILO™ Reaction Mix 2 ไมโครลิตร และ 10x superscript enzyme mix 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase-free water) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ขึ้นต่อไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และขึ้นสุดท้ายบ่มที่ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เจือจาง Frist - strand cDNAs ด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ดีเอ็นเอส 5 เท่า เมื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

#### 3.8.3 การสังเคราะห์ second cDNAs

นำ Frist strand cDNAs ที่ได้มาทำการสังเคราะห์ให้ได้ Double strand และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยไพรเมอร์แบบจำเพาะต่อยีนด้านทานทั้ง 16 ยีน (ตารางที่ 3.5) ซึ่งออกแบบมาจากฐานข้อมูล Compositae Genome Database เป็นยีนในกลุ่มย่อย NBS-LRR, CC-NBS-LRR, TIR-NBS-LRR และ EDS1 จำนวน 5, 5, 5 และ 1 ตามลำดับโดยเตรียมสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของแก่นตะวัน 50 นาโนกรัม 10X buffer S (ประกอบด้วย 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 500 mM Tris-HCl (pH 9.2 ที่ 20°C) 17.5 mM MgCl<sub>2</sub> และ 0.1 % Triton™ X-100) (Vivantis) ปริมาตร 1.6 ไมโครลิตร dNTP mix ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 2.32 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (forward primer 2 ไมโครลิตร และ reverse primer 2 ไมโครลิตร) และ *Taq* DNA polymerase (Vivantis) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.08 ไมโครลิตร ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง Thermal cycler (Corbett Research, Germany) โดยใช้โปรแกรมดังนี้ ขึ้นแรก ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขึ้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำในขั้นที่ 2 เป็นจำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำในขั้นที่ 3 เป็นจำนวน 35 รอบ ขั้นสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาด

3.8.4 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคของแก่นตะวันในเนื้อเยื่อใบในสภาพปกติและสภาพที่ได้รับเชื้อ *Sclerotium rolfsii* บริเวณลำต้นของแก่นตะวันอายุ 22 วัน

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 ที่มีอายุ 22 วัน แบ่งต้นแก่นตะวันเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยกลุ่มทดลองจะทำการปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ที่บริเวณโคนต้นเก็บตัวอย่างใบแก่นตะวันทั้ง 2 กลุ่มทดลองไปทำการสกัดอาร์เอ็นเอหลังการปลูกเชื้อ 1 วัน จากนั้นทำการสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์ Frist-strand c DNA แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา Real – Time PCR ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ cDNAs 50 นาโนกรัม ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ชนิดละ 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ไมโครลิตร และ SYBR Green I Master Mix (Roche) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของ cDNAs มีดังนี้ ขั้นแรก ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำในขั้นที่ 2 เป็นจำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ 95 องศาเซลเซียส continuous โดยใช้ยีน *Actin* เป็นตัวควบคุมเพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน

ตารางที่ 3.5 ยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันที่ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนและการคัดแยกเครื่องหมายโมเลกุล SSR

Accession numbers	Class of R gene	SSR motif	Primer name
Heli_tube.EL436736	CC-NBS-LRR	(TGATG) <sub>2</sub>	HEL436736
Heli_tube.EL440001	NBS-LRR	(GTTAT) <sub>2</sub>	HEL440001
Heli_tube.EL440872	CC-NBS-LRR	(TCAAT) <sub>2</sub>	HEL440872
Heli_tube.EL444841	NBS-LRR	(TTGTGA) <sub>2</sub>	HEL444841
Heli_tube.EL446443	NBS-LRR	(TCCCAG) <sub>2</sub>	HEL446443
Heli_tube.EL447036	TIR-NBS-LRR	(AGCTT) <sub>2</sub>	HEL447036
Heli_tube.EL449110	EDS1	(AAAGC) <sub>2</sub>	HEL449110
Heli_tube.EL449466	TIR-NBS-LRR	(GATACT) <sub>2</sub>	HEL449466
Heli_tube.EL450929	TIR-NBS-LRR	(ACA) <sub>4</sub>	HEL450929
Heli_tube.EL451666	CC-NBS-LRR	(TCAGAT) <sub>2</sub>	HEL451666
Heli_tube.EL453765	TIR-NBS-LRR	(AAAAT) <sub>2</sub>	HEL453765
Heli_tube.EL454403	NBS-LRR	(CACCA) <sub>2</sub>	HEL454403
Heli_tube.EL455346	CC-NBS-LRR	(ATGAT) <sub>2</sub>	HEL455346
Heli_tube.EL457326	NBS-LRR	(GACAT) <sub>2</sub>	HEL455346
Heli_tube.EL465866	TIR-NBS-LRR	(TATTT) <sub>2</sub>	HEL465866
Heli_tube.EL471160	TIR-NBS-LRR	(TATTT) <sub>2</sub>	HEL471160

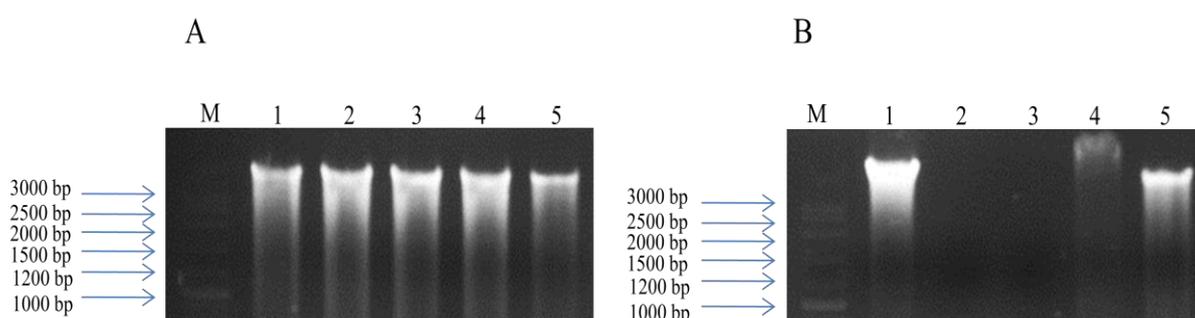
## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัดดีเอ็นเอจากใบและเมล็ดแก่ต้นตะวัน

การศึกษาพันธุกรรมจำเป็นต้องเริ่มต้นจากดีเอ็นเอที่มีอยู่ในจีโนมของแก่ต้นตะวัน ซึ่ง Seiler and Brothers (1999) ได้รายงานไว้ว่า เนื้อเยื่อแก่ต้นตะวันมีสาร โพลีแซคคาไรด์ สารประกอบฟีนอลิก แทนนินและสารทุติยภูมิอยู่ในปริมาณมาก ในเมล็ดแก่ต้นตะวันมีลิปิดอยู่ถึง 49% ถึงแม้จะพบว่ามีรายงานวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชหลากหลายวิธี แต่การสกัดดีเอ็นเอให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณสำหรับพืชแต่ละชนิดนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อความสำเร็จของงานวิจัยในลำดับต่อไป องค์ความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาระดับโมเลกุลและพันธุศาสตร์ของแก่ต้นตะวันที่พบจากผลงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์ยังมีอยู่จำนวนน้อย ในการสร้างแก่ต้นตะวันพันธุ์ใหม่จำเป็นต้องวิเคราะห์พันธุกรรมของแก่ต้นตะวันในแหล่งพันธุกรรมที่รวบรวมไว้ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น การคัดเลือกและสร้างลูกผสมรุ่น F1 ที่มีลักษณะดีเด่นกว่าพ่อแม่พันธุ์ การชักนำให้เมล็ด F1 งอก การตรวจสอบเมล็ดลูกผสมรุ่นที่ 1 การสร้าง seed tuber เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต้นลูกผสมรุ่นที่ 1 ตลอดจนการเก็บรักษาต้นพันธุ์ล้วนแต่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์แก่ต้นตะวันทั้งสิ้น

งานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนและเมล็ดของแก่ต้นตะวัน เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณมากพอสำหรับการวิจัย โดยใช้การสกัดดีเอ็นเอจำนวน 5 วิธี ได้แก่ (1) ดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) (2) CTAB DNA extraction methods (3) Modified CTAB with high NaCl concentration (4) ดัดแปลงจาก Štorchová *et al.* (2000) และ (5) E.N.Z.A. plant DNA extraction kit พบว่า ถึงแม้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Štorchová *et al.* (2000) จะสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนแก่ต้นตะวันได้ปริมาณมากกว่าวิธีที่ดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) และ Doyle and Doyle (1990) แต่ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ยังต่ำกว่าดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองวิธีดังกล่าว วิธีของ Štorchová *et al.* (2000) ใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบของพืชสกุล *Hieracium* โดยมีการนำไปประยุกต์ใช้กับพืชในสกุล *Juncaceae* (Drábková *et al.*, 2002) เมื่อใช้วิธีของ Doyle and Doyle (1990) พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอจากใบสดแก่ต้นตะวันสายพันธุ์ JA102 ได้ 61.27 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดแก่ต้นตะวันได้ มีวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพียงสองวิธี ได้แก่ วิธีที่ดัดแปลงจาก Tai and Tanksley และชุด E.N.Z.A. plant DNA extraction kit (Omega Bio-tek, USA) ที่สามารถใช้เพื่อสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดแก่ต้นตะวันได้ ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบและเมล็ดแก่ต้นตะวันด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) ซึ่งเป็นวิธีที่ Tai and Tanksley (1990) ได้ใช้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของพืชเป็นวิธีที่สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอจากแก่ต้นตะวันได้ดีโดยที่มีทั้งคุณภาพและปริมาณดีกว่าผลที่ได้

จากการใช้วิธีอื่นๆที่ได้ทดสอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบสดของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 102 และเมล็ดแก่นตะวันสายพันธุ์ CN52867 X JA6 เฉลี่ย 63.44 และ 148.60 ไมโครกรัม ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 จึงได้ใช้วิธีดังกล่าวในการสกัดดีเอ็นเอทั้งจากใบและเมล็ดเพื่อการศึกษาต่อไป



**ภาพที่ 4.1** แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบ (A) และเมล็ด (B) ของแก่นตะวัน ด้วยวิธีการทั้ง 5 วิธี ได้แก่ (1) คัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) (2) CTAB DNA extraction methods (3) Modified CTAB with high NaCl concentration (4) คัดแปลงจาก Štorchová *et al.* (2000) และ (5) E.N.Z.A. plant DNA extraction kit

**ตารางที่ 4.1** แสดงปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 102 และเมล็ดแก่นตะวันสายพันธุ์ CN52867 X JA6

วิธีการสกัด	ใบ		เมล็ด	
	DNA Conc. (mg/g tissue) <sup>(1)</sup>	Absorption ratio (260 nm/280 nm) <sup>(1)</sup>	DNA Conc. (mg/g tissue) <sup>(1)</sup>	Absorption ratio (260 nm/280 nm) <sup>(1)</sup>
คัดแปลงจาก Tai and Tanksley	63.44 <sup>ab</sup>	1.98 <sup>a</sup>	148.60 <sup>a</sup>	1.93 <sup>a</sup>
CTAB	61.27 <sup>ab</sup>	1.96 <sup>ab</sup>	-	-
CTAB with NaCl	20.84 <sup>c</sup>	1.90 <sup>b</sup>	-	-
Modified method of Štorchová	73.37 <sup>a</sup>	1.83 <sup>c</sup>	-	-
E.N.Z.A. Plant DNA kit	53.70 <sup>b</sup>	1.79 <sup>c</sup>	56 <sup>b</sup>	1.92 <sup>b</sup>
LSD <sup>(2)</sup>	*	*	*	ns

<sup>(1)</sup> Values with different letters within column are significantly different at  $p \leq 0.05$  by LSD.

<sup>(2)</sup> \*\*, ns for significance at the  $p \leq 0.05$ ,  $p > 0.05$  probability level, respectively.

