

## บทความวิจัย

# การจัดกลุ่มและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ แตงเทศและแตงไทยพันธุ์เศรษฐกิจด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

สุทมาศ นิยมพานิช<sup>1</sup> สุธีวรรณ บินชัย<sup>1</sup> อรอนงค์ พริงสุลกะ<sup>2</sup> อัจฉรียา รั้งษริจิ<sup>1\*</sup>

### บทคัดย่อ

แตงเทศ (*Cucumis melo* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูง โดยพันธุ์เศรษฐกิจที่นิยมปลูกมี 3 พันธุ์ ได้แก่ *C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *inodorus* และ *C. melo* var. *reticulatus* ในการปลูกแตงเทศเกษตรกรต้องนำเข้าเมล็ดพันธุ์ซึ่งมีราคาสูงจากต่างประเทศ ปัจจุบันจึงได้มีการทดลองปลูกแตงเทศพันธุ์ปลูกต่างๆ และปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้าม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงเทศและแตงไทยพันธุ์เศรษฐกิจจำนวน 18 พันธุ์ปลูกจากทวีปเอเชีย อเมริกา และออสเตรเลีย โดยได้เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการจัดกลุ่มแตงเทศและแตงไทยด้วยวิธี neighbor joining พบการจัดกลุ่มแบ่งเป็น 12 กลุ่ม โดยพบว่า Mi Wang มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงที่สุด นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแฮปโลไทป์ระหว่างกลุ่มของแตงเทศและแตงไทยยังยืนยันว่า Mi Wang มีฐานพันธุกรรมของบริเวณ ITS ที่กว้างที่สุด โดยมีแอลลีลกระจายอยู่ใน 8 แฮปโลไทป์ จากทั้งหมด 16 แฮปโลไทป์ แตงเทศหลายพันธุ์ปลูกมีการถ่ายยีน แต่ไม่มีแอลลีลร่วมกันกับแตงไทย ข้อมูลฐานพันธุกรรมที่สำคัญนี้จะช่วยให้สามารถคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่เหมาะสมในการนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

**คำสำคัญ:** พืชสกุลแตง บริเวณ ITS วิธี neighbor joining แฮปโลไทป์

<sup>1</sup>ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

<sup>2</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

\*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: achariya@g.swu.ac.th

# Clustering and Genetic Diversity Assessment of Economic Cultivars of Melons (*Cucumis melo* L.) Using Molecular Techniques

Suthamat Niyompanich<sup>1</sup>, Sutheewan Binchai<sup>1</sup>, Onanong Pringsulaka<sup>2</sup>,  
Achariya Rangsiruji<sup>1\*</sup>

## ABSTRACT

Melons (*Cucumis melo* L.) are economically important horticultural crops with three main commercial varieties, including *C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *inodorus* and *C. melo* var. *reticulatus*. In Thailand, cultivation of these melons requires imported premium grade seeds. Local field experiments have been attempted for outcross breeding improvements of several melon cultivars of market classes. This study therefore, aimed to assess genetic diversity of 18 melon cultivars obtained from Asia, America and Australia. PCR amplifications of the internal transcribed spacer (ITS) region were carried out and PCR products were sequenced. Results based on a neighbor joining tree showed that the melons were classified into 12 clusters, and Mi Wang exhibited the highest genetic variation. In addition, a haplotype network analysis revealed that Mi Wang possessed the broadest genetic base of ITS. Of 16 haplotypes generated, different alleles of Mi Wang were distributed in 8 haplotypes. Events of gene flow were indicated among several modern melon cultivars. However, these melons did not have shared alleles with Thai melon. These genetic databases are essential for cultivar selection that should further enhance effective breeding programs of the melons.

**Keywords:** *Cucumis*, ITS region, neighbor joining method, haplotype

---

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

\*Corresponding author, email: achariya@g.swu.ac.th

## บทนำ

ปัญหาภัยแล้งที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ก่อให้เกิดปัญหาด้านการเพาะปลูกของภาคเกษตร โดยเฉพาะการปลูกข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ เกษตรกรจึงได้เปลี่ยนมาปลูกพืชที่สามารถควบคุมการใช้น้ำได้ และยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูง เช่น การปลูกแตงเทศ เนื่องจากแตงเทศนั้นเป็นพืชอายุสั้น เจริญเติบโตเร็ว ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตและส่งขายให้ตลาดได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นจึงทำรายได้ให้แก่เกษตรกรในเวลาอันรวดเร็ว

แตงเทศจัดอยู่ในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis melo* L. และคาดว่ามีการนำเข้ามาในแถบทวีปแอฟริกา แตงเทศที่นิยมบริโภคในปัจจุบันเป็นผลมาจากการเพาะปลูกและปรับปรุงพันธุ์จากในธรรมชาติ [1] โดยแตงเทศแบ่งได้เป็น 2 ชนิดย่อย (subspecies) ได้แก่ *C. melo* ssp. *melo* และ *C. melo* ssp. *agretis* [2] 16 พันธุ์ (variety) [3] แต่ที่ปลูกเพื่อการบริโภคและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจจัดอยู่ในชนิดย่อย *C. melo* ssp. *melo* ซึ่งมี 3 พันธุ์ ได้แก่ (1) *C. melo* var. *cantalupensis* ที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่า rock melon เพราะผลมีผิวแข็ง ขรุขระ มีร่องเป็นทางยาวโดยรอบจากขั้วผลถึงท้ายผล (2) *C. melo* var. *inodorus* ซึ่งเรียกทั่วไปว่า winter melon มีผิวของผลเรียบ และมักไม่มีกลิ่นหอม และ (3) *C. melo* var. *reticulatus* ที่เรียกทั่วไปว่า netted melon หรือ muskmelon ผิวนอกของผลมีลักษณะขรุขระเป็นร่างแหคลุมทั้งผล และผลมีกลิ่นหอม [4] แตงเทศที่เกษตรกรปลูกเพื่อป้อนตลาดนั้นมีหลายพันธุ์ปลูก (cultivar) และมีแนวโน้มของการเพาะปลูกเพิ่มขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2559 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกแตงเทศ 6,120.25 ไร่ และมีผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ 9,547,710 กิโลกรัม ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2558 ประมาณ 2,000 ไร่ นอกจากนี้ยังพบการปลูกแตงไทย (*C. melo* ssp. *agretis* var. *conomon*) 2,395 ไร่ และมีผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ 3,418,110 กิโลกรัม [5]

