รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2558

---

1. ชุดโครงการวิจัย :วิจัยและพัฒนากาแฟ

2. โครงการวิจัย :การปรับปรุงพันธุ์กาแฟ

กิจกรรม :ที่ 2 การปรับปรุงพันธุ์กาแฟอะราบิกา

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) :ที่ 2.2 การศึกษาปฏิกิริยาและคัดเลือกพันธุ์ของกาแฟสายพันธุ์ลูกผสมต่อโรคราสนิม

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) :ที่ 2.4.2 ฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกาแฟอะราบิกาในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ):Trial 2.4.2 DNA Fingerprinting Database of Arabica coffee (*Coffee arabica* L.) for introduced variety

รหัสการทดลอง : 01-27-54-01-02-04-02-55

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุจีรัตน์ สงวนรังศิริกุล ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ผู้ร่วมงาน : นางสาวฉัตต์นภา ข่มอาวุธ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

5. บทคัดย่อ :

การทำฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกาแฟอะราบิกามีวัตถุประสงค์เพื่อนำมาใช้เป็นแบบมาตรฐานพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอสำหรับแทนหรือประกอบกับข้อมูลลักษณะภายนอก ในการเปรียบเทียบพันธุ์ จำแนกสายพันธุ์ และเป็นฐานข้อมูลพันธุกรรมสำหรับรองรับการวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์ จากที่ได้มีการศึกษาและจำแนกกาแฟพันธุ์อะราบิกาที่สำรวจรวบรวมมาจากศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ จำนวน 157 สายพันธุ์ ด้วยการประยุกต์เทคนิคการจำแนกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSR โดยใช้ไพร์เมอร์จำนวน 17 คู่ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองดีเอ็นเอ (PCR) วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้บน 6% Acrylamide gel ย้อมด้วยสีเจลด้วยเทคนิค Silver Stain พบว่าสามารถตรวจจับแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 32 ตำแหน่ง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่ากาแฟพันธุ์อะราบิกาที่ศึกษามีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.52 (52%) ถึง 1.00 (100 %) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.76 (76%) แสดงให้เห็นความกว้างทางฐานพันธุกรรมของตัวอย่างพันธุ์ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 157 สายพันธุ์ ที่ระดับ GS เท่ากับ 0.616 (61.6%) การวิเคราะห์โครงสร้างของ Dendrogram พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกาแฟได้ 4 โดยกลุ่มที่ 1 มีความใกล้ชิด 64% กลุ่มที่ 2 มีความใกล้ชิด 61.4% กลุ่มที่ 3 มีความใกล้ชิด 76% ในขณะที่กลุ่มที่ 4 มีความใกล้ชิด 66.4% ต่อมาได้พัฒนาวิธีการและตรวจยีนทนโรคราสนิม Sh3 เนื่องจากพบว่า ยีน Sh3 มีประสิทธิภาพในการทนต่อโรคราสนิมมากกว่ายีนอื่น ในพันธุ์กาแฟที่รวบรวมไว้ด้วยเทคนิค melting temperature analysis ด้วย ดีเอ็นเอมาร์เกอร์ BA-124-12K-f และ Sat244 และมีประสิทธิภาพ และแม่นยำกว่าการใช้ gel electrophoresis ซึ่งไม่พบ Sh3 gene ในลูกผสม (Arabica x Robusta) 25

accessions ด้วยวิธี melting temperature การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟพันธุ์ เชียงใหม่ 80 เปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นได้แก่ พันธุ์ Robusta พันธุ์ Liberica และพันธุ์ Typica ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 17 คู่ ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 กับพันธุ์ดังกล่าว โดยมีไพร์เมอร์ 3 คู่ได้แก่ 048, 058 และ 069 ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอในพันธุ์เชียงใหม่ 80 ได้ มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ และมีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากกาแฟอีก 3 พันธุ์ที่ทดสอบ การทดสอบและคัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์จำนวน 10 คู่ผสม โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 17 คู่ ในการจำแนกความแตกต่าง พบว่าแต่ละคู่ผสมมีไพร์เมอร์ที่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งต่างกันระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ได้ ที่แสดงถึงตำแหน่งดีเอนเอที่พบเพียงในพ่อหรือในแม่เท่านั้น ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ต่างหมายเลขกัน และพบว่าไพร์เมอร์บางหมายเลขสามารถแสดงรูปแบบดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ได้ โดยตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างพ่อและแม่จะถูกใช้ในการตรวจในลูกผสม และสามารถตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่พันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR จากที่การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ชนิด SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง พบว่า บางตำแหน่งแสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ในคู่ผสมพันธุ์ต่างๆ ซึ่งตำแหน่งที่แตกต่างเหล่านี้ ถูกนำใช้ในการตรวจลูกผสมของคู่ผสมต่างๆ โดยใช้เทคนิค Electrophoresis ใน 2% agarose พบว่า มีลูกผสมชั่วที่ 1 ที่แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ทั้งในพ่อและแม่พันธุ์ จำนวน 7 คู่ผสม 8 สายต้น ได้แก่ (1) ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Caturra vermelho x K7 จำนวน 2 สายต้น ได้แก่ รหัส 1/1B2T5 และ 1/4B3T3 (2) ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Caturra vermelho x Sanramon จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/8B1T3 (3) ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Colombia (Colchin) x H.420/9 ML2/4-78-62-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/22B2T5 (4) ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Typica x Catimor CIFC 7963-661-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/27B4T5 (5) ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง H.528/46 ML2/10-29-65-29 x SL6 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/34B4T6 (6) ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Sanramon x H.528/46 ML2/10-29-65-29 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 3/2B7T7 (7) ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Sanramon x H.420/9 ML2/4-78-62-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 3/5B7T1

6. คำนำ:

กาแฟอะราบิกา (Arabica coffee: *Coffee arabica* L.) ที่ปลูกในปัจจุบัน เป็นพันธุ์ที่ได้มาจากการนำเข้ามาจากต่างประเทศ และปลูกทดสอบในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2518-2545 จนกระทั่งได้พันธุ์ที่ที่มีการปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีโครงการปรับปรุงพันธุ์กาแฟอะราบิกา เพื่อหาพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นของประเทศไทย ประกอบกับไม่สามารถนำเข้าพันธุ์จากต่างประเทศมาปลูกทดสอบเหมือนในอดีต การปรับปรุงพันธุ์กาแฟอะราบิกาส่วนใหญ่ยังคงใช้วิธีการดั้งเดิมในการสร้างและคัดเลือกลูกผสม ซึ่งใช้การคัดเลือกจากลักษณะภายนอก ต้องใช้เวลา ประมาณ 1-2 ปี ในการรอให้ต้นโต ออกดอก และให้ผลผลิต จึงสามารถคัดเลือกได้ว่าต้นใดเป็นต้นลูกผสม แต่เนื่องจากฐานพันธุกรรมของกาแฟชนิดนี้ค่อนข้างแคบ (Leroy., *et al*, 2006) ซึ่งนอกจากจะส่งผลต่อการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ยังแยกความแตกต่างด้วยลักษณะภายนอกได้ยาก ปัจจุบันงานวิจัยด้านการใช้โมเลกุลเครื่องหมายได้มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว มีการนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง ในหลายๆ พืช สำหรับกาแฟได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้เพื่อจุดประสงค์ต่างๆ อาทิเช่น จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม

รวบรวมเชื้อพันธุกรรม ตรวจสอบความกว้างของฐานพันธุกรรม ตรวจสอบการส่งข้ามยีน (gene introgression) จากการผสมข้ามชนิด คัดเลือกลูกผสม และคัดเลือกต้นต้านทานโรค ได้มีการนำเทคนิคด้านโมเลกุลเครื่องหมายต่างๆ มาใช้ในการศึกษาคุณภาพของกาแฟ (Coffee quality) มีการศึกษาแผนที่พันธุกรรมเพื่อช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์กาแฟได้ตรงตามเป้าหมาย โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายทั้งชนิด co-dominant marker และ multi-allelic marker เพื่อให้กระจายตัวบนจีโนมของกาแฟได้อย่างทั่วถึง (Combes et al., 2000; Dufour et al., 2001; Baruah et al., 2003; Moncada and Mc Couch, 2004; Poncet et al., 2004; Bhat et al., 2005) ปัจจุบันมีการสร้างแผนที่พันธุกรรมของกาแฟบางชนิดแล้ว เช่น *C. canephora* ซึ่งมีการศึกษาโดยนักวิจัยหลายกลุ่ม อาทิเช่น Lashermes และคณะ (2001), Paillard และคณะ (1996) และ Crouzillat และคณะ (2004) นอกจากนี้ยังมีการสร้าง interspecific genetic maps ของคู่ผสมกลุ่มต่างๆ เช่น คู่ผสม *C. canephora* x *C. heterocalix* โดย Coulibaly และคณะ (2003) *C. pseudozanguebariae* x *C. Liberica* โดย Ky และคณะ (2000b) และ *C. liberica* x *C. canephora* โดย N'Diaye (2005) แต่การศึกษาแผนที่พันธุกรรมของ *C. arabica* ยังไม่มีรายงานมากนัก เนื่องจากตัวพืชเป็นชนิด polyploidy และมีพันธุกรรมที่แคบ อย่างไรก็ตามในปี 2004 Pearl และคณะ ก็ได้รายงานแผนที่พันธุกรรมของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ Catimor และ Mokka นอกจากการศึกษาแผนที่พันธุกรรมแล้ว ยังมีการนำโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้ในงาน QTL (Quantitative Trait Loci) เพื่อคัดเลือกลูกผสม ตัวอย่างเช่น การใช้ QTL marker ในการคัดเลือกลูกผสมระหว่าง *C. liberica* 'dewevrei' และ *C. pseudozanguebariae* ที่มีปริมาณ trigonelline ที่แตกต่างกัน (Ky et al., 2001b) หรือปริมาณ chlorogenic acid (Campa et al., 2003) เป็นต้น นอกจากนี้ขณะนี้ยังมีการศึกษา QTL mapping สำหรับลักษณะทางคุณภาพต่างๆ ของ C. canephora อีกด้วย จะเห็นได้ว่าในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลและโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้กันอย่างแพร่หลายในกาแฟ Bergamin-Filno (1976) and Eskes (1983) รายงานว่า Sh3 gene มีประสิทธิภาพในการทนต่อโรคราสนิมมากกว่ายีนอื่น และในปี 2011, Prakash และคณะ ได้มีการนำดีเอ็นเอมาร์คเกอร์ 2 ชนิด มาใช้ในการสำรวจหาพันธุ์กาแฟในแหล่งรวบรวมพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดยีน Sh3 โดยพบว่า ดีเอ็นเอมาร์เกอร์ BA-124-12K-f สามารถใช้ตรวจหายีน Sh3 ในตัวอย่างได้ และดีเอ็นเอมาร์เกอร์ Sat244 สามารถระบุถึงสภาวะโฮโมไซกัส (Homozygous) หรือเฮทเทอโรไซกัส (Heterozygous) ได้โดยการใช้ polyacrylamide gel ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะนำเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือกลูกผสมซึ่งจะทำให้งานปรับปรุงพันธุ์กาแฟดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถคัดเลือกต้นลูกผสมที่แท้จริงระหว่างคู่ผสมนั้นๆ ได้ ซึ่งจะช่วยย่นระยะเวลา พื้นที่ และงบประมาณในการปลูก ดูแลรักษาต้นลูกผสมที่ต้องการได้

7. วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ใบกาแฟอะราบิกา จากต้นที่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และนำมาปลูกคัดเลือกในประเทศไทย ต่อมาได้นำมาผสมพันธุ์ จนได้ลูกผสมชั่วที่ 1 แบ่งเป็นกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มพ่อแม่พันธุ์จำนวน 30 ตัวอย่าง กลุ่มลูกผสมจำนวน 25 สายต้น กลุ่มพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคราสนิม 30 สายต้น และกลุ่มพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราสนิม 3 สายต้น

2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องพีซีอาร์, เครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ, เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง, อ่างทำน้ำร้อน,โกร่งบดยา, ถังไนโตรเจนเหลว, หลอดปั่นแยกตะกอน, ปิเปตดูดสารปรับปริมาตรได้, เครื่องนาโนดรอป

3. สารเคมี ได้แก่ Tris- base , Glycine , Boric acid, Loading dye, DNA ladder, Ethidium bromide, Agarose , PVP- 40T , 2-Mercaptoethanol, Cetyltrimethylamonium bromide, Chlorofrom , Isoamyl alcohol , Absolute ethanol, Ammonium acetate, Ethylene diamine tetraacetate , Taq DNA polymerase (Fermetas, EU), dNTPs, ไพรเมอร์

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบกาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ต่างๆ
2. นำไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Li and Midmore
3. ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต
4. บันทึกข้อมูลโดยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอและพิมพ์ผลการทดลองด้วยกระดาษพิมพ์ผลดีเอ็นเอ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ :
1. แปลงรวบรวมพันธุ์กาแฟอะราบิกาที่ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง) จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จ.เชียงใหม่

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากที่ได้มีการศึกษาและจำแนกกาแฟพันธุ์อะราบิกา ที่สำรวจรวบรวมมาจากศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ จำนวน 157 สายพันธุ์ ด้วยการประยุกต์เทคนิคการจำแนกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSR โดยใช้ไพร์เมอร์ จำนวน 17 คู่ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองดีเอ็นเอ (PCR) วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้บน 6% Acrylamide gel ย้อมด้วยสีเจลด้วยเทคนิค Silver Stain พบว่าสามารถตรวจจับแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 32 ตำแหน่ง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่ากาแฟพันธุ์อะราบิกาที่ศึกษามีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.52 (52%) ถึง 1.00 (100 %) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.76 (76%) แสดงให้เห็นความกว้างทางฐานพันธุกรรมของตัวอย่างพันธุ์ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 157 สายพันธุ์ ที่ระดับ GS เท่ากับ 0.616 (61.6%) การวิเคราะห์โครงสร้างของ Dendrogram พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกาแฟได้ 4 โดยกลุ่มที่ 1 มีความใกล้ชิด 64% กลุ่มที่ 2 มีความใกล้ชิด 61.4% กลุ่มที่ 3 มีความใกล้ชิด 76% ในขณะที่กลุ่มที่ 4 มีความใกล้ชิด 66.4% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการประยุกต์วิธีการจำแนกพันธุ์ด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSR สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์กาแฟได้ ดังนั้นจึงใช้เทคนิคดังกล่าวในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ พบว่า

การตรวจสอบยีนต้านทาน SH3 ในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคราสนิมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบกาแฟ (ดัดแปลงจาก Li,M and Midmore, 1999.) บดตัวอย่างใบกาแฟด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (ตัวอย่าง 0.1 กรัม : extraction buffer 800 ไมโครลิตร) จากนั้นเติมextraction buffer ลงในโกร่งบดตัวอย่าง (ประมาณ 2,400 ไมโครลิตร) บดใน extractionbuffer อีกรอบ ดูดตัวอย่างจากโกร่งลงในหลอด Micro tube นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60-65 °C ประมาณ 30 นาที , ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสลงในหลอด Micro tube ใหม่ เติม dicholomethan:Isoamly (24:1) 500 µl (invert) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสลงใน Micro tube ใหม่ เติม Isopropanol 600 µl(invert) เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ,ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว12,000 รอบ/นาที, 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยethanol 70 % 500 µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว12,000 รอบ/นาที, 1 นาที(3 รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O) 180 µl เพื่อให้ดีเอ็นเอละลาย หลังจากนั้นเติมเกลือ (5 M NaCl) 20 µl เขย่าให้เข้ากันเบาๆแล้วเติม ethanol 95% 200 µl เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ (invert)ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเอ็นเอด้วย ethanol 70 % 500 µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที, 1 นาที (3 รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ก่อนละลายด้วย TE + RNase40-50 µlตรวจดูความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop

การเตรียมสารสกัดดีเอ็นเอ (Extraction buffer) (Doyle &Meili buffer) 2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.02 M EDTA pH 8.0, 1% PVP-40T, 2-Mercaptone Ethanol และ 1.4 M NaCl

ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบมี 2 คู่ คือ

ที่	Primer	Sequence
1	BA-124-12K-f F	5’-TGA TTT CGC TTG TTG TCG AG -3’
2	BA-124-12K-f R	5’-TGC AGA TTG ATG GCA CGT TA -3’

3	Sat244 F	5'-GCA TGT GCT TTT TGA TGT CGT -3'
4	Sat244 R	5'-GCA TAC TAA GGA AAT TAT CTG ACT GCT -3'

เทคนิคทาง PCR (Polymerase Chain Reaction)

โดยเตรียมหลอด PCR Tube ตามจำนวนตัวอย่าง เจือจางดีเอ็นเอในอัตราส่วน 100 นาโนกรัมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอด PCR Tube ดูดดีเอ็นเอต้นแบบลงไปหลอดละ 3 µl|ซึ่งใช้ปริมาตรreaction 15 µl,เสร็จแล้วปิดฝาหลอดพักทิ้งไว้ จากนั้นเตรียม master mix โดยดูดReaction ทั้งหมดลงในหลอด Micro tube ได้แก่ H_2O7.9 µl|, 10X buffer 1.5 µl|, 2.5 mMdNTP mix 1.2 µl|, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 µl|, 10 µM F Primer 0.3 µl|, 10 µM R Primer0.3 µl|, *Taq* polymerase 0.2 µl|, Mix แล้วดูดลงในหลอด PCR Tube ที่พักทิ้งไว้หลอดละ12 µl|และ เติม Mineral oil 1 หยดก่อนนำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้

<u>1. Condition PCR</u> ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

<u>Reaction mix 15µl| (Condition PCR ครั้งที่ 1)</u>

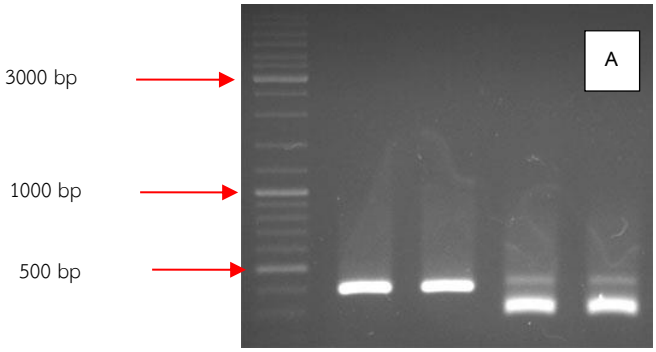
H_2O	7.9 µl|
10X buffer	1.5 µl|
2.5 mMdNTP mix	1.2 µl|
25 mM $MgCl_2$	0.6 µl|
10 µM F Primer	0.3 µl|
10 µM R Primer	0.3 µl
Taq polymerase 5U/µl|	0.2 µl|
DNA template	3 µl|
Mineral Oil	

<u>Condition PCR</u>

Pre denaturation	94 °C	5 นาที	
Denaturation	94 °C	40 วินาที	35 Cycle
Annealing	48 °C	1 นาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Long Extension	72 °C	10 นาที	
Hold	25 °C	∞	

หลังจากนั้นตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.0% ได้ผลดังรูป

BA **Sat**



<u>รูปภาพ A</u> PCR products ตัวอย่างกาแฟที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresisโดยใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ ทดสอบ คือ BA-124-12K-f F, BA-124-12K-f Rและ Sat244 F, Sat244 R

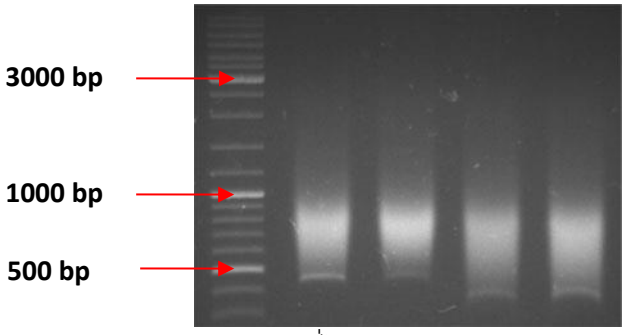
<u>Reaction mix 15µl(Condition PCR ครั้งที่ 2)</u>

H_2O	7.9µl
10X buffer	1.5µl
2.5 mMdNTP mix	1.2µl
25 mM $MgCl_2$	0.6µl
10 µM F Primer	0.3µl
10 µM R Primer	0.3 µl
Taq polymerase 5U/µl	0.2µl
DNA template	3 µl
Mineral Oil	

<u>Condition PCR</u>

Pre denaturation	94 °C	5 นาที	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	35 Cycle
Annealing	52 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	45 วินาที	
Long Extension	72 °C	7 นาที	
Hold	25 °C	∞	

หลังจากนั้นตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.0% ได้ผลดังรูป



<u>รูปภาพ B</u> PCR productsตัวอย่างกาแฟที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresisใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ ทดสอบ คือ BA-124-12K-f F, BA-124-12K-f Rและ Sat244 F, Sat244 R

<u>Reaction mix 15µl(Condition PCR ครั้งที่ 3)</u>

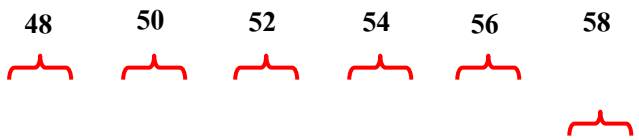
H_2O	7.9µl
10X buffer	1.5µl
2.5 mMdNTP mix	1.2µl
25 mM $MgCl_2$	0.6µl
10 µM F Primer	0.3µl
10 µM R Primer	0.3 µl
Taq polymerase 5U/µl	0.2µl
DNA template	3 µl
Mineral Oil	

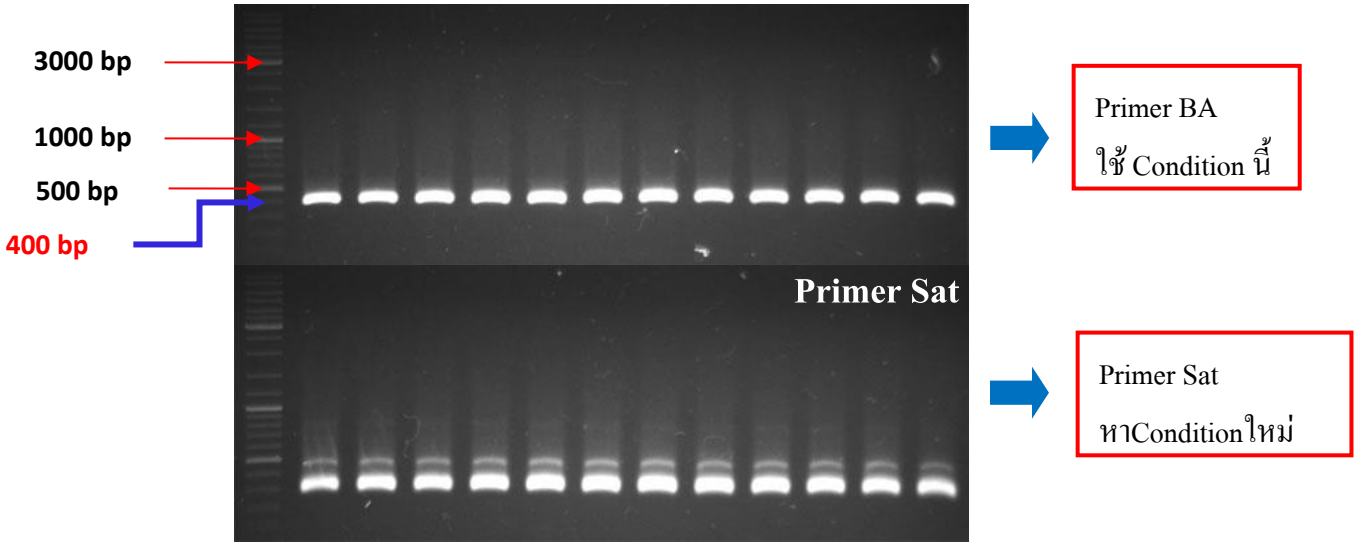
Vary อุณหภูมิ Annealing 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C และ 58°Cตามลำดับ