ทั้งนี้จากการตรวจสอบในโครงการ ‘ปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวันเพื่อความต้านทานต่อโรคโคนเน่า’ ของชุดโครงการ ‘การเพิ่มศักยภาพและเสถียรภาพการผลิตแก่นตะวันเพื่อการค้าและอุตสาหกรรม’ พบว่าสายพันธุ์ HEL 278 HEL 280 HEL 293 HEL 246 JA 98 เป็นพันธุ์ต้านทานโรคโคนเน่า สายพันธุ์ CN52867 มีระดับความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าได้ปานกลาง และสายพันธุ์ JA6 JA102 และ JA 37 ต้านทานโรคโคนเน่าได้ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.2)

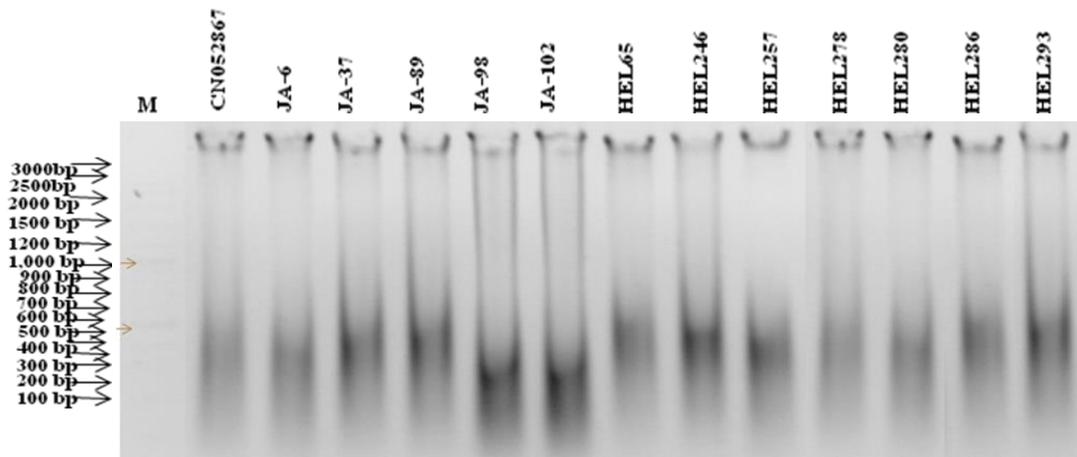
ตารางที่ 4.2 สายพันธุ์ของแก่นตะวันที่มีความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าได้ต่างกัน

ระดับความต้านทานโรค	สายพันธุ์	แหล่งที่มาของเชื้อพันธุกรรม
สูง	JA 98	Plant Gene Resources of Canada
สูง	HEL 246	Gatersleben Genebank, Germany
สูง	HEL 278	Gatersleben Genebank, Germany
สูง	HEL 280	Gatersleben Genebank, Germany
สูง	HEL 293	Gatersleben Genebank, Germany
ต่ำ	JA 37	Plant Gene Resources of Canada
ต่ำ	JA 6	Plant Gene Resources of Canada
ต่ำ	JA 102	Plant Gene Resources of Canada
ปานกลาง	CN52867	Plant Gene Resources of Canada

เมื่อทำสัคคีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของแก่นตะวันจำนวน 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) น้ำหนักสด 0.15 กรัม ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) พบว่า สามารถสัคคีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนแก่นตะวันได้ 38.4 ถึง 232.8 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักต้นอ่อน 1 กรัม (ตารางที่ 4.3) โดยมีอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ( $A_{260}$ ) นาโนเมตร กับ 280 ( $A_{280}$ ) นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 1.23 ถึง 1.80 โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีและปริมาณมากพอสำหรับใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ด้วย TRAP-PCR ต่อไป

ตารางที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร อัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  และปริมาณ จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบแก่่นตะวันจำนวน 13 สายพันธุ์

Line/Species	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	Extracted DNA/young leaf ( $\mu\text{g/g}$ )
CN052867	0.239	0.150	1.59	191.2
JA-6	0.153	0.105	1.46	122.4
JA-37	0.198	0.110	1.80	158.4
JA-89	0.195	0.119	1.64	156.0
JA-98	0.177	0.106	1.67	141.6
JA-102	0.487	0.291	1.63	232.8
HEL65	0.141	0.095	1.48	112.8
HEL246	0.149	0.094	1.59	119.2
HEL257	0.254	0.151	1.68	203.2
HEL278	0.179	0.113	1.58	143.2
HEL280	0.221	0.145	1.52	176.8
HEL286	0.048	0.039	1.23	38.4
HEL293	0.204	0.134	1.52	163.2



ภาพที่ 4.2 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบแก่่นตะวัน 13 สายพันธุ์

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder plus, Vivantis)

#### 4.2 สภาพที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันด้วยเทคนิค TRAP-PCR

การตรวจสอบสภาพที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค TRAP-PCR ในครั้งนี้ ทำการทดสอบปริมาณของดีเอ็นเอและความเข้มข้นของไพรเมอร์ พบว่าในแต่ละปฏิกิริยาที่ทดสอบ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เหมาะสมกว่าความเข้มข้น 1 2.5 7.5 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบดังกล่าวให้แถบดีเอ็นเอที่คมชัดที่สุด และไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมกว่าความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นในการศึกษาพันธุกรรมของแก่นตะวัน จึงใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 5 นาโนกรัม และไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในหนึ่งปฏิกิริยาของแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค TRAP-PCR

#### 4.3 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวันด้วยเทคนิค TRAP-PCR

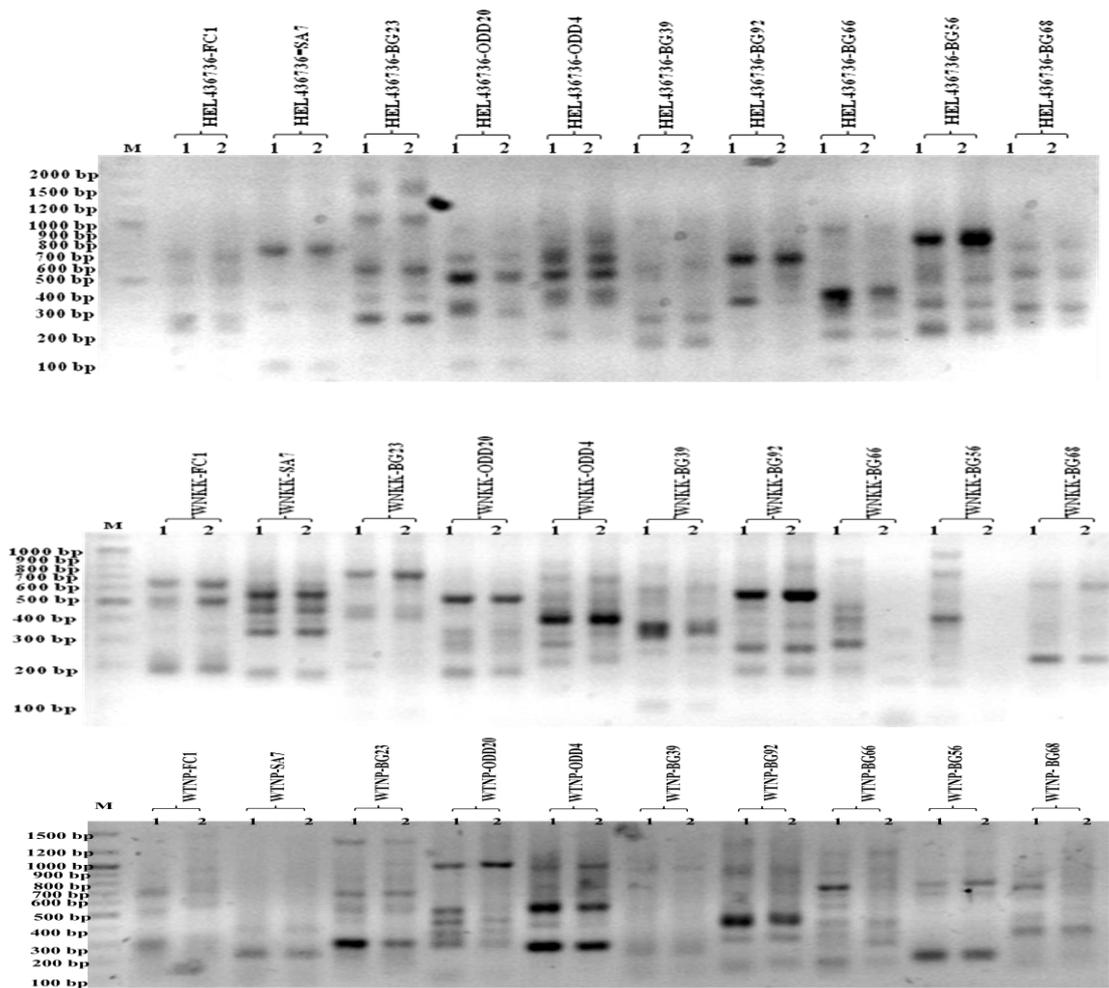
การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันด้วยเทคนิค TRAP-PCR ได้ตรวจสอบไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวัน จากการใช้คู่ไพรเมอร์ระหว่างไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 10 ชนิด และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนจำนวน 9 ชนิด พบว่าไพรเมอร์จำนวน 60 คู่ (ภาพที่ 4.3 และ 4.4) สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอรวมของสายพันธุ์แก่นตะวันทั้ง 2 ชุด ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบได้ จึงได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดและมีจำนวนมากมาใช้ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของแก่นตะวัน 13 และ 9 สายพันธุ์ (ดังตารางที่ 3.1 และ 4.2) ต่อไป (ตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของແ່ນຕະວັນ 9 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค TRAP-PCR จำนวน 16 คู่

คู่ที่	คู่ไพรเมอร์	คู่ที่	คู่ไพรเมอร์
1	HEL449466(F) กับ FC1(R)	2	HEL449466(F) กับ BG56(R)
3	HEL449466(F) กับ BG 23(R)	4	HEL449466(F) กับ BG68(R)
5	HEL449466(F) กับ ODD20(R)	6	HEL449466(F) กับ BG92(R)
7	HEL449466(F) กับ ODD4(R)	8	HEL449466(F) กับ BG66(R)
9	HEL436736(F) กับ BG92(R)	10	CAN(F) กับ BG23(R)
11	WNKK(F) กับ ODD4(R)	12	HEL455346(F) กับ FC1(R)
13	WNTP(F) กับ ODD20(R)	14	HEL446443(F) กับ BG23(R)
15	HEL40001(F) กับ BG66(R)	16	NLA(F) กับ BG39(R)

ตารางที่ 4.5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของແ່ນຕະວັນ 13 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค TRAP-PCR จำนวน 8 คู่

คู่ที่	คู่ไพรเมอร์	คู่ที่	คู่ไพรเมอร์
1	HEL436736(F) กับ BG92(R)	2	CAN(F) กับ BG23(R)
3	WNKK(F) กับ ODD4(R)	4	HEL455346(F) กับ FC1(R)
5	WNTP(F) กับ ODD20(R)	6	HEL446443(F) กับ BG23(R)
7	HEL40001(F) กับ BG66(R)	8	NLA(F) กับ BG39(R)

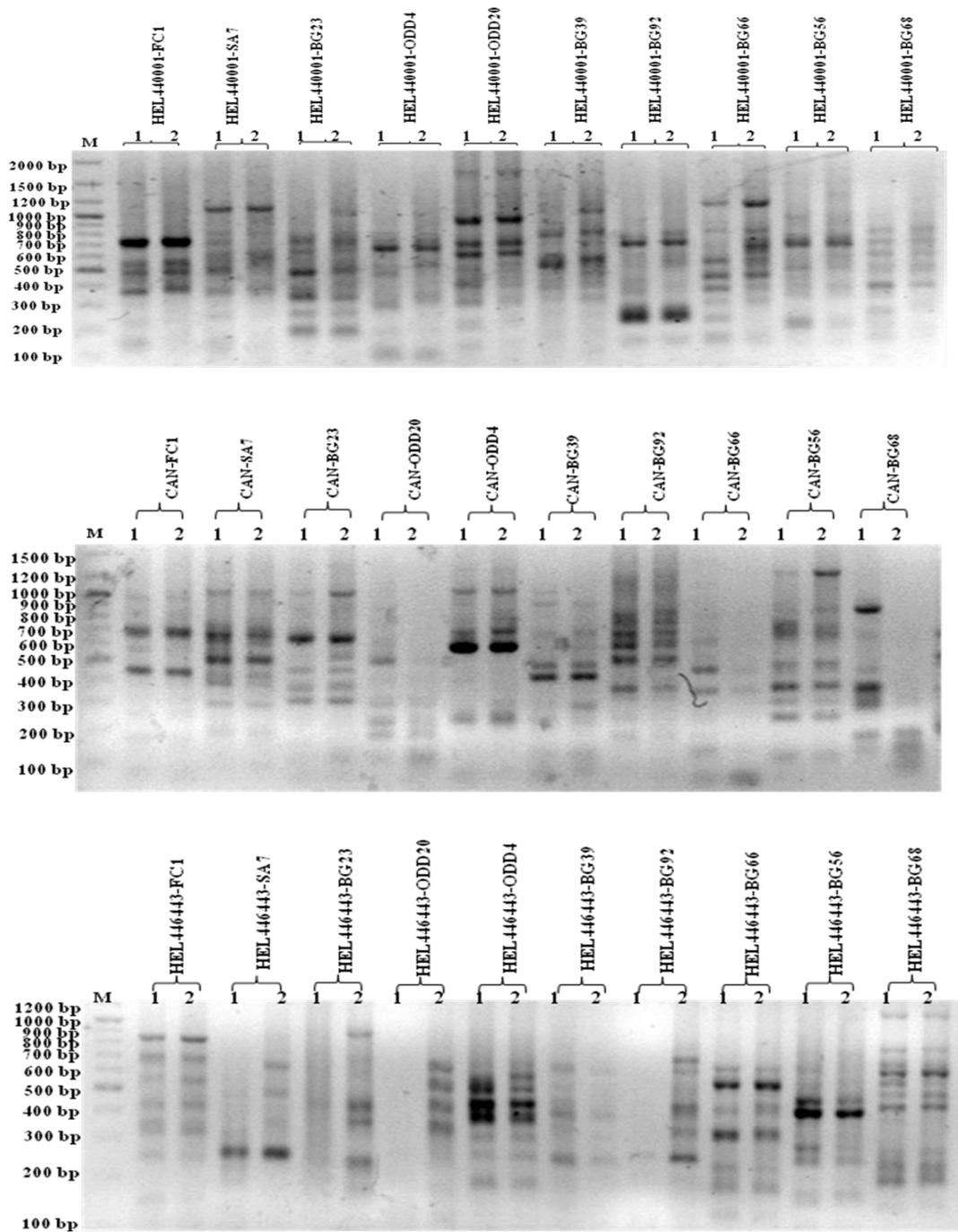


ภาพที่ 4.3 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ 60 ชนิด ที่ใช้ดีเอ็นเอรวมของแค้นตะวันทั้ง 2 ชุด (ตารางที่ 3.2)

ด้วยเทคนิค TRAP-PCR

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis)

1 และ 2 : ดีเอ็นเอรวมของสายพันธุ์แค้นตะวันชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.4 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ 60 ชนิด ที่ใช้ดีเอ็นเอรวมของแค้นตะวันตกทั้ง 2 ชุด (ตารางที่ 3.2) ด้วยเทคนิค TRAP-PCR

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis)

1 และ 2 : ดีเอ็นเอรวมของสายพันธุ์แค้นตะวันตกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

#### 4.4 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันจำนวน 13 สายพันธุ์ จากแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากเทคนิค TRAP-PCR