ในการปลูกแตงเทศเกษตรกรยังคงต้องนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นและประเทศต่างๆ ซึ่งมีราคาสูงตั้งแต่เมล็ดละ 7-70 บาท ปัจจุบันจึงได้มีการทดลองปลูกแตงเทศพันธุ์ปลูกต่างๆ และพยายามปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้าม แต่เป็นที่ทราบโดยทั่วไปกว่าจะได้พันธุ์ปลูกที่ดี มีรสชาติอร่อย เหมาะสมกับสภาพอากาศและพื้นที่ และทนทานต่อโรคและแมลง อาจต้องปลูกทดสอบนานหลายปี ซึ่งต้องใช้แรงงานและงบประมาณจำนวนมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาช่วยในการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และจัดกลุ่มแตงเทศและแตงไทยพันธุ์เศรษฐกิจ ข้อมูลฐานพันธุกรรมที่สำคัญนี้จะช่วยให้นักวิจัยและเกษตรกรสามารถคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่เหมาะสมในการนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยจะใช้บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมดีเอ็นเอ (ribosomal DNA หรือ rDNA) ที่พบในนิวเคลียสของยูแคริโอต และชนาด้วยยีนที่มีหน่วยซ้ำกัน ได้แก่ 18S และ 26S rDNA บริเวณ ITS ในพืชมีขนาดค่อนข้างสั้น (500-700 คู่เบส) [6] ส่งผลให้การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณนี้สามารถทำได้สะดวก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ primer ซึ่งออกแบบจากตำแหน่งของยีน 18S และ 26S rDNA [7] นอกจากนี้บริเวณ ITS ยังเป็น non-coding region ที่มีอัตราการกลายสูงกว่าบริเวณที่เป็นยีน ดังนั้นจึงนิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจัดกลุ่ม การระบุพันธุ์ ชนิด และสกุลของพืชหลายวงศ์ (อ้างจาก [8]) รวมทั้งของพืชชนิดต่างๆ ในสกุล *Cucumis* [9-11] และของแตงเทศพันธุ์ปลูกในทวีปยุโรปด้วย [12]

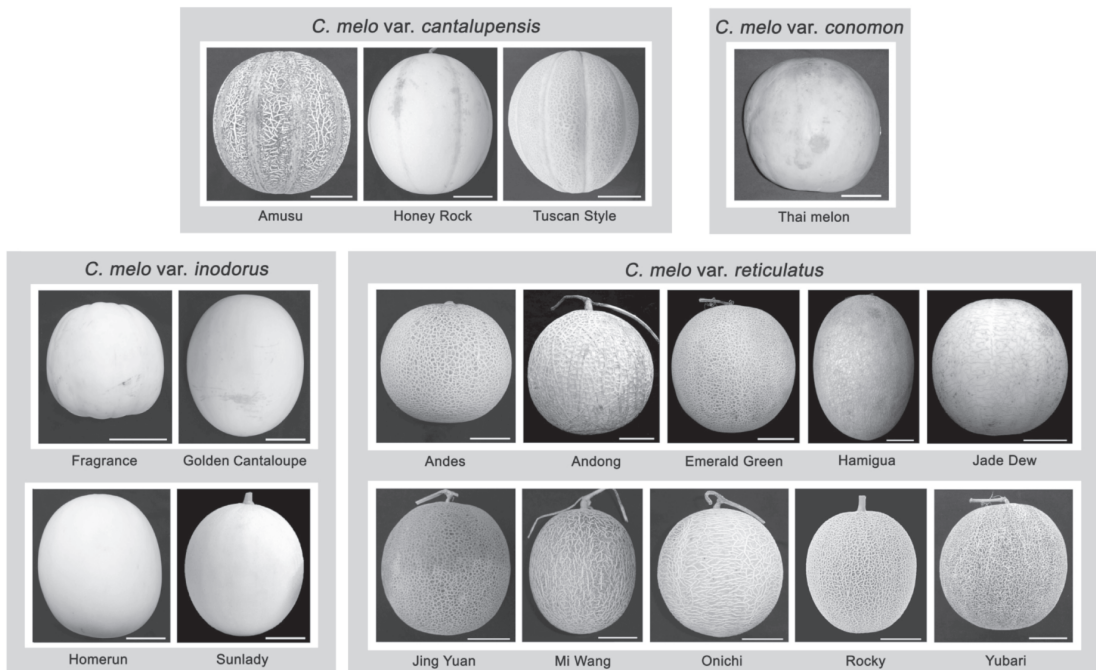
## วิธีการทดลอง

### 1. การเก็บตัวอย่างแตงเทศและแตงไทย

เก็บรวบรวมตัวอย่างแตงเทศและแตงไทยพันธุ์เศรษฐกิจจำนวน 18 พันธุ์ปลูกจากประเทศไทย และที่นำเข้าและวางจำหน่ายจากประเทศจีน ไต้หวัน เกาหลี ญี่ปุ่น อเมริกา และออสเตรเลีย ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างแตงเทศและแตงไทยพันธุ์เศรษฐกิจจำนวน 18 พันธุ์ปลูกที่รวบรวมได้จากประเทศต่างๆ