<u>Condition PCR</u>

Pre denaturation	94 °C	5 นาที	
Denaturation	94 °C	40 วินาที	35 Cycle
Annealing	48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C	1 นาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Long Extension	72 °C	7นาที	
Hold	25 °C	∞	

หลังจากนั้นตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของAgarose gel 1.0%





Reaction mix 15µl (Condition PCR ครั้งที่ 4)

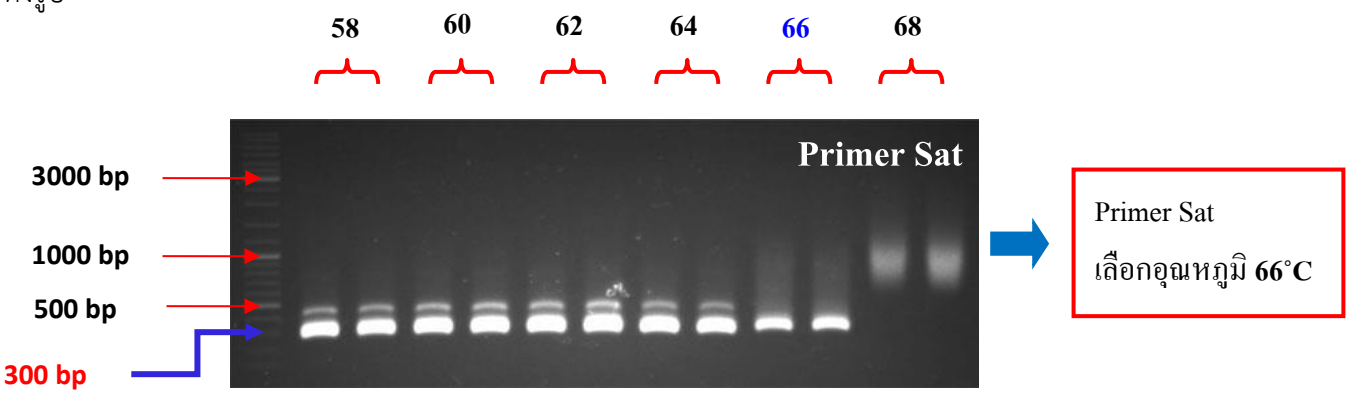
H_2O	7.6µl
10X buffer	1.5µl
2.5 mMdNTP mix	1.2µl
25 mM $MgCl_2$	0.9 µl
10 µM F Primer	0.3µl
10 µM R Primer	0.3 µl
Taq polymerase 5U/µl	0.2µl
DNA template	3 µl
Mineral Oil	

Vary 25mM $MgCl_2$และอุณหภูมิ Annealing 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C และ 58°Cตามลำดับ

Condition PCR

Pre denaturation	94 °C	5 นาที	
Denaturation	94 °C	40 วินาที	35 Cycle
Annealing	58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C, 68°C	1 นาที	35 Cycle
Extension	72 °C	1 นาที	35 Cycle
Long Extension	72 °C	7 นาที	
Hold	25 °C ∞		

หลังจากนั้นตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของAgarose gel 1.0% ได้ผลดังรูป



ทดสอบซ้ำกับไพรเมอร์คู่ Sat244 F, Sat244 R

<u>Reaction mix 15 µl</u>

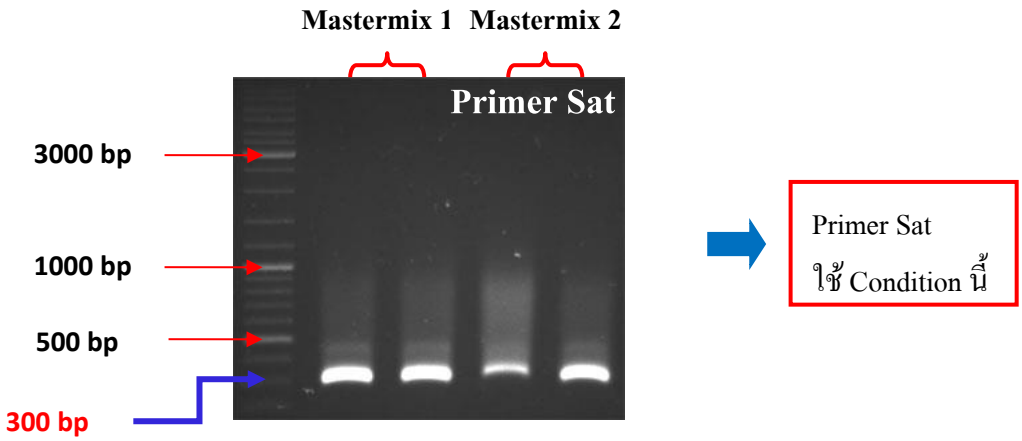
H_2O	7.6µl
10X buffer	1.5µl
2.5 mMdNTP mix	1.2µl
25 mM $MgCl_2$	0.9µl
10 µM F Primer	0.3µl
10 µM R Primer	0.3µl
Taq polymerase 5U/µl	0.2µl
DNA template	3 µl
Mineral Oil	

Vary 25mM $MgCl_2$และอุณหภูมิ Annealing 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C และ 58°Cตามลำดับ

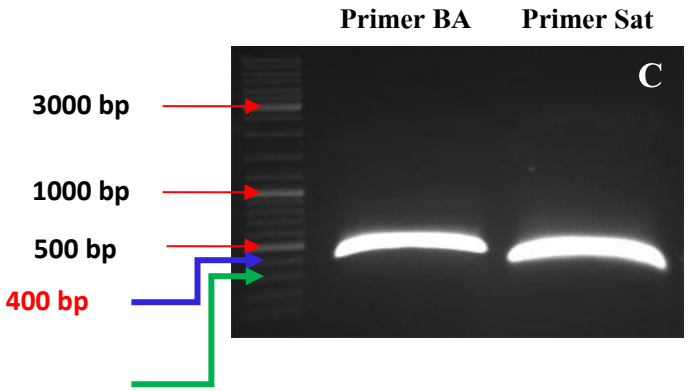
<u>Condition PCR</u>

Pre denaturation	94 °C	5 นาที	
Denaturation	94 °C	40 วินาที	35 Cycle
Annealing	66°C	1 นาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Long Extension	72 °C	7 นาที	
Hold	25 °C ∞		

หลังจากนั้นตรวจดูด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.0%



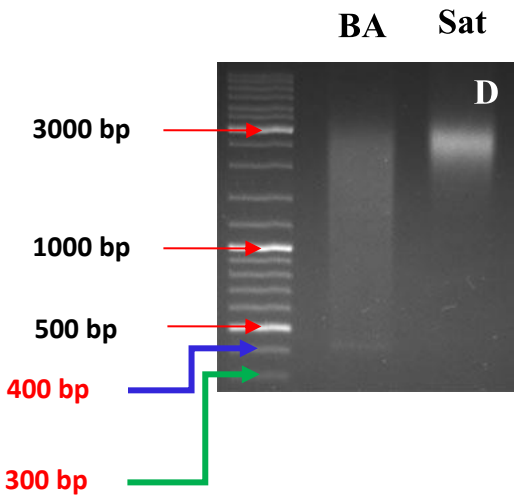
เลือก Condition PCR ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแล้ว