เมื่อนำผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) ด้วยเทคนิค TRAP-PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ จากทั้งหมด 8 คู่ (ตารางที่ 4.5) ซึ่งสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวนมากและมีความคมชัด โดยสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมดจำนวน 233 แถบ อยู่ระหว่าง 28 ถึง 43 แถบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 33.29 แถบ มีขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 104 ถึง 2,000 คู่เบส โดยคู่ไพรเมอร์ WNTP(F)/ODD20(R) และ HEL40001(F)/BG66(R) สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอมากที่สุดจำนวน 43 แถบ และคู่ไพรเมอร์ CAN(F)/BG23(R) สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้น้อยที่สุดจำนวน 28 แถบ คู่ไพรเมอร์ที่ให้ค่าโพลิมอร์ฟิกมากที่สุดคือ NLA(F)/BG39(R) คิดเป็น 96.67 เปอร์เซ็นต์ และคู่ไพรเมอร์ HEL436736(F)/BG92(R) ให้ผลผลิตที่มีค่าโพลิมอร์ฟิกน้อยที่สุดคือ 72.41 เปอร์เซ็นต์ ค่า PIC ของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากแก่นตะวันมีค่าอยู่ระหว่าง 0.96 ถึง 0.97 และพบค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์มีค่าอยู่ระหว่าง 14.15 ถึง 21.23 โดยคู่ไพรเมอร์ WNKK(F)/ODD4(R) มีค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอต่ำสุด เท่ากับ 14.15 แถบ และคู่ไพรเมอร์ HEL446443(F)/BG23(R) มีค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด เท่ากับ 21.23 แถบ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยความถี่ของอัลลีลต่อไพรเมอร์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.48 ถึง 0.70 โดยไพรเมอร์ HEL40001(F)/BG66(R) มีค่าเฉลี่ยความถี่ต่ำสุด 0.48 คิดเป็น 48 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ HEL436736(F)/BG92(R) มีค่าเฉลี่ยความถี่สูงสุด 0.70 คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6)

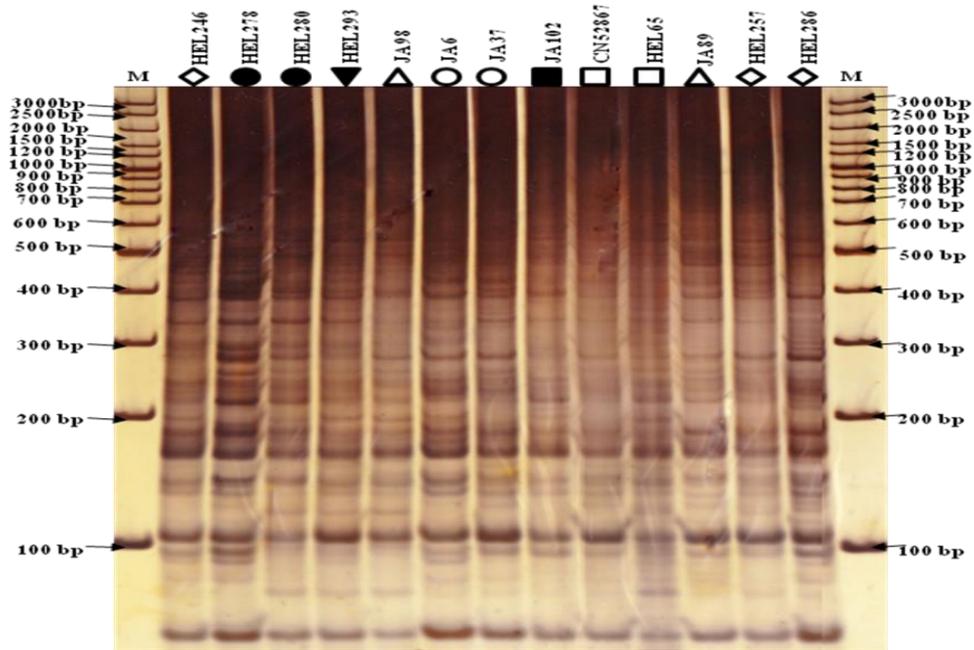
เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา TRAP-PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ มาวิเคราะห์หาค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม ดังตารางที่ 4.7 และสร้างเดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ UPGMA โดยใช้โปรแกรม PC-ORD 5.1 (ภาพที่ 4.11A) พบว่าค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างแก่นตะวัน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.65 โดยแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 ซึ่งไม่ทราบแหล่งที่มา กับ HEL293 ซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากประเทศโปแลนด์ มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงที่สุด เท่ากับ 0.65 แสดงว่าแก่นตะวันสายพันธุ์ดังกล่าวมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดในขณะที่แก่นตะวันสายพันธุ์ HEL278 จากประเทศสหรัฐอเมริกา กับ HEL65 จากประเทศรัสเซียมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยที่สุดโดยมีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.38 ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์แก่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

#### 4.5 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันจำนวน 9 สายพันธุ์ จากแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากเทคนิค TRAP-PCR

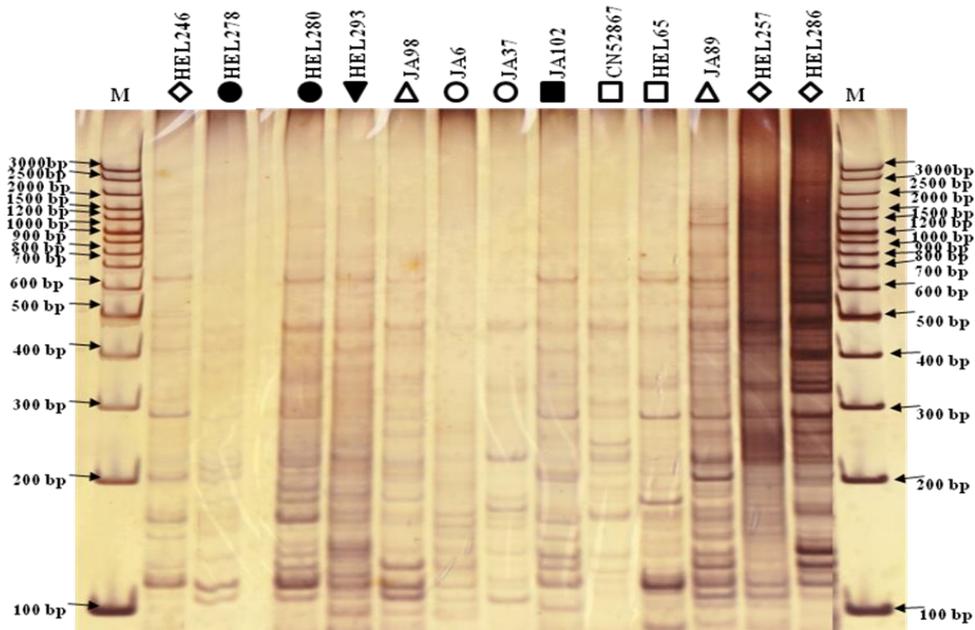
จากการทดลองเพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคในแก่นตะวัน จำนวน 9 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) ด้วยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับยีนจำนวน 9 ชนิดและยีนที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม จำนวน 10 ชนิด ด้วยเทคนิค TRAP-PCR พบว่าพบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 320 แถบ อยู่ระหว่าง 26 ถึง 43 แถบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 32.0 แถบ โดยมีขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 104 ถึง 3,000 คู่เบส โดยคู่ไพรเมอร์ WNTP(F)/ODD20(R) สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอมากที่สุดจำนวน 43 แถบ และคู่ไพรเมอร์ HEL449466(F)/BG66(R) สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้น้อยที่สุดจำนวน 26 แถบ คู่ไพรเมอร์ WNKK(F)/ODD4(R) คิดเป็นสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิกมากที่สุด คือ 96.30 เปอร์เซ็นต์ และคู่ไพรเมอร์ HEL449466(F)/BG68(R) คิดเป็นสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิกน้อยที่สุดคือ 57.14 เปอร์เซ็นต์ ค่า PIC (Polymorphic information content) ของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากแก่นตะวันมีค่าอยู่ระหว่าง 0.95 ถึง 0.97 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ และค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ (Mean band per primer) มีค่าอยู่ระหว่าง 11.78 ถึง 26.0 โดยคู่ไพรเมอร์ WNKK(F)/ODD4(R) มีค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 11.78 แถบ แสดงถึงอัลลีลโดยเฉลี่ยในแต่ละตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์นั้นๆ คู่ไพรเมอร์ HEL449466(F)/BG68(R) มีค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอมากที่สุดเท่ากับ 26.0 แถบ และจากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยความถี่ของอัลลีลต่อไพรเมอร์ (Mean band frequency per primer) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.44 ถึง 0.74 โดยไพรเมอร์ WNKK(F)/ODD4(R) มีค่าเฉลี่ยความถี่ต่ำสุด 0.44 คิดเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ และ ไพรเมอร์ HEL449466(F)/BG68(R) มีค่าเฉลี่ยความถี่สูงสุด 0.74 คิดเป็น 74 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ความถี่อัลลีล ถ้ามีค่าใกล้ 1.00 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไพรเมอร์นั้นมีอัลลีลที่เหมือนกันมาก

เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา TRAP-PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ มาวิเคราะห์หาค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (Similar matrix, S.I) ดังตารางที่ 4.6 และสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ UPGMA โดยใช้โปรแกรม PC-ORD 5.1 (ภาพที่ 4.12A) พบว่าค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างแก่นตะวัน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.45 ถึง 0.69 (ตารางที่ 4.9) โดยแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 ซึ่งไม่ทราบแหล่งที่มา กับ HEL293 ซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากประเทศโปแลนด์ มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงที่สุดเท่ากับ 0.69 ในขณะที่แก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 กับ CN52867 จากประเทศรัสเซีย มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยที่สุดโดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.45 ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแก่นตะวันทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีระดับความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าต่างกันมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

(A)



(B)



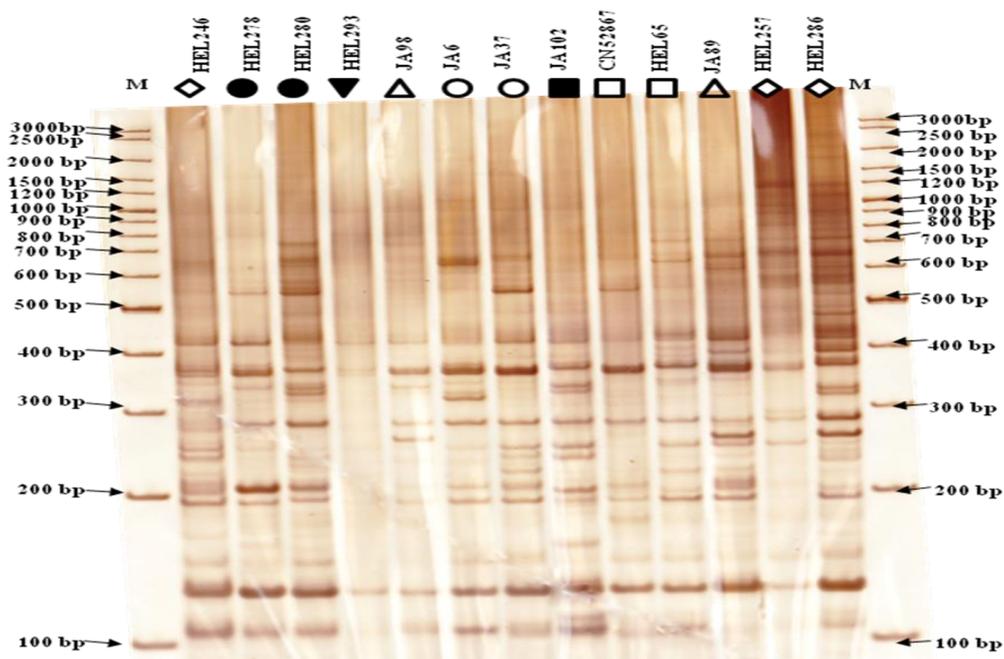
ภาพที่ 4.5 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแทมวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์

A: HEL436736(F)/BG92(R) และ B: WNKK(F)/ODD4(R)

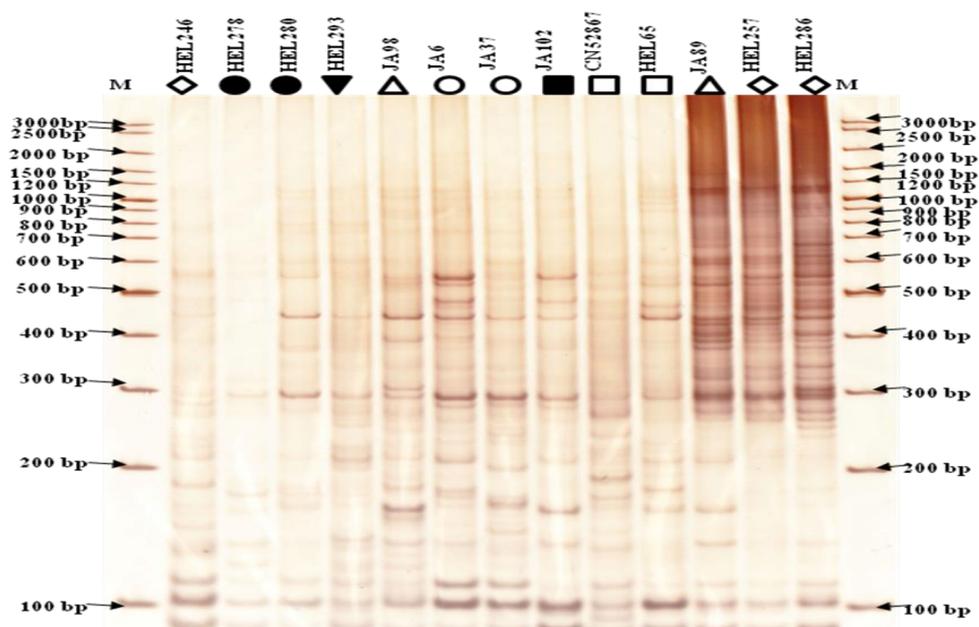
M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis) สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด:

◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △: France, ○: Canada, ■: Germany, □: USSR

(A)



(B)

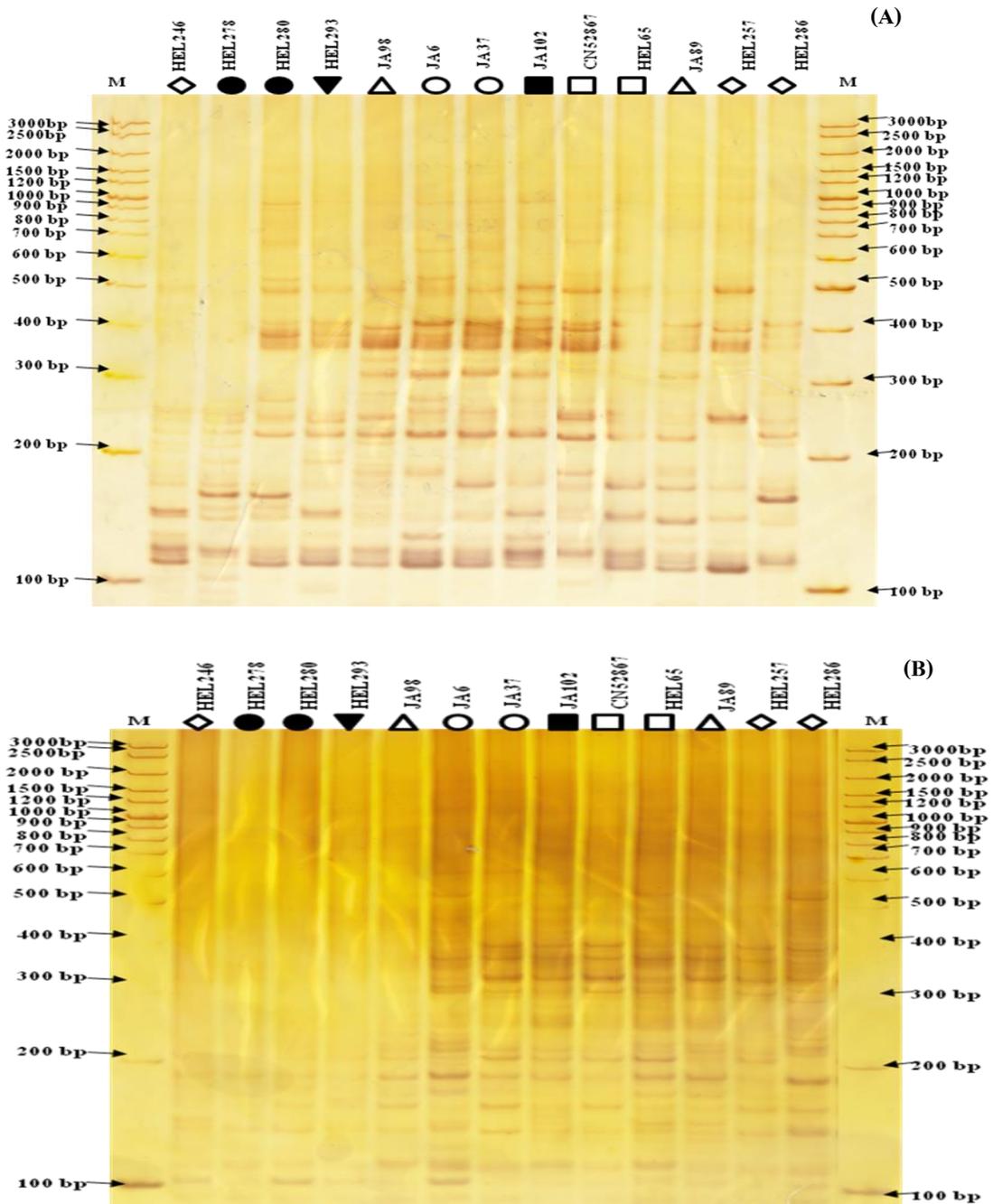


ภาพที่ 4.6 ผลการตั้งคราะหัดีเอ็นเอแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์

A: WTNP(F)/ODD20(R) และ B: HEL440001(F)/BG66(R)

M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis) สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด:

◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △: France, ○: Canada, ■: Germany, □: USSR

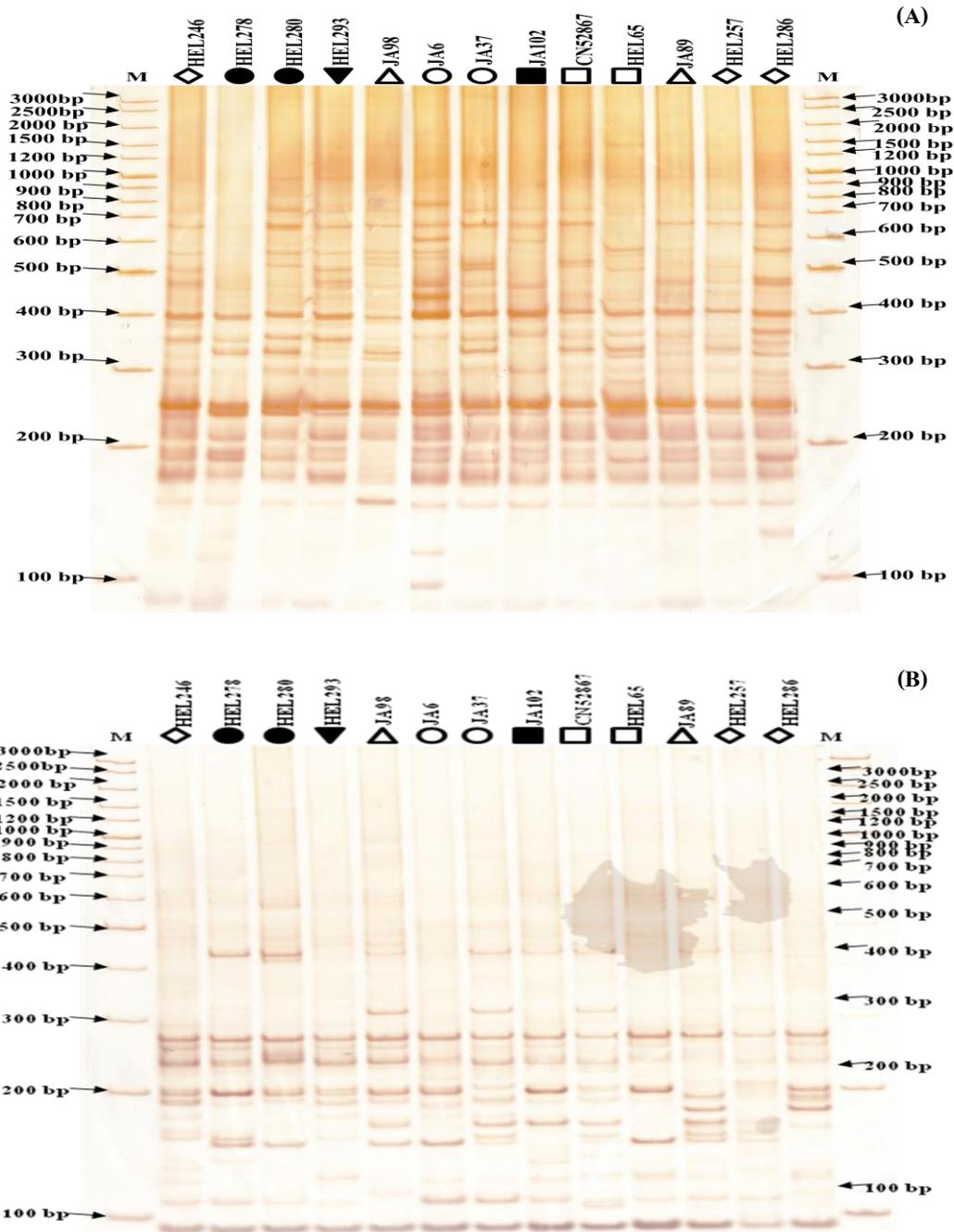


ภาพที่ 4.7 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแค้นตะวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์

A: CAN(F)/BG23(R) และ B: HEL455346(F)/FC1(R)

M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis) สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด:

◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △: France, ○: Canada, ■: Germany, □: USSR

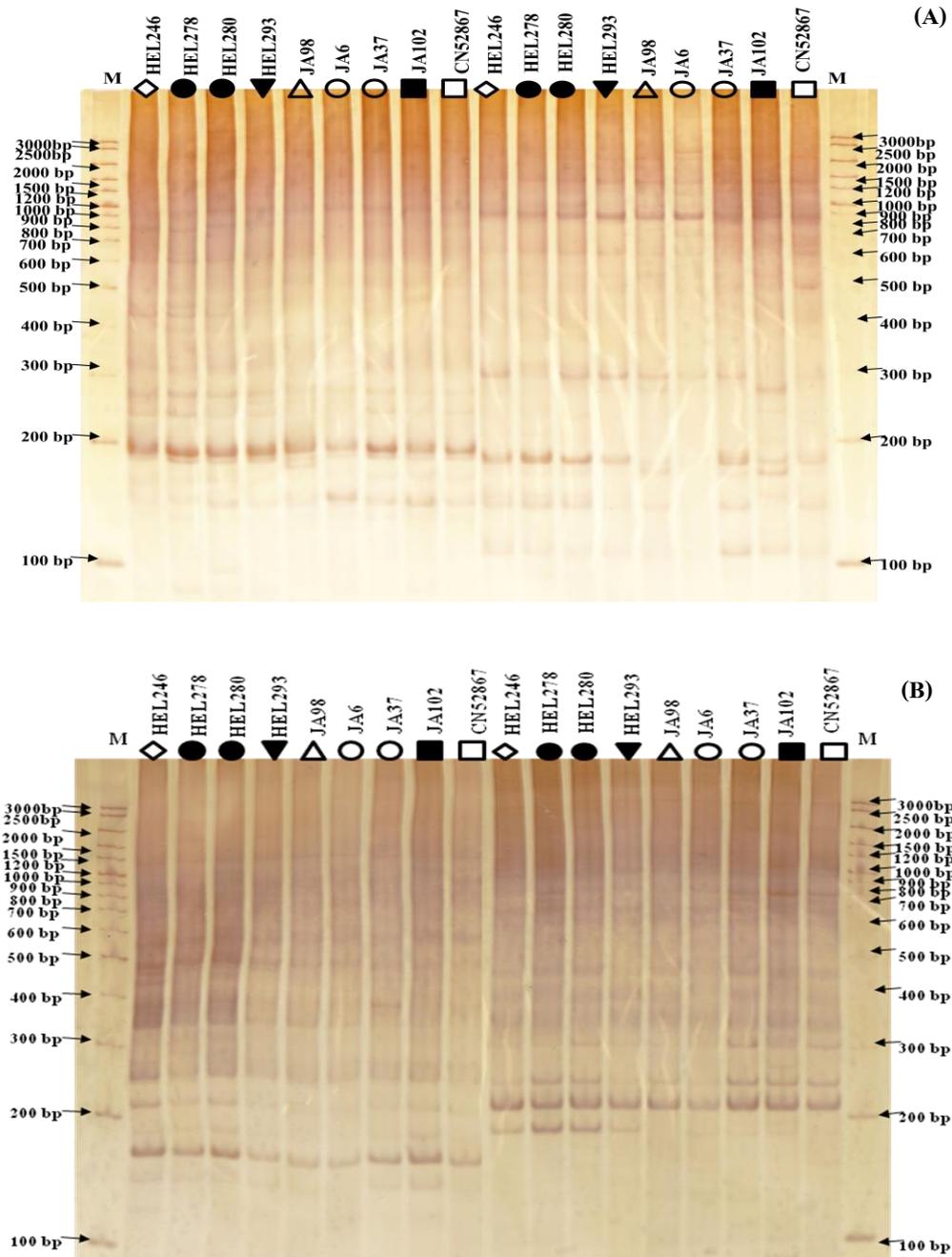


ภาพที่ 4.8 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแค้นตะวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์

A: HEL446443(F)- BG23(R) และ B: NLA(F) - BG39(R)

M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis) สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด:

◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △: France, ○: Canada, ■: Germany, □: USSR