No.	Cultivar	Variety	Source
1	Amusu	<i>cantalupensis</i>	ญี่ปุ่น
2	Honey Rock	<i>cantalupensis</i>	ไทย
3	Tuscan Style	<i>cantalupensis</i>	อเมริกา
4	Fragrance	<i>inodorus</i>	ไต้หวัน
5	Golden Cantaloupe	<i>inodorus</i>	ไทย
6	Homerun	<i>inodorus</i>	ญี่ปุ่น
7	Sunlady	<i>inodorus</i>	ไทย
8	Andes	<i>reticulatus</i>	ญี่ปุ่น
9	Andong	<i>reticulatus</i>	เกาหลี
10	Emerald Green	<i>reticulatus</i>	ไต้หวัน
11	Hamigua	<i>reticulatus</i>	ไทย
12	Jade Dew	<i>reticulatus</i>	ไทย
13	Jing Yuan	<i>reticulatus</i>	ไทย
14	Mi Wang	<i>reticulatus</i>	จีน
15	Onichi	<i>reticulatus</i>	ไทย
16	Rocky	<i>reticulatus</i>	ออสเตรเลีย
17	Yubari	<i>reticulatus</i>	ญี่ปุ่น
18	Thai melon	<i>conomon</i>	ไทย



รูปที่ 1 ลักษณะผลของแตงเทศและแตงไทยที่ใช้ในการศึกษา (scale bar = 5 ซม.)

## 2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเนื้อผลของแตงเทศและแตงไทยจำนวน 18 พันธุ์ปลูก พันธุ์ปลูกละ 3 ผล (ทั้งหมด 54 ตัวอย่าง) โดยใช้วิธี CTAB ซึ่งประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [13] การสกัดดีเอ็นเอเริ่มจากการบดเนื้อผลให้ละเอียดโดยเร็วโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม CTAB buffer แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที เติม RNase A ตามด้วย “wet” chloroform (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใต้น้ำส่วนบนไว้และสกัดซ้ำด้วย “wet” chloroform อีกครั้งหนึ่ง เติม isopropanol ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใต้น้ำส่วนบนทิ้ง เติม wash buffer (76% ethanol และ 10 mM ammonium acetate) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงและดูดของเหลวใต้น้ำส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ (DNA pellet) ที่ได้ใน Tris-EDTA buffer (pH 8.0) และเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 xg เป็นเวลา 2 นาที

## 3. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากตัวอย่างแตงเทศและแตงไทยจำนวนทั้งหมด 54 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ forward primer ITS5P (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') และ reverse primer ITS8P (5'-CAC GCT TCT CCA GAC TAC A-3') ซึ่งมีความจำเพาะกับพืชมีดอก(angiosperm) [14] โดยเตรียม PCR reaction ที่มีปริมาตรรวม 25  $\mu$ L ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 2 ng/ $\mu$ L DNA template,

1x PCR buffer, 0.25 mM dNTP แต่ละชนิด, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Q-solution, 1 μM forward primer, 1 μM reverse primer และ 0.05 U/μL *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf Mastercycler Gradient 5331) โดยกำหนด อุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นแรก initial heating ที่ 94°C 3 นาที ตามด้วยขั้น denaturation ที่ 94°C 1 นาที ขั้น annealing ที่ 53°C 2 นาที และขั้น extension ที่ 72°C 2 นาที จำนวนทั้งหมด 30 รอบ ตามด้วยขั้น final extension ที่ 72°C 5 นาที จากนั้นจึงตรวจสอบแลบดิเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis (1% (w/v) agarose gel) และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

#### 4. การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์มเมชัน และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS

ทำการเชื่อมต่อกัน PCR product ของบริเวณ ITS กับพลาสมิด pGEM-T Easy Vector (Promega) และนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์ HIT-JM109 competent cell (RBC Bioscience) ด้วยวิธีทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวของ *E. coli* ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี blue-white selection ซึ่งขั้นตอนและวิธีการต่างๆ ดัดแปลงจาก Green และ Sambrook [15] โคโลนีสีขาวจำนวน 9 โคโลนีที่ได้รับการคัดเลือกจากแต่ละพันธุ์ปลูกได้นำไปสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) จากนั้นจึงนำพลาสมิดที่ได้ทั้งหมดส่งเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS โดยใช้ universal primer คือ forward primer T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') และ reverse primer SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') [16]

#### 5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ การจัดกลุ่มและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงเทศและแตงไทย

จากจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแตงเทศพันธุ์ปลูกต่างๆ และแตงไทยทั้งหมด 162 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (โดยได้จาก 18 พันธุ์ปลูก และในแต่ละพันธุ์ปลูกมี 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์) ทำการวิเคราะห์ความสอดคล้องกันเพื่อให้ได้ consensus sequence เพียง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแต่ละพันธุ์ปลูกโดยใช้โปรแกรม BioEdit [17] และเทียบเคียง consensus sequence ของทั้ง 18 พันธุ์ปลูกโดยใช้โปรแกรม Clustal X [18] จากนั้นวิเคราะห์ผลการจัดกลุ่มแตงเทศและแตงไทยด้วยวิธี neighbor joining และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของแตงพันธุ์ปลูกแต่ละคู่ด้วยโมเดล Kimura 2-parameter โดยใช้โปรแกรม MEGA6 [19] ซึ่งโมเดลดังกล่าวนี้มีความถี่ของเบส (base frequency) A, C, G และ T เท่ากัน แต่มีอัตราการแทนที่เบสแบบทรานซิชัน (transition) และทรานส์เวอร์ชัน (transversion) แตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ แฮปโลไทป์ (haplotype network) โดยใช้โปรแกรม TCS [20]