<u>ภาพ C</u> PCR productsตัวอย่างกาแฟที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

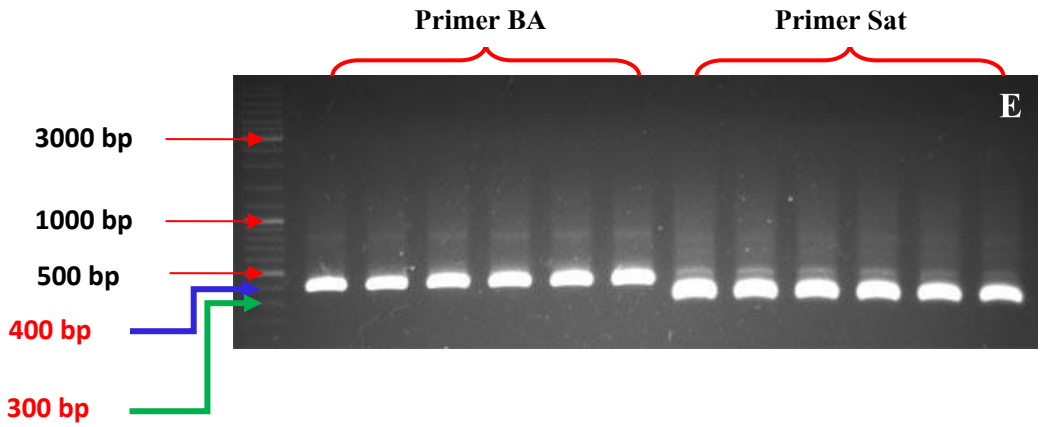
เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการแล้วตัดส่วนผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งไพรมอร์ BA-124-12K-f F, BA-124-12K-f R มีขนาด 400bp และ Sat244 F, Sat244 Rมีขนาด 300 bp หลังจากนั้นทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYieldTM (Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit) โดยนำชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ลงในหลอด Micro tube เติม DF Buffer ให้ท่วมเจล ประมาณ 500 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 52°C ประมาณ 10 นาที (ให้*อะกาโรสเจล*ละลาย) เมื่อละลายแล้วดูดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ลงในฟิลเตอร์ที่มากับชุดคิท ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที, 1 นาที แล้วล้างด้วย Wash Buffer ประมาณ 350 µl (2 รอบ) จากนั้นทำให้หลอดแห้งโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที, 2 นาที เปลี่ยนฟิลเตอร์ลงในหลอด Micro tube ใหม่ (เพื่อเก็บผลผลิตพีซีอาร์) เติมน้ำ (dH_2O) 30 µl ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที, 2 นาที

เก็บส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel 1.0% ผลที่ได้ดังรูป



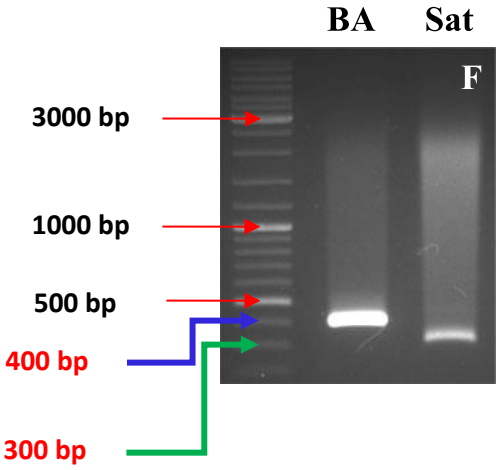
<u>ภาพ D</u> PCR products ตัวอย่างกาแฟที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresisหลังจากทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลแล้ว ผลคือไพรมอร์BA-124-12K-f F, BA-124-12K-f R มีขนาด 400bpมีแถบขึ้นน้อยมาก ส่วนไพรเมอร์ Sat244 F, Sat244 Rมีขนาด 300 bpไม่มีแถบเกิดขึ้น

ทำการตรวจสอบ PCR products โดยการนำผลผลิตพีซีอาร์ที่คัดแล้วมาทำพีซีอาร์ซ้ำอีกรอบ แล้วตรวจดูวิธี Agarose gel electrophoresis ผลที่ได้ดังรูป



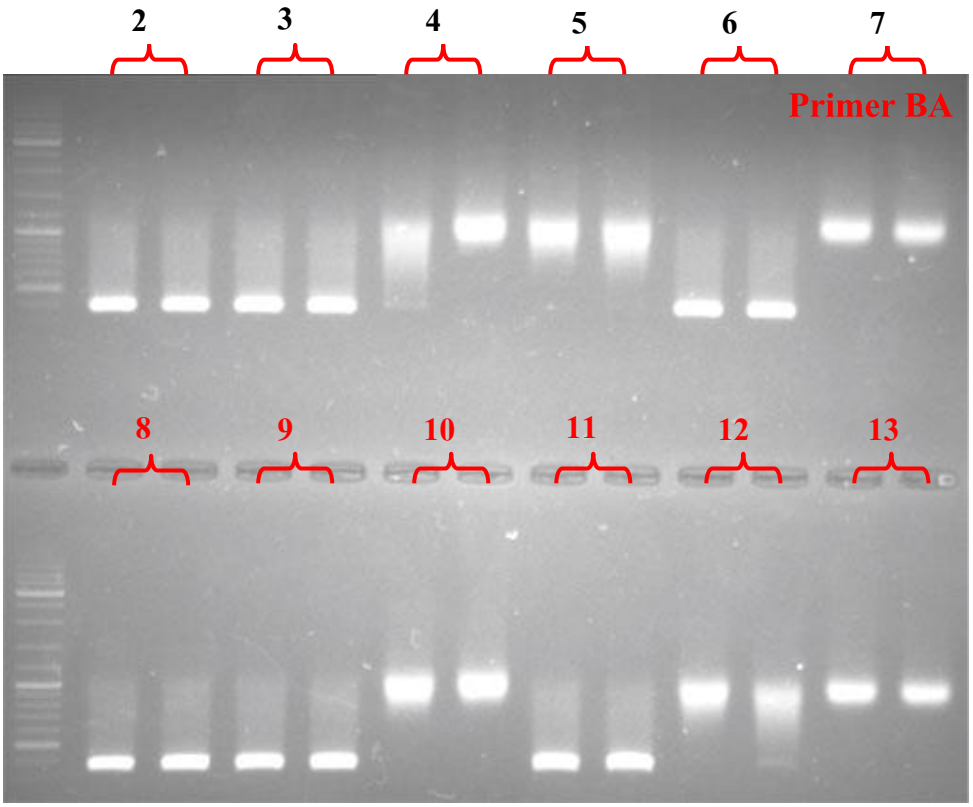
<u>ภาพ E</u> PCR productsตัวอย่างกาแฟที่ตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresisหลังจากทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลแล้วไม่พบแถบจึงนำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าวมาทำพีซีอาร์ซ้ำ(Reamp) ผลคือมีแถบเกิดขึ้นในตำแหน่งเดิม โดยในไพรมอร์BA-124-12K-f F, BA-124-12K-f R มีขนาด 400bp และ Sat244 F, Sat244 Rมีขนาด 300 bp