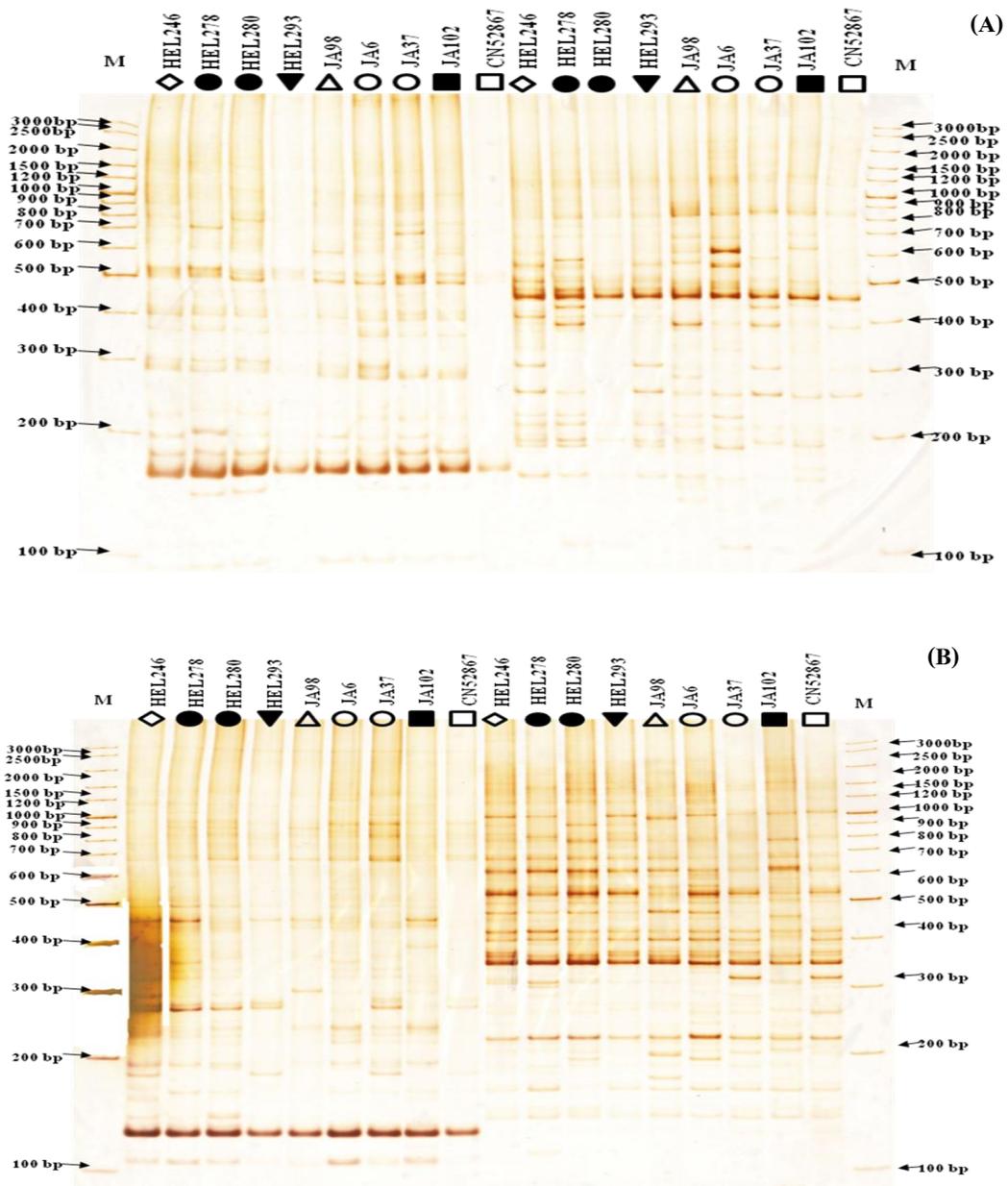


ภาพที่ 4.9 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแทมวัน 9 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์

A: HEL449466(F)/FC1(R), HEL449466(F)/BG23(R) และ B: HEL449466(F)/ODD20 (R), HEL449466(F)/ODD4(R)

M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis) สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด:

◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △ : France, ○: Canada, ■: Germany, □ : USSR

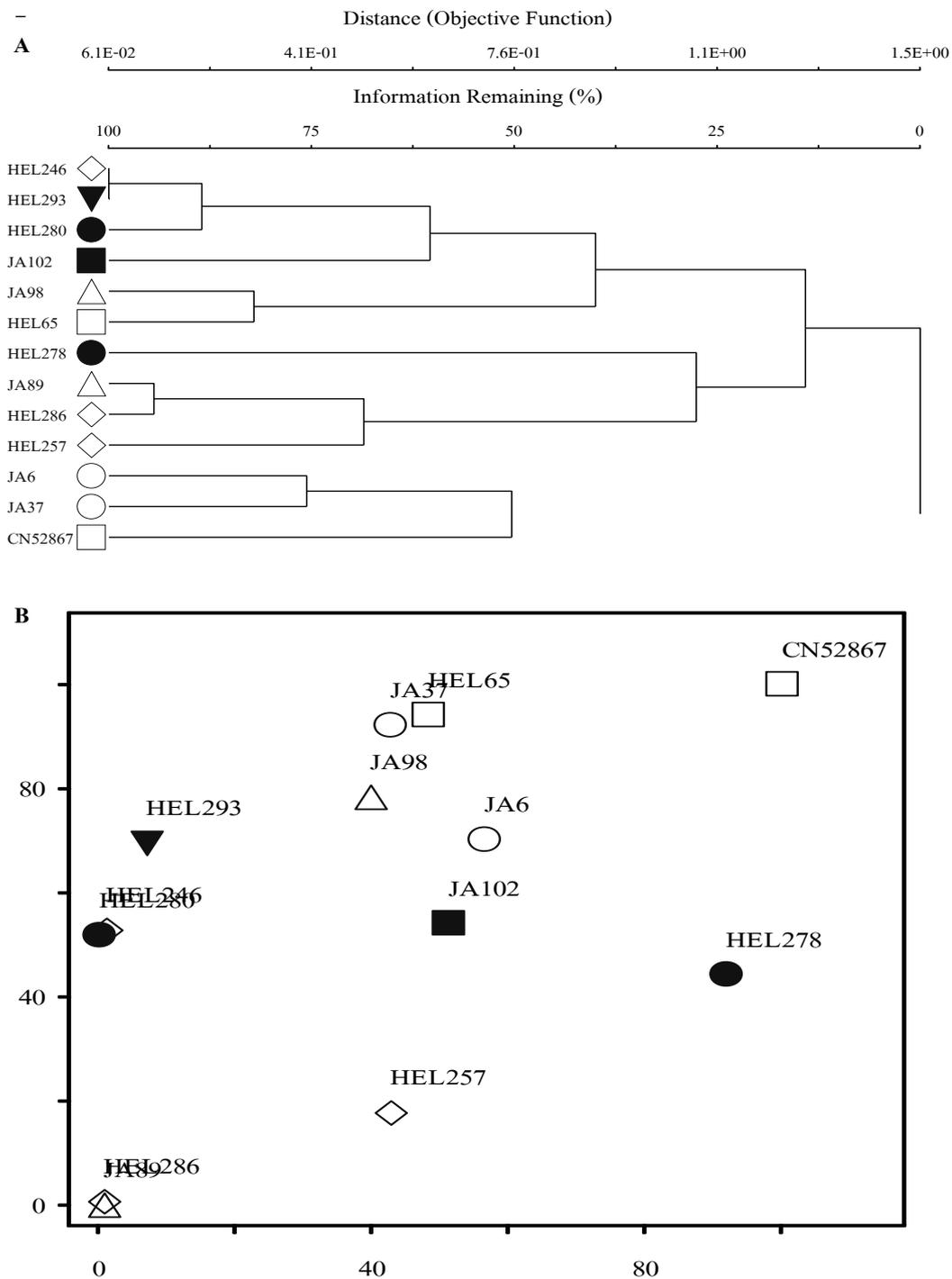


ภาพที่ 4.10 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแทมวัน 9 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์

A: HEL449466(F)/BG56, HEL449466(F)/BG68(R) และ B: HEL449466(F)/BG92(R),  
HEL449466(F)/BG66(R)

M : แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis) สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด:

◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △: France, ○: Canada, ■: Germany, □: USSR

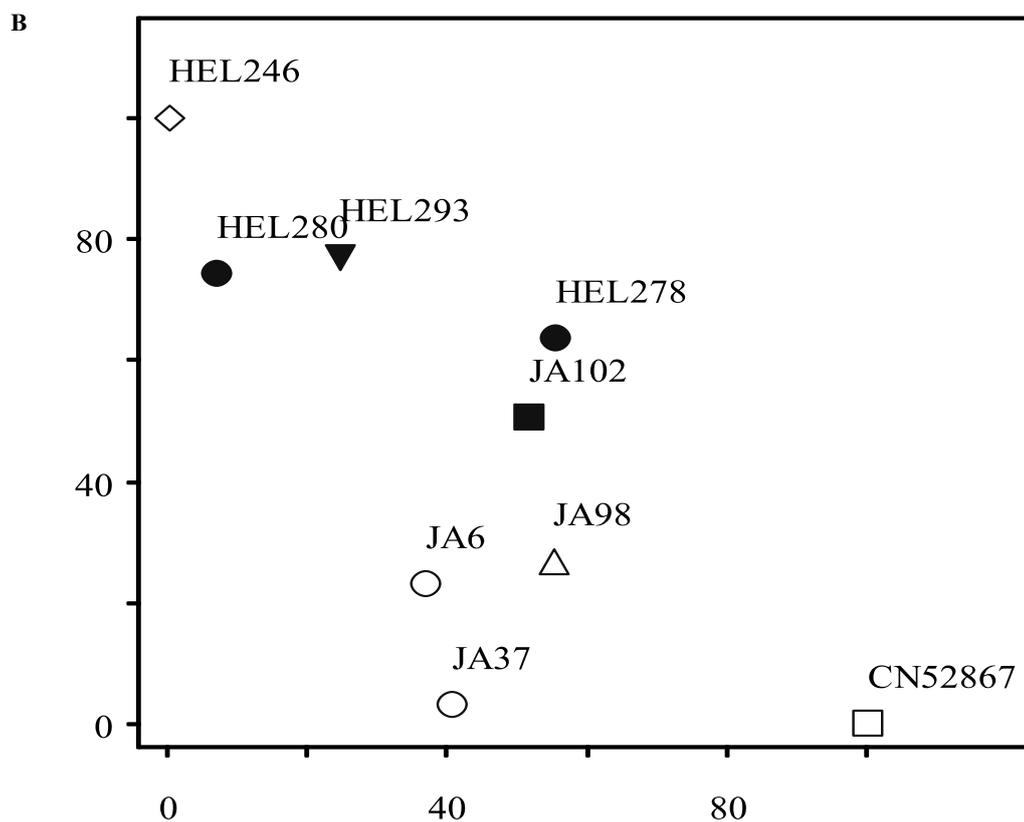
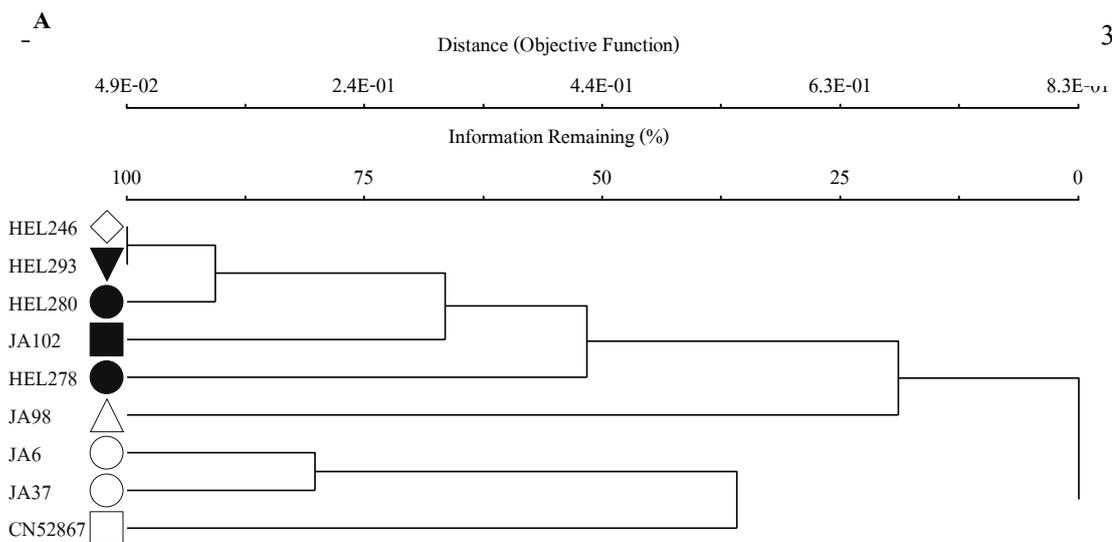


ภาพที่ 4.11 A เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 13 สายพันธุ์

B แสดงการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 13 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค TRAP-PCR

สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด: ◇ : Unknown, ● : USA, ▼ : Poland, △ : France, ○ : Canada,

■ : Germany, □ : USSR



ภาพที่ 4.12 A เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 9 สายพันธุ์

B แสดงการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 9 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค TRAP-PCR

สัญลักษณ์แทนแหล่งกำเนิด: ◇ : Unknown, ● : USA, ▼ : Poland, △ : France, ○ : Canada,

■ : Germany, □ : USSR

ตารางที่ 4.6 การประเมินแถบของแท่นตะวัน 13 สายพันธุ์ ที่ได้จากการใช้เทคนิค TRAP-PCR

ลำดับที่	primer	Total number of bands	Number of polymorphic bands (PPB%)	Polymorphic information content (PIC)	Size of PCR fragment (bp)	Mean band per primer	Mean band frequency per primer
1	HEL436736(F) - BG92(R)	29	72.41	0.96	105-555	20.31	0.70
2	WNKK(F) - ODD4(R)	29	96.55	0.96	105-1,100	14.15	0.49
3	WNTP(F) - ODD20(R)	43	95.35	0.97	105-2,000	21.54	0.50
4	HEL40001(F) - BG66(R)	40	93.02	0.97	104-1,150	20.61	0.48
5	CAN(F) - BG23(R)	28	96.43	0.96	118-950	16.69	0.60
6	HEL446443(F) - BG23(R)	31	77.42	0.96	120-1,500	21.23	0.68
7	NLA(F) - BG39(R)	30	96.67	0.96	105-600	14.85	0.49

ตารางที่ 4.7 ค่า similarity matrix จากค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard ของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุล TRAP