## ผลการทดลอง

ตัวอย่างแตงเทศและแตงไทยพันธุ์เศรษฐกิจจำนวน 18 พันธุ์ปลูกที่นำมาศึกษา ประกอบด้วย *C. melo* var. *cantalupensis* (3 พันธุ์ปลูก) *C. melo* var. *inodorus* (4 พันธุ์ปลูก) *C. melo* var. *reticulatus* (10 พันธุ์ปลูก) และ *C. melo* var. *conomon* (1 พันธุ์ปลูก) การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากตัวอย่างแตงเทศและแตงไทยด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ITS5P และ ITS8P ได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS จากแตงทั้งหมด 18 พันธุ์ปลูก (162 ลำดับนิวคลีโอไทด์) ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยวิเคราะห์ similarity search ด้วยโปรแกรม BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) และทำการวิเคราะห์ความสอดคล้องกัน เพื่อให้ได้ consensus sequence จำนวน 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BioEdit จากนั้นจึงเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวโดยใช้โปรแกรม Clustal X และพบว่า sequence alignment มีความยาว 617 คู่เบส ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์เพียง 7 ตำแหน่งที่มีความแปรผัน ได้แก่ ตำแหน่งที่ 46, 82, 83, 87, 402, 458 และ 598 (รูปที่ 2)

**ตารางที่ 2** รายละเอียดของนิวคลีโอไทด์ 7 ตำแหน่งที่มีความแปรผันในแตงเทศและแตงไทยพันธุ์ปลูกต่างๆ

No.	Cultivar	No. of fifth nucleotide state	Nucleotide position							No. of sequence variation pattern
			46	82	83	87	402	458	598	
1	Amusu	0	C	G	C	C	T	C	G	1
2	Fragrance	0	C	G	G	C	T	C	A	1
3	Hamigua	0	C	G	G	C	T	C	A	1
4	Jade Dew	0	C	A	G	C	T	C	G	1
5	Jing Yuan	0	C	A	G	C	T	C	G	1
6	Onichi	0	C	A	C	T	T	C	A	1
7	Rocky	0	C	G	G	C	T	C	G	1
8	Sunlady	0	C	G	C	C	T	C	A	1
9	Tuscan Style	0	C	G	C	T	A	T	A	1
10	Thai melon	0	T	G	G	C	T	C	A	1
11	Andes	1 (S)	C	G	C, G	C	T	C	A	2
12	Emerald Green	1 (R)	C	A, G	C	C	T	C	G	2
13	Golden Cantaloupe	1 (W)	C	G	C	C	A, T	T	A	2
14	Yubari	1 (S)	C	A	C, G	C	T	C	G	2
15	Andong	2 (Y, Y)	C	G	C	C, T	T	C, T	A	4
16	Homerun	2 (R, S)	C	A, G	C, G	C	T	C	G	4
17	Honey Rock	2 (Y, W)	C	G	C	C, T	A, T	T	A	4
18	Mi Wang	3 (R, Y, Y)	C	A, G	C	C, T	T	C, T	A	8

38

**หมายเหตุ:** Fifth nucleotide states R = A/G, S = C/G, W = A/T, Y = C/T



นอกจากนี้ยังพบว่าจากจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ที่ได้ทั้งหมด 162 ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันรวมทั้งสิ้น 38 ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 2 คือ (1) Amusu, Fragrance, Hamigua, Jade Dew, Jing Yuan, Onichi, Rocky, Sunlady, Tuscan Style และแตงไทย (Thai melon) ไม่มี fifth nucleotide state (ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ พบเฉพาะเบส A/C/G/T) จึงพบลำดับนิวคลีโอไทด์พันธุ์ปลูกละ 1 รูปแบบ (2) Andes, Emerald Green, Golden Cantaloupe และ Yubari มี fifth nucleotide state (R/S/W) 1 ตำแหน่ง จึงพบลำดับนิวคลีโอไทด์พันธุ์ปลูกละ 2 รูปแบบ (3) Andong, Homerun และ Honey Rock มี fifth nucleotide state (R/S/W/Y) 2 ตำแหน่ง จึงพบลำดับนิวคลีโอไทด์พันธุ์ปลูกละ 4 รูปแบบ และ (4) Mi Wang มี fifth nucleotide state 3 ตำแหน่ง (R/Y) จึงพบลำดับนิวคลีโอไทด์ 8 รูปแบบ โดย fifth nucleotide state ที่พบในพันธุ์ปลูกเหล่านี้คือ R = A/G, S = C/G, W = A/T และ Y = C/T

ตารางที่ 3 แฮปโลไทป์ของแตงเทศและแตงไทย และองค์ประกอบในแต่ละแฮปโลไทป์

Haplotype	Cultivar	Variety
H1	Jade Dew, Jing Yuan, Homerun, Yubari	<i>inodorus, reticulatus</i>
H2	Homerun, Rocky	<i>inodorus, reticulatus</i>
H3	Emerald Green, Homerun, Yubari	<i>inodorus, reticulatus</i>
H4	Amusu, Emerald Green, Homerun	<i>cantalupensis, inodorus, reticulatus</i>
H5	Andes, Fragrance, Hamigua	<i>inodorus, reticulatus</i>
H6	Thai melon	<i>conomon</i>
H7	Andes, Andong, Mi Wang, Sunlady	<i>inodorus, reticulatus</i>
H8	Andong, Mi Wang	<i>reticulatus</i>
H9	Mi Wang, Onichi	<i>reticulatus</i>
H10	Mi Wang	<i>reticulatus</i>
H11	Mi Wang	<i>reticulatus</i>
H12	Mi Wang	<i>reticulatus</i>
H13	Andong, Golden Cantaloupe, Honey Rock, Mi Wang	<i>cantalupensis, inodorus, reticulatus</i>
H14	Andong, Honey Rock, Mi Wang	<i>cantalupensis, reticulatus</i>
H15	Golden Cantaloupe, Honey Rock	<i>cantalupensis, inodorus</i>
H16	Honey Rock, Tuscan Style	<i>cantalupensis</i>



การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของแตงพันธุ์ปลูกแต่ละคู่จาก Kimura 2-parameter distance matrix พบว่าอยู่ในช่วง 0-0.98% โดยคู่ที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงที่สุดมีจำนวน 8 คู่ (รูปที่ 3) และเมื่อวิเคราะห์ผลการจัดกลุ่มแตงเทศและแตงไทยที่ศึกษาทั้งหมดด้วยวิธี neighbor joining โดยใช้โปรแกรม MEGA6 จากจำนวนลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 38 ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบการจัดกลุ่มแบ่งเป็น 12 กลุ่ม (รูปที่ 4) โดยพบว่า Mi Wang มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงที่สุด ซึ่งมีจำนวนตัวอย่างกระจายอยู่ถึง 5 กลุ่ม ตามด้วย Andong, Homerun และ Honey Rock

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงเทศและแตงไทยในงานวิจัยนี้ทำโดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแฮปโลไทป์โดยใช้โปรแกรม TCS ซึ่งแฮปโลไทป์ (haplotype) คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบ ณ ตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซม ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละกลุ่มประชากร สิ่งมีชีวิตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันจะมีแฮปโลไทป์ร่วมกัน และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแฮปโลไทป์ระหว่างกลุ่มประชากรจะทำให้ทราบว่าประชากรเหล่านั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด ผลการวิจัยพบว่าแตงเทศและแตงไทยที่ศึกษามีการจัดกลุ่มเป็น 16 แฮปโลไทป์ (H1-H16) (ภาพที่ 5) โดยแต่ละแฮปโลไทป์มีระยะห่างกันเพียง 1 mutational step (เกิดจากการแทนที่ของเบสเพียง 1 เบส) และประกอบด้วยจำนวนพันธุ์ปลูกตั้งแต่ 1-4 พันธุ์ปลูก (ตารางที่ 3) ซึ่งหลายพันธุ์ปลูกมีแอลลีลร่วมกัน (shared allele) ยกเว้นแตงไทย (H6) ที่ไม่มีแอลลีลร่วมกันกับแตงเทศพันธุ์ปลูกอื่นๆ แต่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ Andes, Fragrance, และ Hamigua (H5) นอกจากนี้ยังพบว่าแตงเทศพันธุ์ปลูกที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ ITS สูงที่สุด ได้แก่ Mi Wang ซึ่งมีแอลลีลกระจายอยู่ใน 8 แฮปโลไทป์ (H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14) ตามด้วย Andong, Homerun และ Honey Rock ซึ่งแต่ละพันธุ์ปลูกมีแอลลีลกระจายอยู่ใน 4 แฮปโลไทป์ ส่วนแตงเทศพันธุ์ปลูกที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ได้แก่ Amusu, Fragrance, Hamigua, Jade Dew, Jing Yuan, Onichi, Rocky, Sunlady และ Tuscan Style โดยพันธุ์ปลูกเหล่านี้มีแอลลีลเพียง 1 รูปแบบที่พบอยู่ใน 1 แฮปโลไทป์เท่านั้น ตัวอย่างของแตงเทศจากทวีปเอเชีย อเมริกา และออสเตรเลียที่นำมาศึกษาไม่สามารถแยกเป็นกลุ่มตามพันธุ์ได้ โดยพบว่ามีกระจายของ *C. melo* var. *cantalupensis*, *C. melo* var. *inodorus* และ *C. melo* var. *reticulatus* มากกว่า 1 พันธุ์ใน 9 แฮปโลไทป์ (H1-H5, H7, H13-H15)