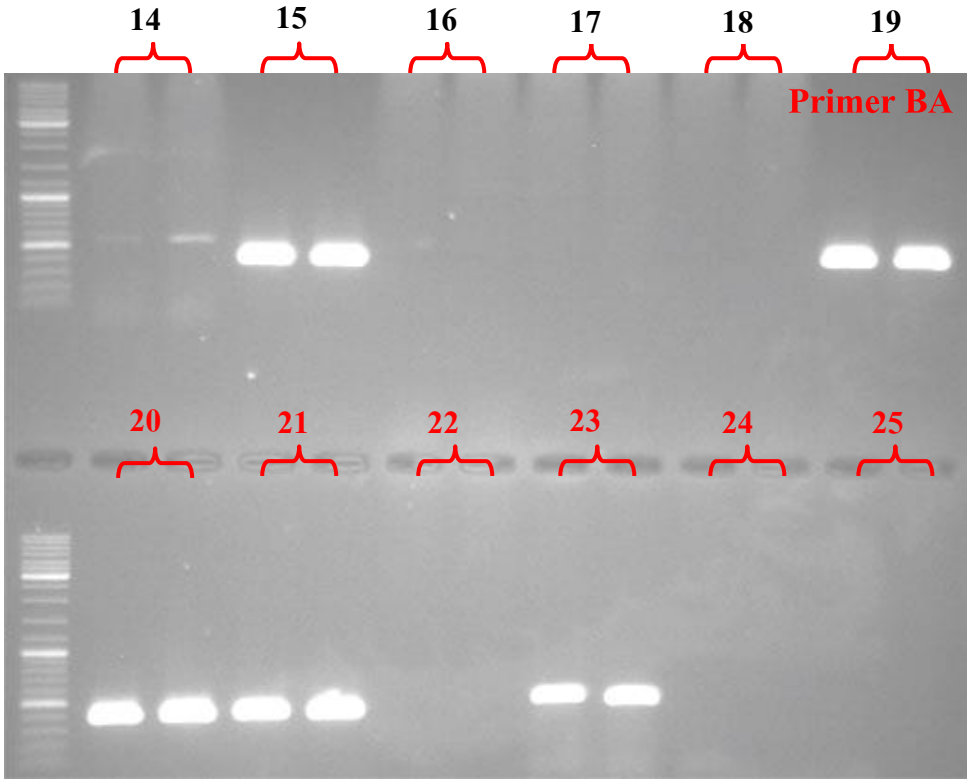
ปัญหาที่พบคือทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYieldTM (Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit) แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarose gel electrophoresisผลที่ได้ไม่พบแถบผลผลิตพีซีอาร์จึงทำการตรวจด้วยเทคนิคทาง PCR (Polymerase Chain Reaction)ซ้ำ เพื่อที่จะส่งวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

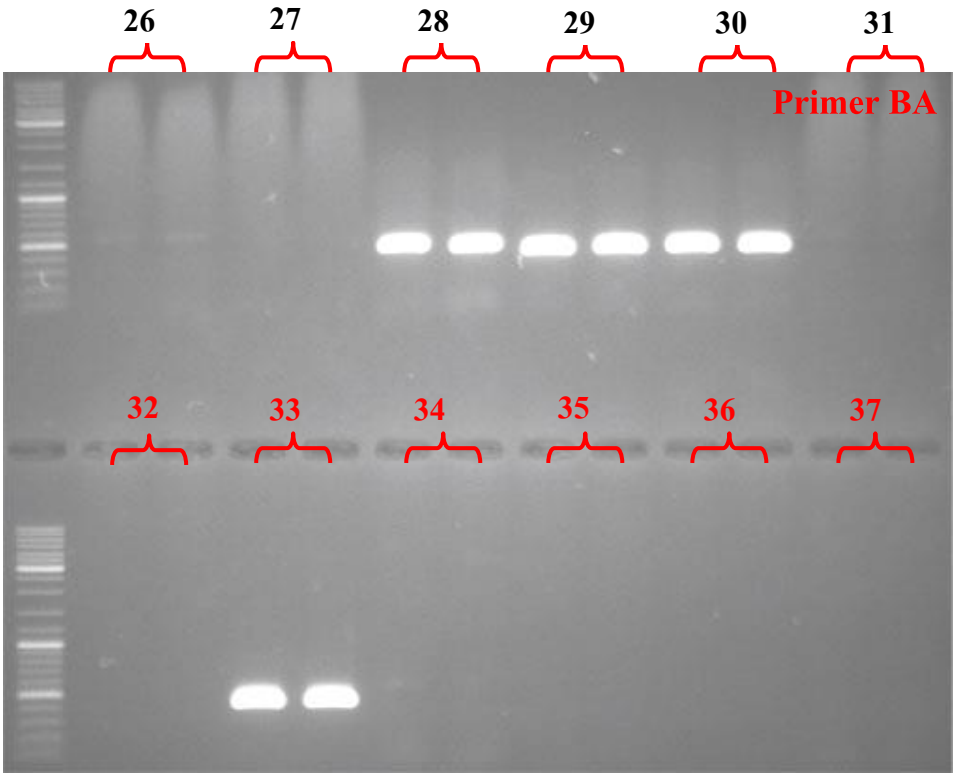


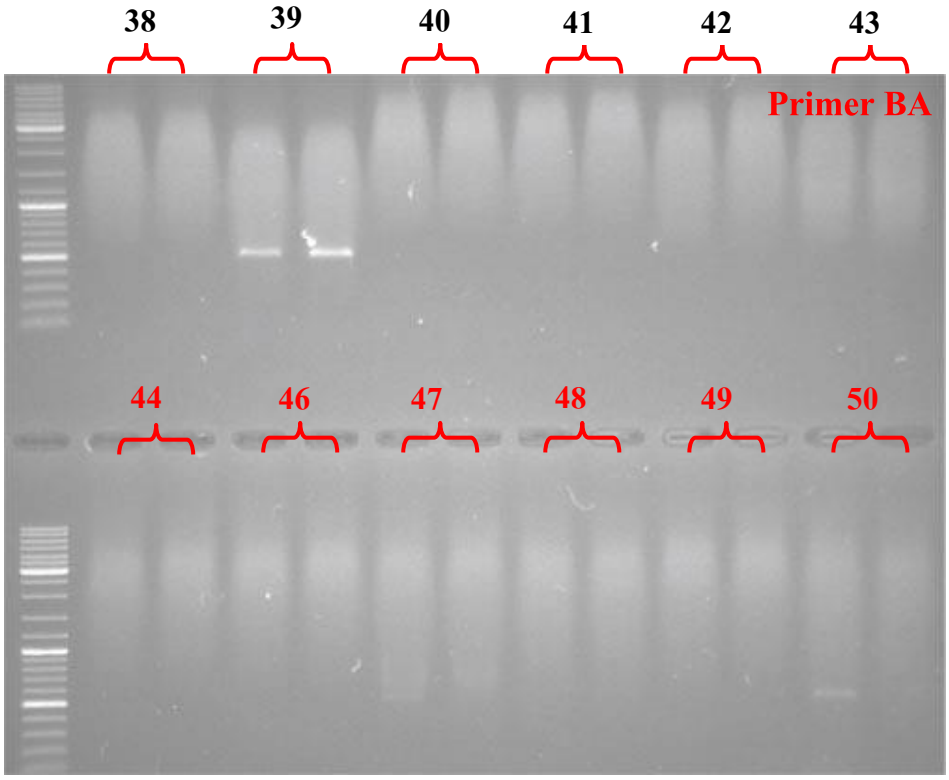
<u>ภาพ F</u> PCR products ตัวอย่างกาแฟที่ได้ (ทำพีซีอาร์ใหม่)แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresisใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ ทดสอบ คือ BA-124-12K-f F, BA-124-12K-f Rและ Sat244 F, Sat244 R