สายพันธุ์	HEL246	HEL278	HEL280	HEL293	JA98	JA6	JA37	JA102	CN52867	HEL65	JA89	HEL257	HEL286
	◇	●	●	▼	△	○	○	■	□	□	△	◇	◇
HEL246 ◇	1.00												
HEL278 ●	0.50	1.00											
HEL280 ●	0.61	0.49	1.00										
HEL293 ▼	0.65	0.48	0.60	1.00									
JA98 △	0.48	0.42	0.55	0.48	1.00								
JA6 ○	0.47	0.39	0.48	0.51	0.42	1.00							
JA37 ○	0.46	0.46	0.51	0.54	0.52	0.57	1.00						
JA102 ■	0.56	0.45	0.55	0.51	0.51	0.49	0.43	1.00					
CN52867 □	0.40	0.42	0.43	0.46	0.43	0.44	0.54	0.45	1.00				
HEL65 □	0.49	0.38	0.52	0.52	0.58	0.46	0.49	0.51	0.47	1.00			
JA89 △	0.53	0.45	0.56	0.53	0.47	0.48	0.48	0.53	0.41	0.43	1.00		
HEL257 ◇	0.46	0.44	0.49	0.48	0.49	0.46	0.48	0.47	0.41	0.45	0.59	1.00	
HEL286 ◇	0.49	0.47	0.54	0.49	0.48	0.48	0.46	0.49	0.38	0.47	0.61	0.54	1.00

หมายเหตุ: สัญลักษณ์แสดงแหล่งกำเนิด ◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △: France, ○: Canada, ■: Germany, □: USSR

ตารางที่ 4.8 การประเมินแถบของแท่นตะวัน 9 สายพันธุ์ ที่ได้จากการใช้เทคนิค TRAP-PCR

ลำดับที่	primer	Total number of bands	Number of polymorphic bands (%PPB)	Polymorphic information content (PIC)	Size of PCR fragment (bp)	Mean band per primer	Mean band frequency per primer
1	HEL449466(F) - BG56(R)	32	81.25	0.97	105-3,000	21.56	0.67
2	HEL449466(F) - BG68(R)	35	57.14	0.97	115-3,000	26.0	0.74
3	HEL449466(F) - BG66(R)	26	84.62	0.96	100-1,200	16.67	0.64
4	HEL436736(F) - BG92(R)	29	72.41	0.96	105-555	19.78	0.68
5	WNKK(F) - ODD4(R)	27	96.30	0.95	105-1,100	11.78	0.44
6	WNTP(F) - ODD20(R)	43	90.70	0.97	105-2,000	22.67	0.53
7	HEL40001(F) - BG66(R)	39	92.31	0.97	104-1,150	18.44	0.47
8	CAN(F) - BG23(R)	28	92.86	0.96	118-950	16.89	0.60
9	HEL446443(F) - BG23(R)	31	70.97	0.96	120-1,500	21.22	0.68
10	NLA(F) - BG39(R)	30	93.33	0.96	105-600	15.0	0.50

ตารางที่ 4.9 ค่า similarity matrix จากค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard ของแก่นตะวัน 9 สายพันธุ์ จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเดล TRAP

สายพันธุ์	HEL246	HEL278	HEL280	HEL293	JA98	JA6	JA37	JA102	CN52867
	◇	●	●	▼	△	○	○	■	□
HEL246 ◇	1.00								
HEL278 ●	0.58	1.00							
HEL280 ●	0.64	0.57	1.00						
HEL293 ▼	0.69	0.54	0.62	1.00					
JA98 △	0.51	0.48	0.56	0.51	1.00				
JA6 ○	0.54	0.51	0.55	0.54	0.49	1.00			
JA37 ○	0.51	0.53	0.56	0.56	0.54	0.60	1.00		
JA102 ■	0.58	0.51	0.59	0.52	0.54	0.57	0.51	1.00	
CN52867 □	0.45	0.46	0.46	0.50	0.47	0.47	0.58	0.48	1.00

หมายเหตุ: สัญลักษณ์แสดงแหล่งกำเนิด ◇: Unknown, ●: USA, ▼: Poland, △: France, ○: Canada, ■: Germany, □: USSR

#### 4.6. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกแบบ co-dominant เพื่อใช้ตรวจสอบเมล็ดลูกผสมรุ่นที่ 1

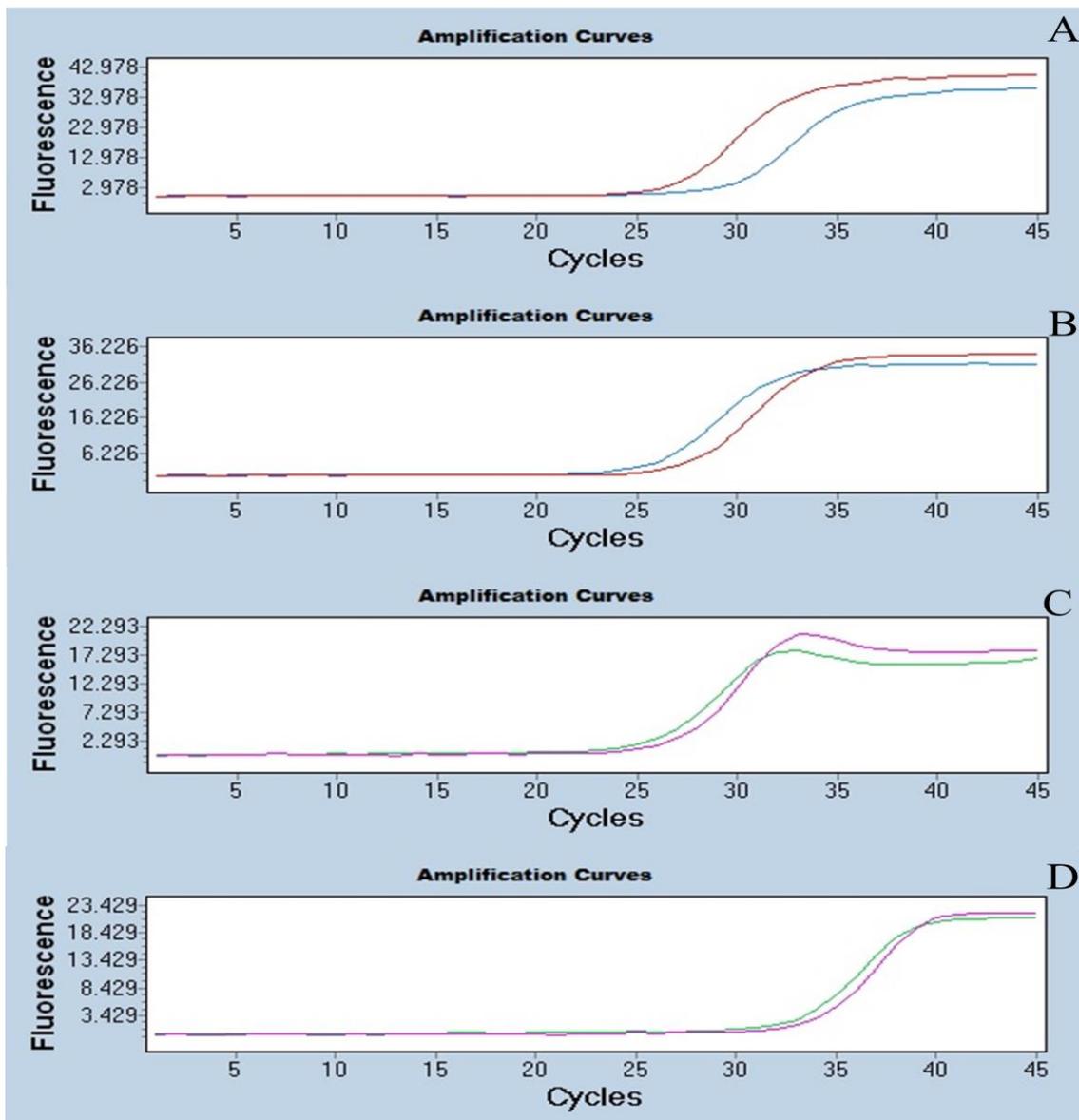
จากผลการศึกษาในข้อ 4.4 และ 4.5 พบว่า สายพันธุ์ที่มีระดับความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าต่างกัน ล้วนมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล TRAP ซึ่งเป็น multilocus marker ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาเครื่องหมายซึ่งมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ co-dominant เพื่อช่วยคัดเลือกแก่นตะวันลูกผสม F1 ที่สร้างขึ้นจากพ่อและแม่พันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าได้ในระดับที่ต่างกัน หลังจากที่ได้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ R-genes เมื่อแก่นตะวันได้รับเชื้อ *Sclerotia rolfisii* ในเบื้องต้นได้ตรวจสอบการแสดงออกของ R-genes จำนวน 16 ยีน (ตารางที่ 3.6) จาก Expressed sequence tags ของแก่นตะวันจาก Compositae Genome Database (ซึ่งมีทั้งหมดจำนวน 10,656 เลขหมาย) ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มย่อย NBS-LRR, CC-NBS-LRR, TIR-NBS-LRR และ EDS1 จำนวน 5, 5, 5 และ 1 ยีนตามลำดับ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อใบ ปล้อง ราก และลำต้นสะสมอาหาร ด้วยเทคนิค semiquantitative RT-PCR พบยีนจำนวน 2 ยีนที่ไม่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ยีน HEL457326 และ HEL471160 ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม NBS-LRR และ TIR-NBS-LRR ตามลำดับ สำหรับยีน HEL440872 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม CC-NBS-LRR มีการแสดงออกเฉพาะในรากเท่านั้น ในขณะที่ยีน HEL449466 ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม TIR-NBS-LRR แสดงออกทั้งในเนื้อเยื่อใบและราก โดยยีนนอกเหนือจากที่กล่าวแล้วอีกจำนวน 12 ยีน มีการแสดงออกทั้งในเนื้อเยื่อใบ ปล้อง ราก และลำต้นสะสมอาหาร (ตารางที่ 4.10)

นอกจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในสภาพปกติ ยังได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในสภาวะที่ได้รับเชื้อ *S. rolfisii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าในแก่นตะวัน หลังจากได้รับเชื้อดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับสภาวะปกติในแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 โดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่า มียีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อแก่นตะวันได้รับเชื้อดังกล่าวจำนวน 4 ยีน (ภาพที่ 4.13, 4.14 และ ตารางที่ 4.11) ได้แก่ HEL436736, HEL455346 ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม CC-NBS-LRR, ยีน HEL449110 ในกลุ่ม EDS1 และ ยีน HEL449466 ในกลุ่ม TIR-NBS-LRR โดยมียีนที่มีการแสดงออกลดลงมีจำนวน 9 ยีน ได้แก่ HEL440001, HEL444841, HEL446443, ยีน HEL454403 ในกลุ่ม NBS-LRR, ยีน HEL447036, HEL450929, HEL453765, HEL465866 ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม TIR-NBS-LRR และ ยีน HEL451666 ในกลุ่ม CC-NBS-LRR มีการแสดงออกที่เปลี่ยนไป ดังตารางที่ 4.12 จึงได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่จำเพาะกับ R-genes ดังกล่าว โดยออกแบบไพรเมอร์และสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง SSR ของยีนในแก่นตะวัน มาใช้เพื่อสร้างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ co-dominant

ตารางที่ 4.10 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคในเนื้อเยื่อของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246

Primer	(Internode)	(Young leaf)	(Tuber)	(Root)
HEL436736	+	+	+	+
HEL440001	+	+	+	+
HEL440872	-	-	-	+
HEL444841	+	+	+	+
HEL446443	+	+	+	+
HEL447036	+	+	+	+
HEL449110	+	+	+	+
HEL449466	-	+	-	+
HEL450929	+	+	+	+
HEL451666	+	+	+	+
HEL453765	+	+	+	+
HEL454403	+	+	+	+
HEL455346	+	+	+	+
HEL457326	-	-	-	-
HEL465866	+	+	+	+
HEL471160	-	-	-	-

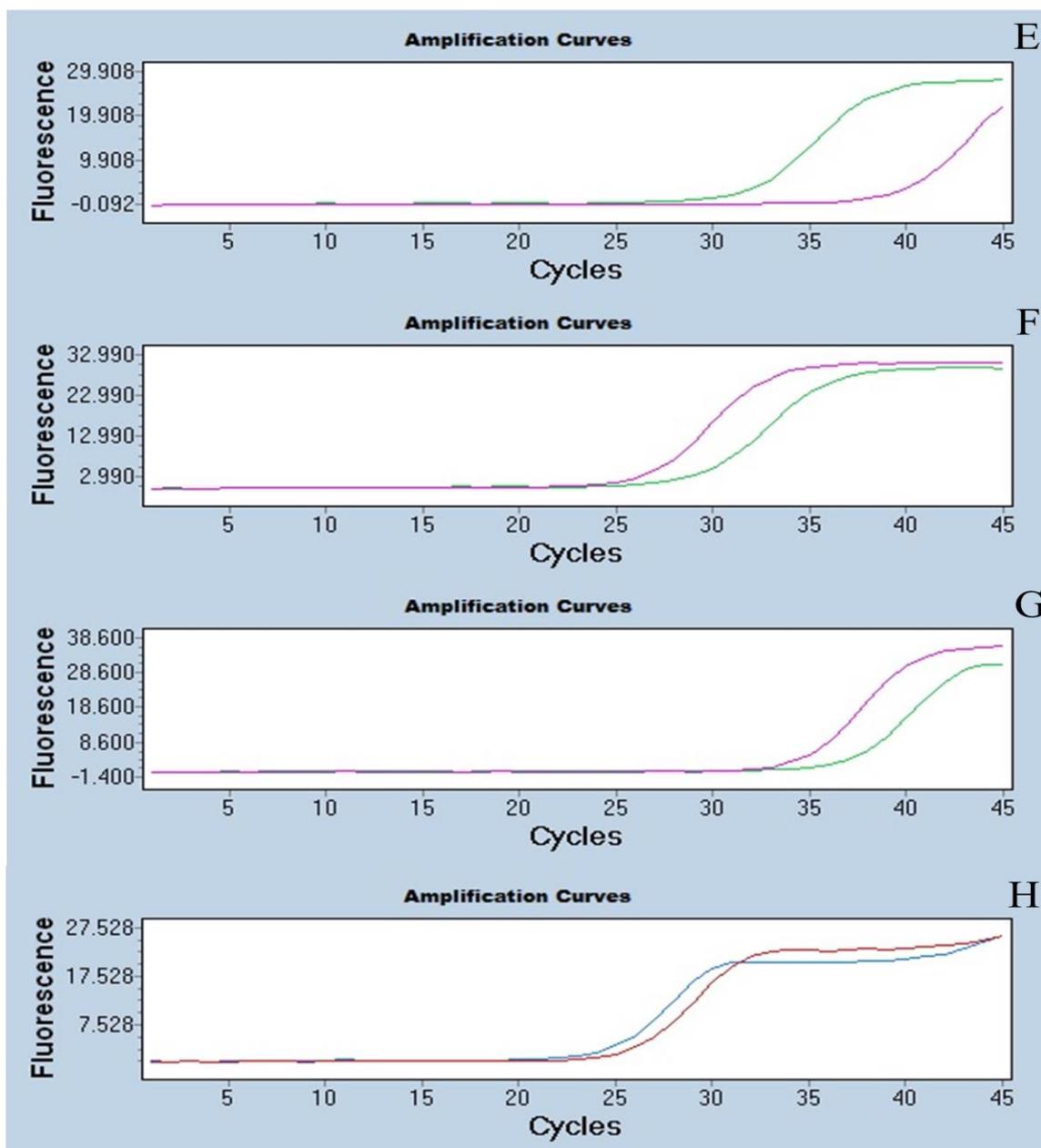
หมายเหตุ + คือ มีการแสดงออก, - คือ ไม่มีการแสดงออก