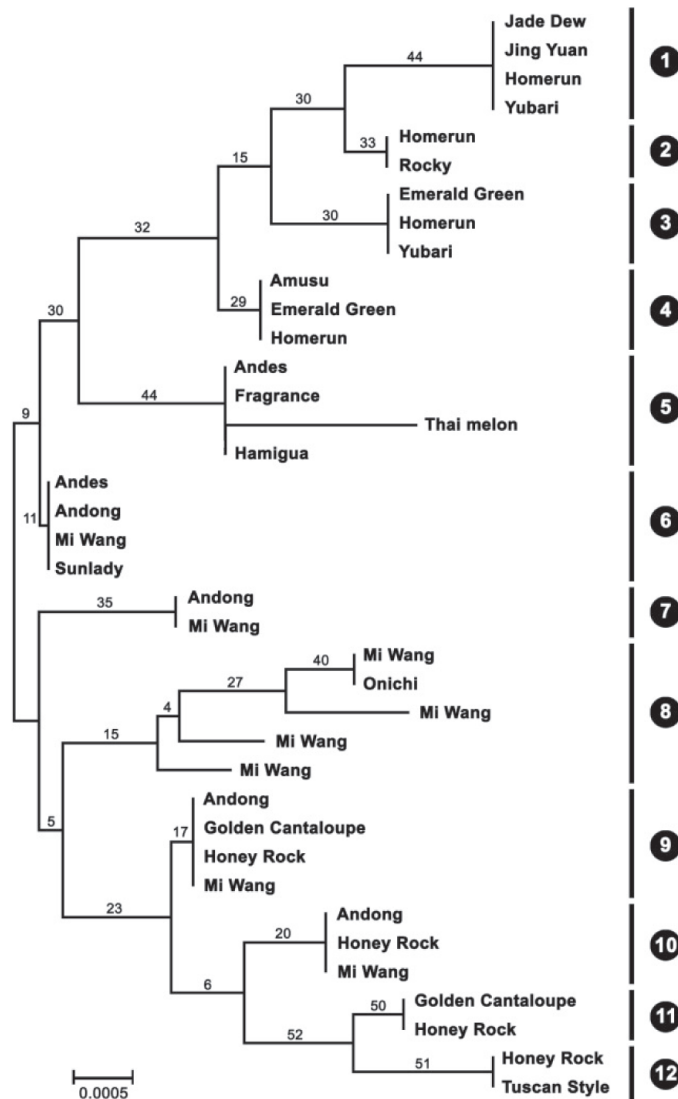
## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผสมแตงเทศพันธุ์ต่างๆ ทำให้เกิดพันธุ์ปลูกหลากหลายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ซึ่งพันธุ์ปลูกเหล่านี้อาจมีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมด้วย [21] จากพืชทั้งหมดในสกุล *Cucumis* พบว่าแตงเทศมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยามากที่สุด [22] และมีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงเทศด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ภายในชนิดของแตงเทศจากแหล่งกำเนิดต่างๆ กัน เช่น การใช้เทคนิค AFLP (amplified fragment length polymorphism) และ RFLP (restriction fragment length polymorphism) [23], RAPD (random amplified polymorphic DNA) [24-28] และ SSR (simple sequence repeat) [29-33]



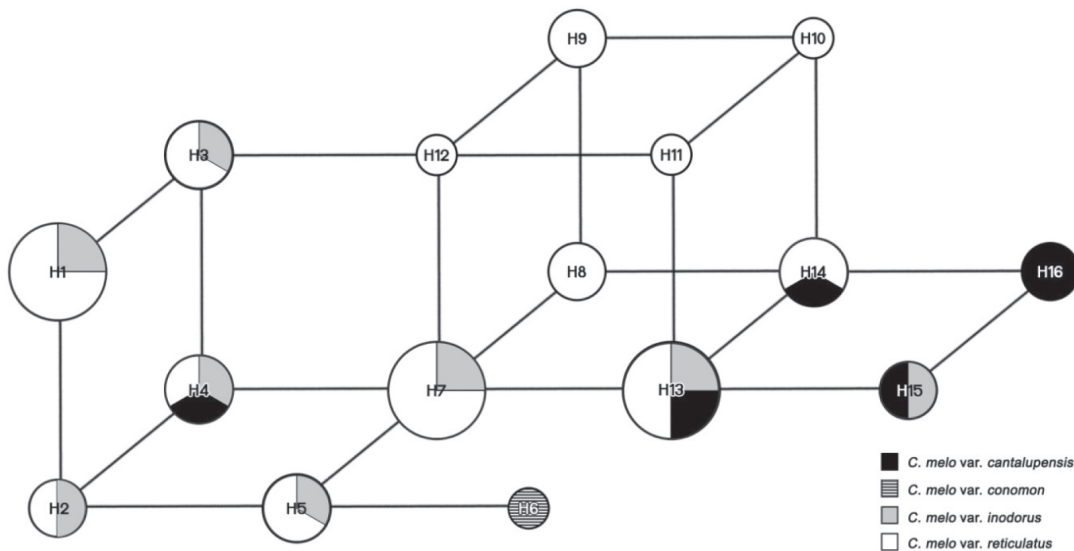






รูปที่ 4 Neighbor joining tree ซึ่งวิเคราะห์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแตงเทศและแตงไทย โดยตัวเลขที่แสดงบนกิ่งคือ bootstrap value (%) จากจำนวน 1,000 ซ้ำ

การศึกษานี้ได้ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของตัวอย่างแตงเทศและแตงไทย พันธุ์เศรษฐกิจจำนวน 18 พันธุ์ปลูก และได้ PCR product ขนาดใกล้เคียงกับของพืชในสกุล *Cucumis* ที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ [9] และการวิเคราะห์ความแปรผันของ consensus sequence ในบริเวณ ITS ที่มีความยาว 617 คู่เบส พบว่าภายในชนิดของ *C. melo* มีความแตกต่างกัน (intraspecific variation) ไม่เกิน 1.1% (7 ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันจากทั้งหมด 617 คู่เบส) ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้ใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของแตงพันธุ์ปลูกแต่ละคู่ที่ได้จากโมเดล Kimura 2-parameter ที่มีค่าไม่เกิน 0.98% ถึงแม้ว่าภายในแต่ละพันธุ์ปลูกจะมีรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ที่แตกต่างกันได้มากถึง 8 รูปแบบ



**รูปที่ 5** ความสัมพันธ์ระหว่างแฮปโลไทป์ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแตงเทศและแตงไทย ขนาดวงกลมแสดงตามสัดส่วนของจำนวนสมาชิกในแต่ละแฮปโลไทป์ หมายเลขในวงกลมคือชื่อแฮปโลไทป์ และเส้นที่เชื่อมระหว่างแฮปโลไทป์คือ mutational step

ในการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตโดยวิธี neighbor joining เป็นการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละคู่ และเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของคู่สิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุดตามด้วยสิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากขึ้นตามลำดับ และใช้การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อทดสอบความเชื่อมั่นของความสัมพันธ์ดังกล่าวอย่างไรก็ดีในงานวิจัยนี้การจัดกลุ่มแตงเทศและแตงไทยด้วยวิธี neighbor joining พบการจัดกลุ่มแบ่งเป็น 12 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติต่ำ (bootstrap value  $\leq 52\%$ ) ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างแตงเทศและแตงไทยมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก ดังเช่นที่พบในการศึกษาของ Ghebretinsae และคณะ [9] Renner และคณะ [10] Sebastain และคณะ [11] และ Szabó และคณะ [12] นอกจากนี้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงเทศและแตงไทยด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแฮปโลไทป์ยังบ่งชี้ว่าแตงเทศหลายพันธุ์ปลูกมีการถ่ายเทยีน (gene flow) และแลกเปลี่ยนยีน (genetic recombination) แต่ไม่มีแอลลีลร่วมกันกับแตงไทย ดังนั้นจึงพบว่าแตงไทยซึ่งจัดอยู่ในชนิดย่อย *C. melo* ssp. *agretis* จะมีแฮปโลไทป์หรือโครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะ และมีประวัติการเพาะปลูกที่ยาวนานในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ [22] ซึ่งต่างจาก *C. melo* ssp. *melo* ที่พบการเพาะปลูกระบบเกษตรเชิงเดี่ยวในแถบอเมริกา ยุโรป และเอเชีย ถึงแม้แตงเทศหลายพันธุ์ปลูกจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ความคล้ายคลึงกันของพันธุกรรมอาจเกิดขึ้นเนื่องจากมนุษย์ได้คัดเลือกลักษณะที่ตรงตามความต้องการของตลาดและปรับปรุงพันธุ์ในเวลาอันสั้น แตงเทศพันธุ์ปลูกต่างๆ จึงสามารถผสมข้ามได้โดยไม่พบการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ (genetic isolation) การคัดเลือกดังกล่าวนี้ทำให้แอลลีลจำนวนน้อยได้รับการถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่น แต่ยังคงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมได้ [31-32, 34-35]

ในการศึกษานี้พบว่าการจัดกลุ่มของแตงเทศและแตงไทยด้วยวิธี neighbor joining มีความสอดคล้องกับรูปแบบของแฮปโลไทป์ส่วนใหญ่ ยกเว้น กลุ่มที่ 5 ซึ่งกระจายเป็น 2 แฮปโลไทป์ (H5-H6) และกลุ่มที่ 8 ซึ่งกระจายเป็น 4 แฮปโลไทป์ (H9-H12) ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ ITS ในแต่ละพันธุ์ปลูกพบว่า Mi Wang มีฐานพันธุกรรมที่กว้างที่สุด โดยพบการกระจายของรูปแบบของ ITS ที่มีความแตกต่างกันของ Mi Wang ในแตงเทศหลายพันธุ์ปลูกที่ทำการศึกษา ยกเว้นใน Amusu, Emerald Green, Homerun, Jade Dew, Jing Yuan, Rocky และ Yubari รวมทั้งในแตงไทยด้วยลักษณะที่ดีของ Mi Wang ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้แก่พันธุ์ปลูกต่างๆที่กล่าวมานี้ เพื่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้ได้แตงเทศพันธุ์ปลูกใหม่ๆที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงขึ้น นอกจากนี้แตงไทยซึ่งมีโครงสร้างทางพันธุกรรมที่จำเพาะ ยังมีรายงานว่ามีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลงค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับแตงเศรษฐกิจอื่นๆ [36] ดังนั้นหากมีการใช้แตงไทยเพื่อเป็นต้นตอให้ยอดพันธุ์ดีของแตงเทศที่มีความต้านทานต่อโรคต่ำ พร้อมทั้งคัดเลือกลักษณะที่ดีของแตงไทยเพื่อปรับปรุงให้ตรงกับที่ตลาดต้องการก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชพื้นเมืองนี้ให้สามารถแข่งขันกับพืชวงศ์แตงกลุ่มอื่นๆ ได้

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2560

## เอกสารอ้างอิง

1. Kerje, T., and Grum, M. 2000. The Origin of Melon, *Cucumis melo*: A Review of the Literature. *Acta Horticulturae*. 510: 37-44.
2. Kirkbride, J.H. 1993. Biosystematic Monograph of the Genus *Cucumis* (Cucurbitaceae), Botanical Identification of Cucumbers and Melons. North Carolina. Parkway Publishers.
3. Pitrat, M., Hanelt, P., and Hammer, K. 2000. Some Comments on Intraspecific Classification of Cultivars of Melon. *Acta Horticulturae*. 510: 29-36.
4. Perpiñá, G., Esteras, C., Gibon, Y., Monforte, A.J., and Pic?, B. 2016. A New Genomic Library of Melon Introgression Lines in a Cantaloupe Genetic Background for Dissecting Desirable Agronomical Traits. *BMC Plant Biology*. 16(1): 154.
5. Department of Agricultural Extension. 2017. Agricultural Production Information System. Available from URL: <http://production.doae.go.th>. 14 June 2017.
6. Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. and Donoghue, M.J. 1995. The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82(2): 247-277.
7. Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear

- Ribosomal DNA in Plants: an Example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1(1): 3-16.
8. Álvarez, I., and Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS Sequences and Plant Phylogenetic Inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29(3): 417-434.
  9. Ghebretinsae, A.G., Thulin, M., and Barber, J.C. 2007. Relationships of Cucumbers and Melons Unraveled: Molecular Phylogenetics of *Cucumis* and Related Genera (Benincaseae, Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*. 94(7): 1256-1266.
  10. Renner, S.S., Schaefer, H., and Kocyan, A. 2007. Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian Clade Far from Melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*. 7: 58.
  11. Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I.R.H., and Renner, S.S. 2010. Cucumber (*Cucumis sativus*) and Melon (*C. melo*) have Numerous Wild Relatives in Asia and Australia, and the Sister Species of Melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 107(32): 14269-14273.
  12. Szabó, Z., Gyulai, G., Tóth, Z., and Heszky, L. 2008. Morphological and Molecular Diversity of 47 Melon (*Cucumis melo*) Cultivars Compared to an Extinct Landrace Excavated from the 15<sup>th</sup> Century. In: Pitrat M., Editor. Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IX<sup>th</sup> EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae, 21-24 May 2008, Avignon. France. p. 313-321.
  13. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry Bulletin*. 19: 11-15.
  14. Möller, M., and Cronk, Q.C.B. 1997. Origin and Relationships of Saintpaulia (Gesneriaceae) Based on Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. *American Journal of Botany*. 84(8): 956-965.
  15. Green, M.R., and Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 4<sup>th</sup> Edition New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  16. Promega. 2015. Technical Manual pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems Instructions for Use of Products. Wisconsin. Promega Corporation.
  17. Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
  18. Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1998. Multiple Sequence Alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23(10): 403-405.



19. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
20. Clement, M., Posada, D., and Crandall, K.A. 2000. TCS: a Computer Program to Estimate Gene Genealogies. *Molecular Ecology*. 9(10): 1657-1659.
21. de Vienne, D. 2003. *Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology*. New Hampshire. Science Publishers Inc.
22. Stepansky, A., Kovalski, I., and Perl-Treves, R. 1999. Intraspecific Classification of Melons (*Cucumis melo* L.) in View of their Phenotypic and Molecular Variation. *Plant Systematics and Evolution*. 217(3): 313-332.
23. Garcia-Mas, J., Oliver, M., Gómez-Paniagua, H., and de Vicente, M.C. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP Markers for Measuring Genetic Diversity in Melon. *Theoretical and Applied Genetics*. 101(5): 860-864.
24. Mliki, A., Staub, J.E., Sun Z.Y., and Ghorbel, A. 2001. Genetic Diversity in Melon (*Cucumis melo* L.): An Evaluation of African Germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 48(6): 587-597.
25. López-Sesé, A.I., Staub, J.E., and Gómez-Guillamón, M.L. 2003. Genetic Analysis of Spanish Melon (*Cucumis melo* L.) Germplasm Using a Standardized Molecular-Marker Array and Geographically Diverse Reference Accessions. *Theoretical and Applied Genetics*. 108(1): 41-52.
26. Staub, J.E., López-Sesé, A.I., and Fanourakis, N. 2004. Diversity among Melon Landraces (*Cucumis melo* L.) from Greece and Their Genetic Relationships with Other Melon Germplasm of Diverse Origins. *Euphytica*. 136(2): 151-166.
27. Sensoy, S., Büyükalaca, S., and Abak, K. 2007. Evaluation of Genetic Diversity in Turkish Melons (*Cucumis melo* L.) Based on Phenotypic Characters and RAPD Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54(6): 1351-1365.
28. Tanaka, K., Nishitani, A., Akashi, Y., Sakata, Y., Nishida, H., Yoshino, H., and Kato, K. 2007. Molecular Characterization of South and East Asian Melon, *Cucumis melo* L., and the Origin of Group Conomon var. *makuwa* and var. *conomon* Revealed by RAPD Analysis. *Euphytica*. 153(1): 233-247.
29. Monforte, A.J., Garcia-Mas, J., and Arus, P. 2003. Genetic Variability in Melon Based on Microsatellite Variation. *Plant Breeding*. 122(2): 153-157.
30. Nakata, E., Staub, J.E., López-Sesé, A.I., and Katzir, N. 2005. Genetic Diversity of Japanese Melon Cultivars (*Cucumis melo* L.) as Assessed by Random Amplified Polymorphic DNA and Simple Sequence Repeat Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 52(4): 405-419.

31. Tzitzikas, E.N., Monforte, A.J., Fatihi, A., Kypriotakis, Z., Iacovides, T.A., Ioannides, I.M., and Kalaitzis, P. 2009. Genetic Diversity and Population Structure of Traditional Greek and Cypriot Melon Cultigens (*Cucumis melo* L) Based on Simple Sequence Repeat Variability. *HortScience*. 44(7): 1820-1824.
32. Raghani, M., López-Sesé, A.I., Hasandokht, M.R., Zamani, Z., Moghadam, M.R.F., and Kashi, A. 2014. Genetic Diversity among Melon Accessions from Iran and Their Relationships with Melon Germplasm of Diverse Origins Using Microsatellite Markers. *Plant Systematics and Evolution*. 300(1): 139-151.
33. Trimech, R., Afif, M., and Boussaid, M. 2015. Genetic Diversity of Tunisian Melon (*Cucumis melo* L.) Landraces and Their Relationships with Introduced Varieties as Assessed by Simple-Sequence Repeat (SSR) Markers. *African Journal of Biotechnology*. 14(2): 86-95.
34. Garg, N., Sidhu, A.S., and Cheema, D.S. 2007. Systematics of the Genus *Cucumis* : A Review of Literature. *Haryana Journal of Horticulture Science*. 36(1&2): 192-197.
35. Yildiz, M., Akgul, N., and Sensoy, S. 2014. Morphological and Molecular Characterization of Turkish Landraces of *Cucumis melo* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 42(1): 51-58.
36. Pitrat, M. 2013. Phenotypic Diversity in Wild and Cultivated Melons (*Cucumis melo*). *Plant Biotechnology*. 30(3): 273-278.

ได้รับบทความวันที่ 26 มิถุนายน 2560  
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 18 กันยายน 2560