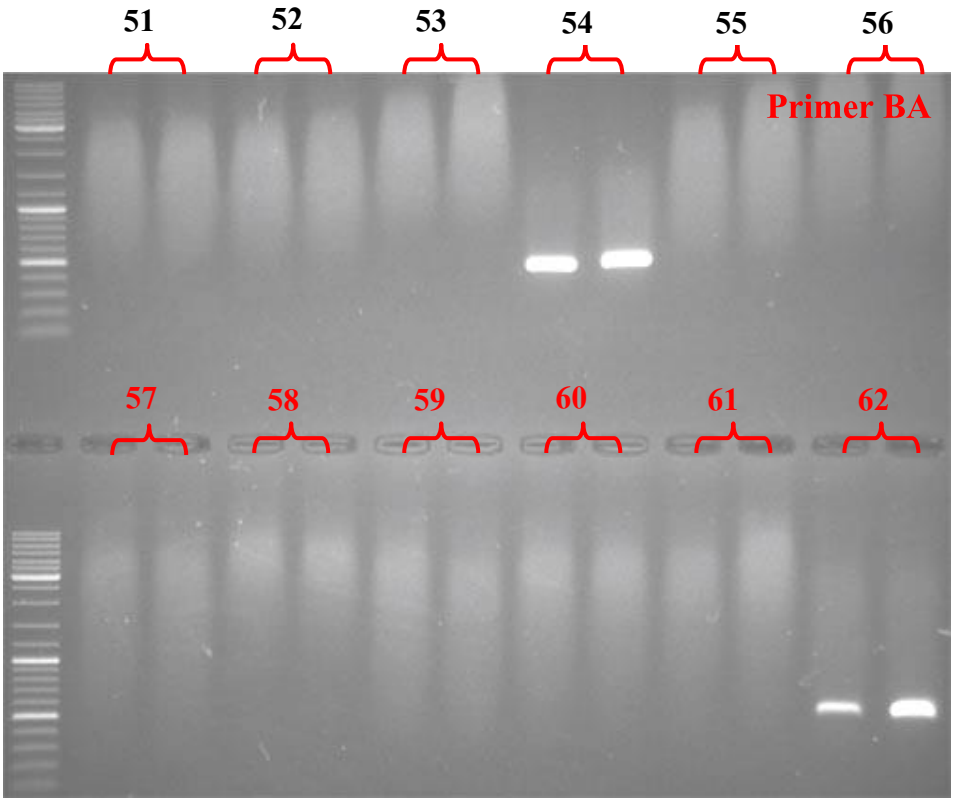
ภาพแสดง PCR products ตัวอย่างกาแฟทั้ง 62 ตัวอย่าง กับ สองคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบแล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis หลังจากการหา Condition PCR ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