ภาพที่ 4.13 ตัวอย่างการแสดงผลของยีนต้านทานโรคในเนื้อเยื่อใบของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246

HEL436736 (A), HEL440001 (B), HEL446443 (C), HEL447036 (D) และ HEL448441

- = Non-infected
- = Infected *S. rolfsii*



ภาพที่ 4.14 ตัวอย่างการแสดงผลของซินดีนทานโรคนเนื้อเยื่อใบของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246

HEL444841 (E), HEL449110 (F), HEL449466 (G) และ HEL450929 (H)

- = Non-infected
- = Infected *S. rolfsii*

ตารางที่ 4.11 ระดับการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 ในเนื้อเยื่อใบเมื่อแก่นตะวัน ได้รับเชื้อและไม่ได้รับเชื้อ *S. rolfsii* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

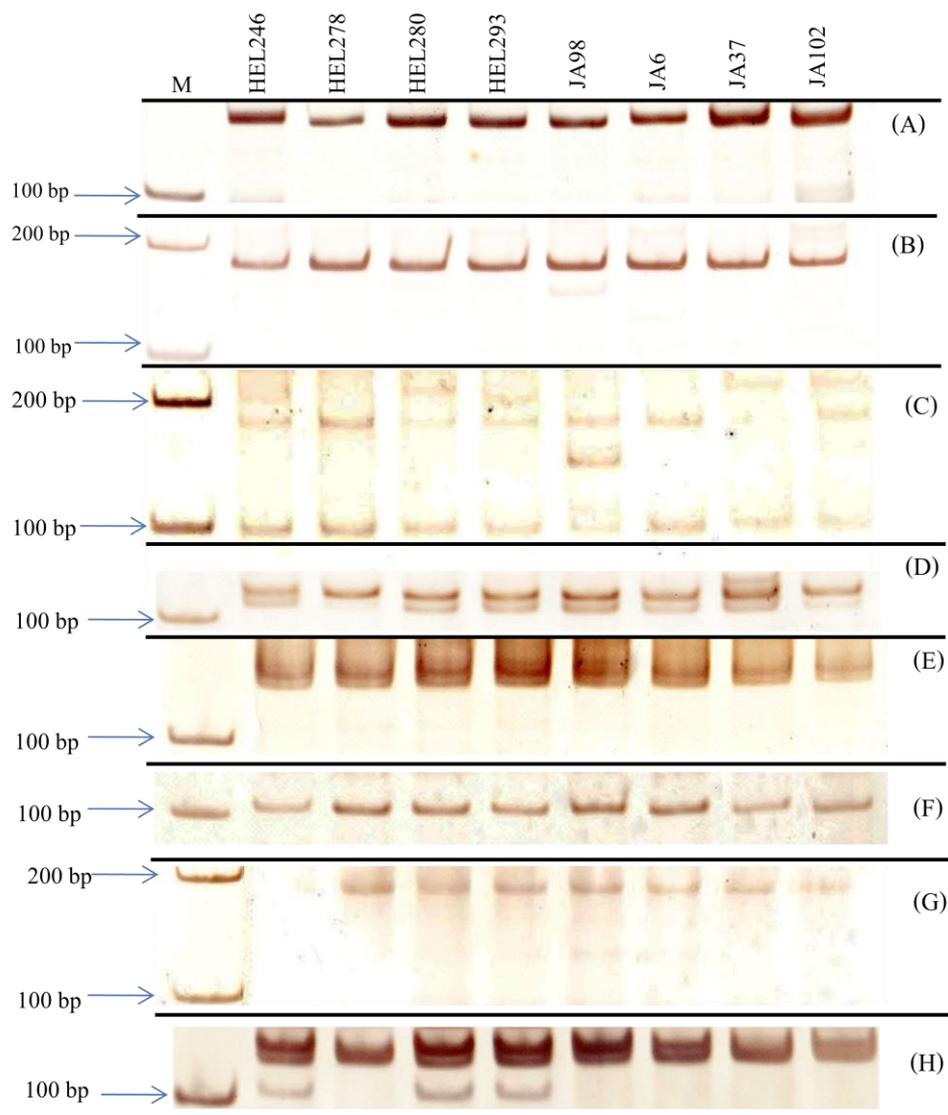
Primer	Normalized Ratio		Up ( ↑ ) /Down ( ↓ ) regulation
	ไม่ได้รับ <i>S. rolfsii</i>	ได้รับ <i>S. rolfsii</i>	
HEL436736	1.00	7.410	↑
HEL440001	1.00	0.302	↓
HEL440872	-	-	-
HEL444841	1.00	0.003	↓
HEL446443	1.00	0.495	↓
HEL447036	1.00	0.604	↓
HEL449110	1.00	7.722	↑
HEL449466	1.00	5.527	↑
HEL450929	1.00	0.434	↓
HEL451666	1.00	0.234	↓
HEL453765	1.00	0.143	↓
HEL454403	1.00	0.109	↓
HEL455346	1.00	4.350	↑
HEL457326	-	-	-
HEL465866	1.00	0.254	↓
HEL471160	-	-	-

หมายเหตุ – ไม่พบการแสดงออกของยีน

#### 4.7 การวิเคราะห์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายช่วยคัดเลือกจากยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานโรคในแก่นตะวัน

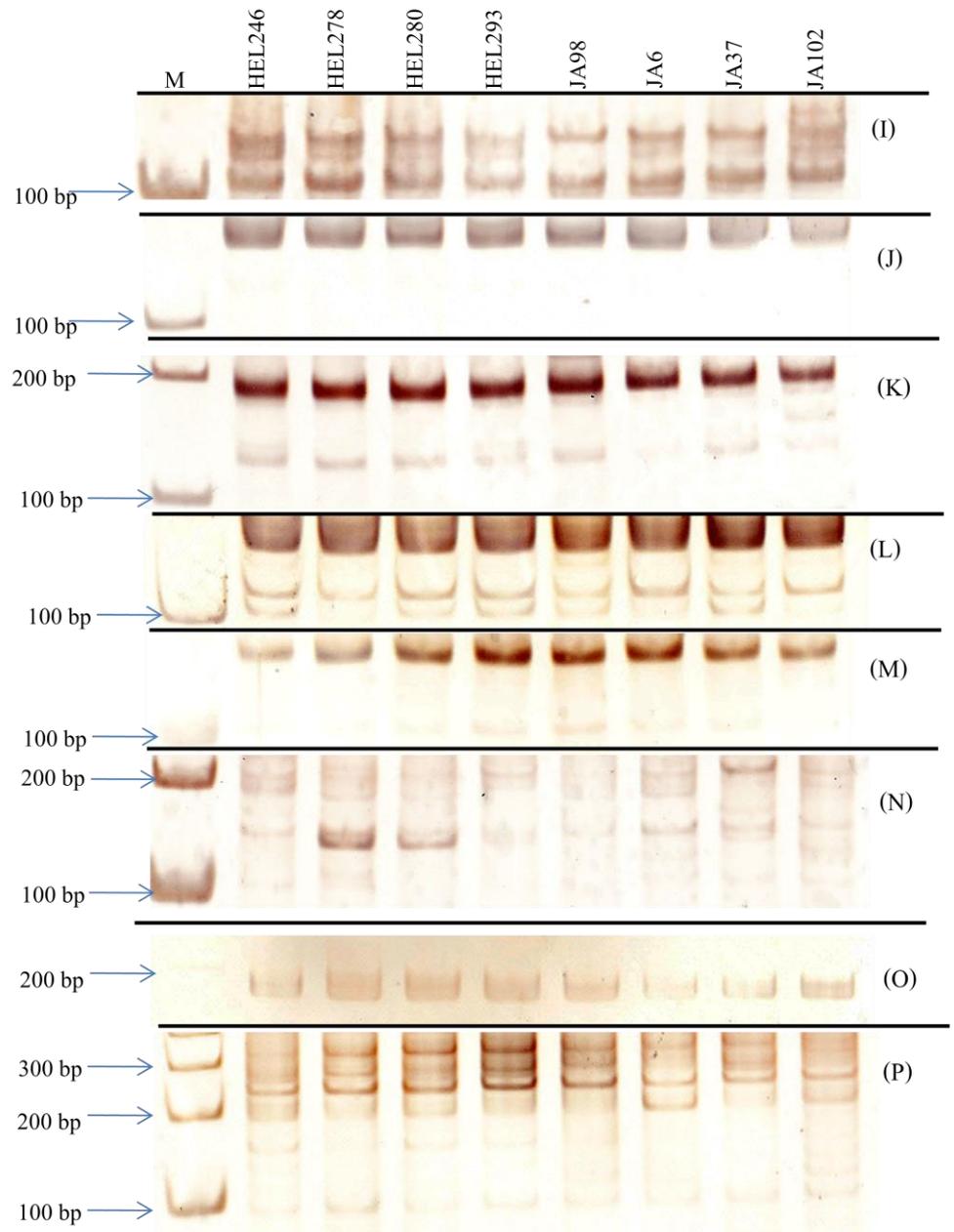
จากการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง simple sequence repeats (SSRs) ของยีนในกลุ่ม NBS-LRR, CC-NBS-LRR, TIR-NBS-LRR และ EDS1 ซึ่งพบว่ามีเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกเมื่อแก่นตะวันได้รับเชื้อ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุของโรคโคนเน่า จำนวน 16 ยีน มาสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจหาอัลลีลของยีนดังกล่าวในแก่นตะวันที่มีระดับความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าต่างกันจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ HEL246, HEL278, HEL280, HEL293, JA6, JA37, JA98 และ JA102 เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยพอลิเมอไรสึมนำโดยไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบ

ดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคจากแก่นตะวันทั้ง 8 สายพันธุ์ได้จำนวน 1 ถึง 11 อัลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.88 แถบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอยู่ระหว่าง 0 ถึง 11 แถบ คิดเฉลี่ยเป็น 79.03 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 103 ถึง 324 คู่เบส ซึ่งผลการศึกษา (ภาพที่ 4.15, 4.16 และ ตารางที่ 4.12)



ภาพที่ 4.15 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแก่นตะวัน 8 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพโรมอร์

(A) HEL436736 (B) HEL440001 (C) HEL440872 (D) HEL444841 (E) HEL446443 (F)  
HEL447036 (G) HEL449110 (H) HEL449466 M: 100 bp DNA ladder plus (Vivantis)



ภาพที่ 4.16 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแก่นตะวัน 8 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์

(I) HEL450929 (J) HEL451666 (K) HEL453765 (L) HEL454403 (M) HEL455346 (N) HEL457326  
(O) HEL465866 (P) HEL471160 M: 100 bp DNA ladder plus, (Vivantis)

ตารางที่ 4.12 แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากส่วนของยีนต้านทาน โรคในแก่นตะวันแต่ละสายพันธุ์

Primer name	HEL246 (bp)	HEL278 (bp)	HEL 280 (bp)	HEL293 (bp)	JA98 (bp)	JA6 (bp)	JA37 (bp)	JA102 (bp)	Number of bands	Monomorphic	Polymorphic
HEL436736	155	155	155	155	155	155	155	155	1	1 (155)	-
HEL440001	181	181	181	181	155,181	135, 181	181	181	3	1 (181)	2
HEL440872	180	180	180	180	145, 180	180	-	180	2	-	2
HEL444841	112,121	112,119	107,116	107,116	107,116	107,116	131, 119, 107	112,121	6	-	6
HEL446443	142, 151	142, 154	145, 157	145,154, 165	145, 154, 165	145, 154	147, 157	147, 157	7	-	7
HEL447036	103	103	103	103	103	103	103	103	1	1(103)	-
HEL449110	-	189	189	189	189	189	189	189	1	-	1
HEL449466	105, 131, 141	133	103, 129, 139	103, 129, 139	129, 141	133, 144	133	133, 141	8	-	8
HEL450929	103,125, 136	103,125, 136	103,125, 136	103,125, 136	103,136	103, 125, 136	103, 125, 136	103, 125, 136, 154	4	2 (103, 136 )	2
HEL451666	160, 172	160, 172	160, 172	160, 172	160, 172	160, 172	160, 172	160, 172	2	2 (160, 172)	-
HEL453765	186	184	184	186	189	194	194	198	5	-	5
HEL454403	162,181	162,181	162,181	162,181	162,181, 200	162,181	162,181	162,181	3	2 (162, 181)	1
HEL455346	165	163	163	163	163	165	165	165	2	-	2
HEL457326	192, 212	184, 210, 221	184, 210	197, 212	-	189, 210	172, 216	200,214	11	-	11
HEL465866	167,182	167,182	167,182	167,182	167,182	167,182	167,182	167,182	2	2 (167, 182)	-
HEL471160	193, 239, 324	193, 271, 239, 324	193, 271, 239, 324	193, 271, 239, 324	193, 271, 239, 324	193, 271, 239, 324	193, 271, 239, 324	193, 239	4	2 (193, 239,)	2

จากการผสมแก่นตะวันสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าสูง (R) และกลุ่มต้านทานโรคโคนเน่าได้ในระดับต่ำ (S) แล้วนำเมล็ดรุ่นลูกผสมของแก่นตะวัน F1 มา สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพแล้วพบว่า วิธีการดังกล่าวให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ดังข้อ 4.1 เมื่อ ตรวจสอบเมล็ดที่ได้จากการผสมเป็นลูกผสมระหว่างพ่อแม่พันธุ์ที่ได้เลือกมาใช้เป็นคู่ผสมจาก โครงการที่ 1 ของชุดโครงการนี้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 4.7 พบว่า สามารถระบุว่าคุณผสมเกิดจากการผสมกันระหว่างแก่นตะวันพ่อแม่พันธุ์ที่ได้เลือกมาใช้เป็นคู่ผสม จริง

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

#### จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้

5.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Tai and Tanksley (1990) สามารถใช้เพื่อสกัดดีเอ็นเอจากใบและเมล็ดแก่่นตะวันได้ดีที่สุด จึงใช้วิธีดังกล่าวตลอดการศึกษาวิจัยนี้

5.2 สภาพที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคในแก่่นตะวันด้วยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม และใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Palumbo *et al.* (2007) ที่ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Pelagonium* ด้วยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ปริมาณของดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม แต่ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์แตกต่างกันเนื่องจาก Palumbo *et al.* (2007) ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับยีน 1 pmol และไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่มที่คิดผลจากด้วยสารกัมมันตรังสี 0.3 pmol ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ดี

5.3 เครื่องหมายโมเลกุล TRAP-PCR สามารถวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคในแก่่นตะวันทั้ง 13 สายพันธุ์ได้จากไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ เมื่อนำมาสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของแก่่นตะวันจำนวน 9 และ 13 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 10 และ 7 คู่ สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแก่่นตะวันทั้ง 9 และ 13 สายพันธุ์ ได้จำนวน 320 และ 233 แถบ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 104 ถึง 3,000 คู่เบส และ 104 ถึง 2,000 คู่เบส มีค่า polymorphism information content (PIC) ตั้งแต่ 0.95 ถึง 0.97 และ 0.96 ถึง 0.97 และมีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.45 ถึง 0.69 และ 0.38 ถึง 0.65 ตามลำดับ

5.4 แก่นตะวันที่มาจากแหล่งกำเนิดต่างกันมีความแตกต่างของยีนต้านทานโรคในกลุ่มของยีนที่นำมาศึกษา และยังพบว่าแก่่นตะวันสายพันธุ์ JA6 และ JA37 ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศแคนาดา มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยีนในกลุ่มที่นำมาศึกษา ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Wangsomnuk *et al.* (2011) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของทางพันธุกรรมแก่่นตะวันที่มาจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมจำนวน 147 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD พบว่า สายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดจากแหล่งแคนาดาจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่แก่่นตะวันสายพันธุ์ HEL 278 กับ HEL 280 ซึ่งมีแหล่งกำเนิดจากประเทศสหรัฐอเมริกาถูกจัดอยู่ต่างกลุ่มกันเนื่องจากแก่่นตะวันในประเทศดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

5.5 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันทั้ง 16 ยีน ในเนื้อเยื่อใบ ปล้อง หัว และ ราก โดยใช้ตัวอย่าง first-stranded cDNAs จากแก่นตะวันสายพันธุ์ JA102 พบว่ามียีนจำนวน 2 ยีน ที่ไม่มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อคือ *HEL457326* และ *HEL471160*

5.6 เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในสภาพปกติและสภาวะรับเชื้อ *S. rolfsii* โดยใช้ตัวอย่าง สายพันธุ์ HEL246 พบว่ามียีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 4 ยีน ได้แก่ *HEL436736*, *HEL455346* ซึ่งเป็นยีน ในกลุ่ม CC-NBS-LRR, *HEL449110* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม EDS1 และ *HEL449466* อยู่ยีนในกลุ่ม TIR-NBS-LRR โดยมียีนที่มีการแสดงออกลดลงมีจำนวน 9 ยีน ได้แก่ *HEL440001*, *HEL444841*, *HEL446443*, ยีน *HEL454403* ในกลุ่ม NBS-LRR, ยีน *HEL447036*, *HEL450929*, *HEL453765*, *HEL465866* อยู่ในกลุ่ม TIR-NBS-LRR และ ยีน *HEL451666* อยู่ในกลุ่ม CC-NBS-LRR ทั้งนี้การแสดงออกของยีนที่ลดลงหรือเพิ่มขึ้นล้วนมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานโรค ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *S. rolfsii* ยังขึ้นอยู่กับไอโซเลตของเชื้อด้วย (Farr et al., 1989) ยีนต้านทานโรคจะมีความจำเพาะต่อการต้านเชื้อโรคได้บางสายพันธุ์เท่านั้น (McDowell and Woffenden, 2003) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ควรศึกษากลไกและหน้าที่ของยีน แต่ละยีนเพื่อให้สามารถอธิบายความต้านทานของพืชต่อเชื้อก่อโรค และสามารถนำข้อมูลนี้ไป พัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อโรคและให้ผลผลิตในทางที่ดีขึ้นต่อไป

5.7 การคัดแยกส่วนของยีนต้านทานโรคจากแก่นตะวันทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าสามารถสามารถ สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรค (R-genes) ได้ระหว่าง 1 ถึง 11 แถบ มีค่า ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.88 แถบ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอยู่ระหว่าง 0 ถึง 11 แถบ คิดเฉลี่ยเป็น 79.03 เบอริเซ็นต์ โดยมีแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 103 ถึง 324 คู่เบส ยีนต้านทานโรคที่มีจำนวน อัลลีลน้อยที่สุดมี 3 ยีน ได้แก่ ยีน *HEL436736*, *HEL447036* และ *HEL449110* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม CC-NBS-LRR, TIR-NBS-LRR และ EDS1 ตามลำดับ สำหรับยีนที่มีจำนวนอัลลีลมากที่สุดคือ ยีน *HEL457326* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม NBS-LRR มีทั้งหมด 11 อัลลีล จำนวนอัลลีลที่ปรากฏอาจเกี่ยวข้องกับ ความสามารถในการต้านทานโรค โดยทำให้มีความสามารถในการต้านทานเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรืออาจไม่มีส่วนเกี่ยวข้องเลยเนื่องจากยีนนั้นๆไม่มีการแสดงออก นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นหรือลดลง ของเบสซ้ำอาจมีผลต่อการอ่านรหัสของ open reading frame ซึ่งอาจเปลี่ยนรหัสของกรดอะมิโนใน โปรตีนเป็นตัวอื่นแล้วมีผลต่อการทำหน้าที่ของยีนได้

5.8 ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสซ้ำในยีนต้านทานโรคของแก่นตะวันที่มีความสามารถ ต้านทานโรคโคนเน่าได้ในระดับต่างกัน ทำให้ทราบถึงความแตกต่างของอัลลีลของยีนดังกล่าวซึ่ง ได้นำมาใช้เป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกในการวิเคราะห์ลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างพ่อ แม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวัน

## บทที่ 6

### บรรณานุกรม

- คลรัชต์ สุดหล้า. 2554. การวิเคราะห์พันธุกรรมแก่นตะวันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SRAP และ EST-SSR. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2549. แก่นตะวัน (*Jerusalem artichoke*) ในประเทศไทยมีโอกาสประสพภัยศัตรูพืชแบบไหนกัน แก่นเกษตร. 34(2):112-123.
- Baldi, P., Patocchi, A., Zini, E., Toller, C., Velaso, R. and Komjanc, M. 2004. Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 109:231–239.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum. Genet.* 32:314–331.
- Cannon, S., Young, N. 2003. Genomic architecture and evolution of NBS-LRRs. In: Stacey G, Keen N (eds) *Plant-microbe interactions*. The American Phytopathological Society, St Paul, p. 81–95.
- Collins, N., Park, R., Spielmeier, W., Ellis, J., Pryor, A.J. 2001. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. *Genome* 44:375–381.
- Cosgrove, D. R., E. A. Oelke, J. D. Doll, D. W. Davis, D. J. Undersander and E. S. Oplinger. 1991. Jerusalem Artichoke. Available from: URL: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/jerisart.html>.
- Coussement, A. P. 1992. Inulin and Oligofructose: safe intake and legal status. In: First Orafiti Research Conference, Orafiti, Tienen, Belgium, p. 151-161.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411:826–833.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 11-5.
- Flor, H.H. 1971. Current status for the gene-for-gene concept. *Ann Rev Phytopathol* 9:275–296.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1997) Plant disease resistance genes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:575–607.

- Gibson, G.R., Beatty, X., Wang, X. and Cummings, J.H. 1995. Selective simulating of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108: 975-982.
- Gulya, T.J. 1985. Registration of five disease resistant sunflower germplasm. *Crop Sci.* 25: 719-720.
- Hu, J. and B. Vick. 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21 :289-294.
- Hu, J., O.E. Ochoa, M.J. Truco, and BA Vick. 2005. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica* 144:225-235.
- Lee, S.Y. and Lee, D.H. 2003. Putative TIR-NBS type R protein 4 (*Malus baccata*): expression of the MbR4, a TIR-NBS type of apple R gene, confers resistance to bacterial spot disease in *Arabidopsis*. GenBank accessions <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Li, G. and Quiros, C.F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103:455-461.
- Liu, Z.H., I.A. Anderson, J. Hu, T.L. Friesen, J.B. Rasmussen, and J.D. Faris. 2005. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* 111(4):782-794.
- Lui, J.J. and Ekramoddoullah, A. K. M. 2003. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex. D. non. 1) *Mol. Genet. Genomics* 270: 432-441.
- Mammadov, J.A., Stevenson, B.J., Maroof, M.A. 2005. High-resolution mapping of the barley leaf rust resistance gene Rph5 using barley expressed sequence tags (ESTs) and synteny with rice. *Theor. Appl. Genet.* 111:1651–1660.
- Martínez-Zamora MG, Castagnaro AP, Diaz-Ricci JC 2004. Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RGAs) from cultivated and wild strawberries. *Mol. Genet. Genomics* 272:480–487.

- Miklas, P.N., J. Hu, N.J. Grunwald, and K.M. Larson. 2006. Potential application of TRAP (targeted region amplified polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. *Crop Sci.* 46:910-916.
- Noir, S., Combes, M.C., Anthony, F., Lashermes, P. 2001. Origin, Diversity and evolution of NBS - type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Mol. Genet. Genomics* 265:654–662.
- Okun, D.O., Kenya, E.U., Oballa, P.P., Odee, D.W. and Muluvi, G.M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. *Afr. J. Biotechnol.* 7(10): 2119-2123.
- Palumbo, M., Hong, W.F. and Wang, G.L. 2007. Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) as a tool for detecting genetic variation in the genus *Pelargonium*. *Horticultural Science* 42(5):1118-1123.
- Panguluri, S.K., Janaiah, K., Govil, J.N., Kumar, P.A., and Sharma, P.C. 2006. AFLP fingerprinting in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and its wild relatives. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53:523-531.
- Porebski, S., Grant, B. and Boum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:8-15.
- Radwan, O., Gandhi, S., Heesacker, A., Whitaker, B., Taylor, C., Plocik, A., Kesseli, R., Kozik, A., Michelmore, R.W. and Knapp, S.J. (2008) Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Mol. Genet. Genomics* 280(2):111-125.
- Samuelian S, K., Baldo A, M., Pattison J, A., and Weber C. A. 2008. Isolation and linkage mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and classification among 270 Rosaceae NBS-LRR genes. *Tree Genetics and Genome* 4: 881–896.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghofer, A. (1990) The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Tr Biochem. Sci.* 15:430–434.

- Shen, K.A., Meyers, B.C., Islam-Faridi, M.N., Chin, D.B., Stelly, D.M. and Michelmore, R.W. 1998. Resistance-gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *MPMI*. 11:1815–823.
- Škorić, D. J., Atlagić, R., Marinković, B., Dozet, M. and Mihaljčević, M. 1995. In: FAO Working Group: Evaluation of wild *Helianthus* species, Progress Report 1994, July 25-28, 1995, Bucharest (Romania), p. 11-25.
- Soriano, J.M., Vilanova, S., Romero, C., Llacer, G., Badenes, M. (2005) Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110:980–989.
- Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtěk, J., Tetera, M., et al. 2000. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon* 49: 79-84.
- Suzuki, M. 1993. Fructans in crop production and preseavation. In *Science and Technology of Fructans* eds. Inulin and oligofructose: safe intake and legal status. In: First Orafiti Research Conference. p. 151-161.
- Tai, T.H. and Tanksley, S.D. 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8:297-303.
- Van der Meer, I.M., Koops, A.J, Hakkert, J.C., van Tunen, A.J.1998. Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *The Plant Journal* 15:489–500.
- Van Damme, E.J.M., et al., & Peumans, W.J. 1999. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. *Eur. J. Biochem.* **259**:135-142.
- Wangsomnuk, P.P., Khampa, S., Wangsomnuk, P., Jogloy, S., Mornkham, T., Ruttawat, B., Patanothai, A. and Fu ,Y.B. 2011. Genetic diversity of worldwide Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) germplasm as revealed by RAPD markers. *GMR*. 10(4):4012-4025
- Ziyan, E. and Pekyardimci, S. 2001. Characterization of Polyphenol Oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk. J. Chem.* 27:217-225.