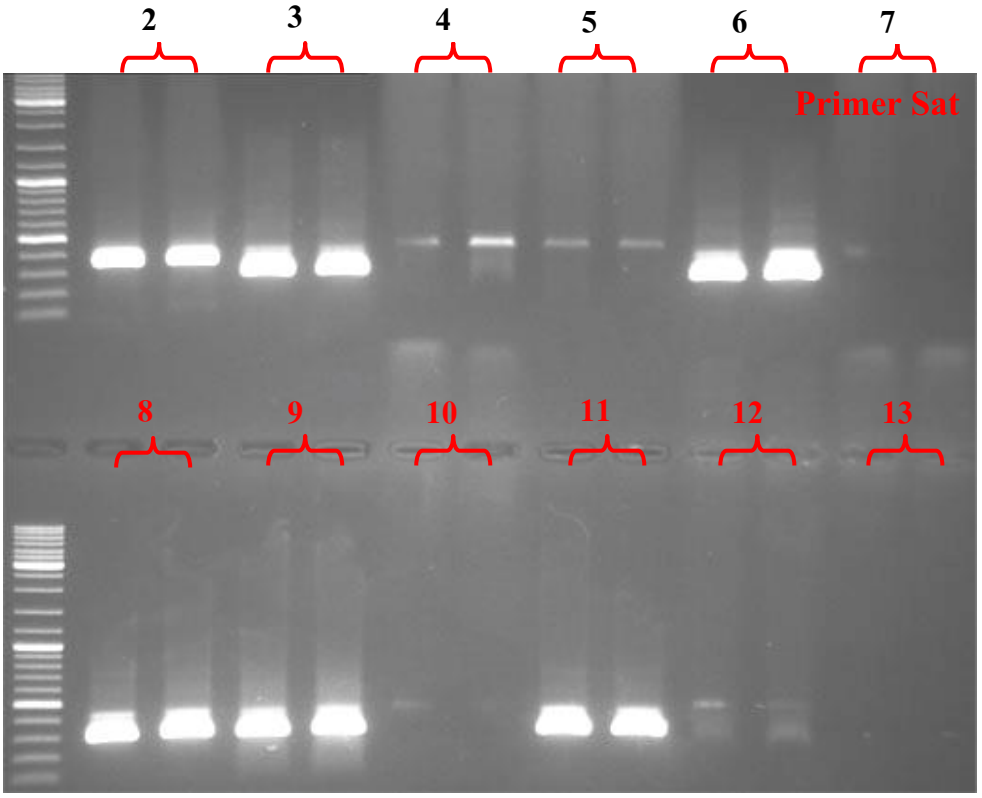


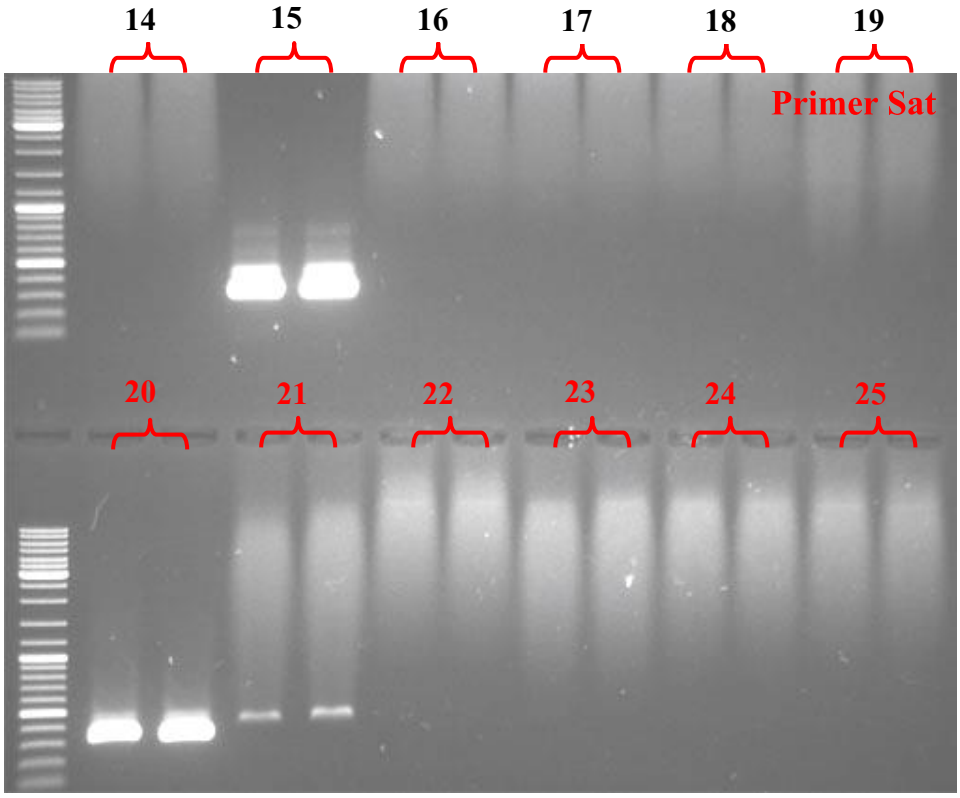


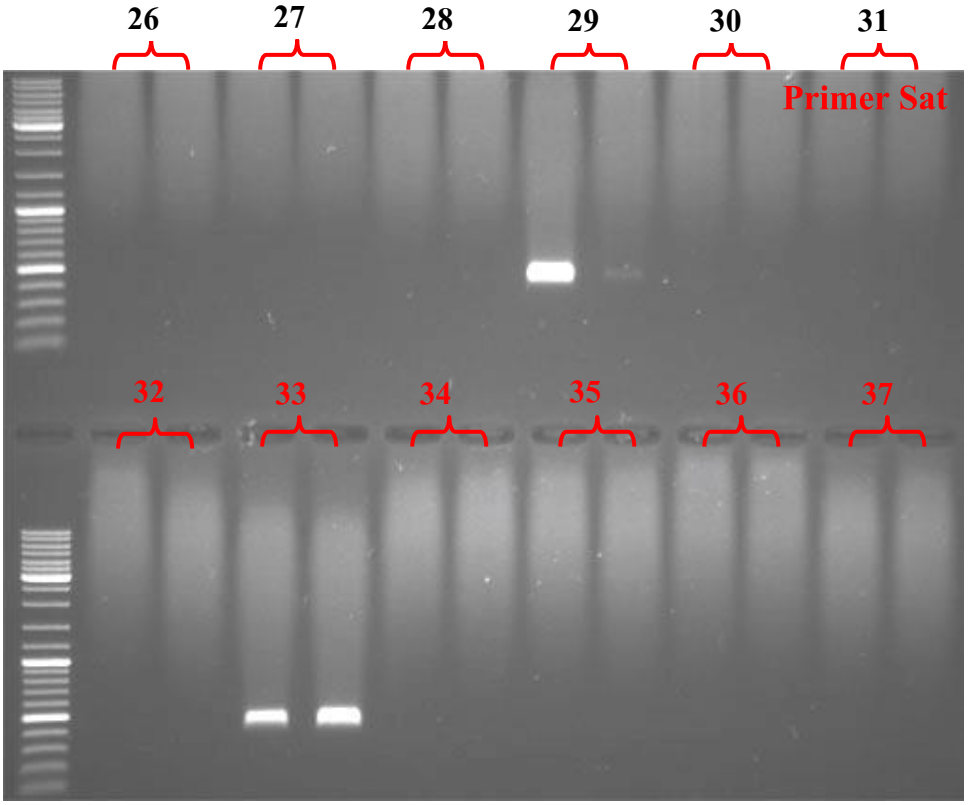

26
27
28
29
30
31
Primer BA
32
33
34
35
36
37

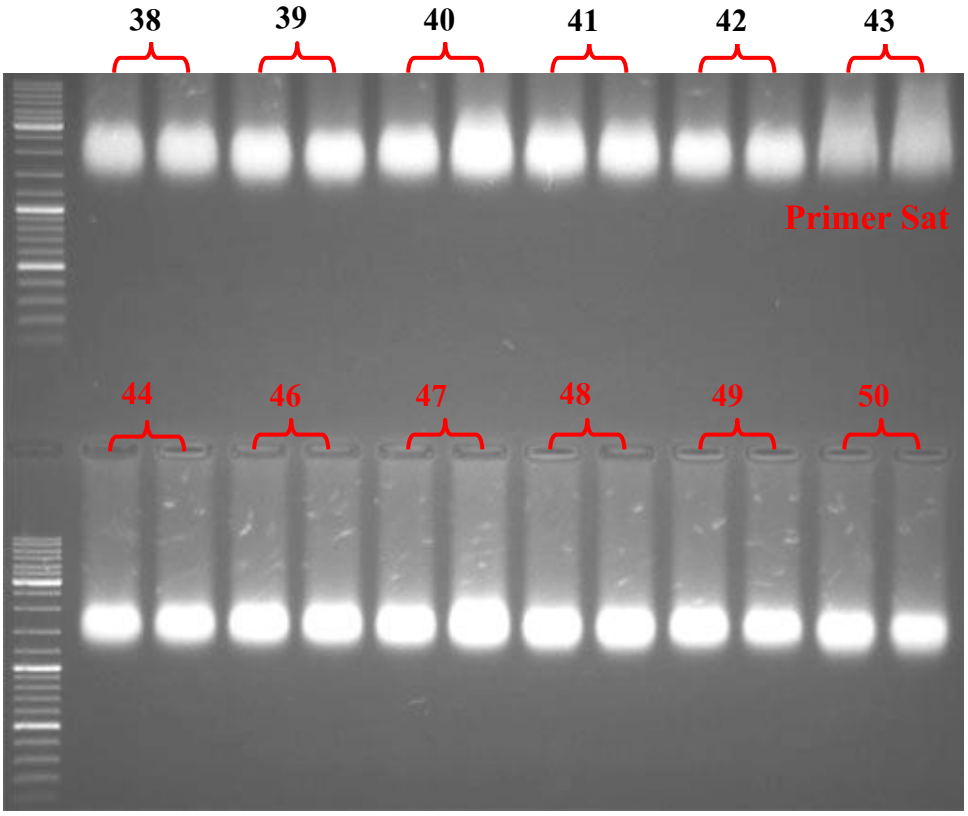

38
39
40
41
42
43
Primer BA
44
46
47
48
49
50

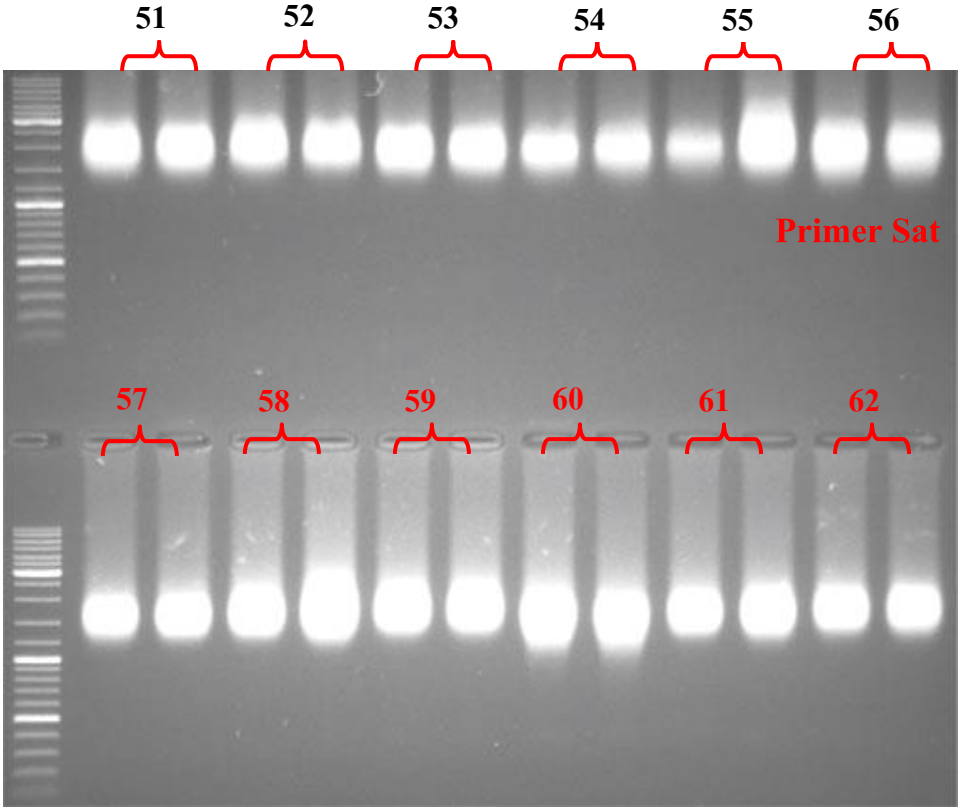

51
52
53
54
55
56
Primer BA
57
58
59
60
61
62


2
3
4
5
6
7
Primer Sat
8
9
10
11
12
13


14
15
16
17
18
19
Primer Sat
20
21
22
23
24
25


26
27
28
29
30
31
Primer Sat
32
33
34
35
36
37


38
39
40
41
42
43
Primer Sat
44
46
47
48
49
50


51
52
53
54
55
56
Primer Sat
57
58
59
60
61
62

ตารางที่ 1 การตรวจสอบยีนต้านทาน SH3 ในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคราสนิม โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ด้วยไพรเมอร์ BA-124-12K 400bp, Sat244 400 bp และ Sat244 350bp.

ที่	ชื่อตัวอย่าง	กลุ่ม	S_H3 gene	BA ~400bp	SAT~ 400bp	SAT~ 350bp	Sh3 status
1	2/34 B, 4 Typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+			
2	2/27 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	++	0	homozyous
3	3/1 B7SM	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	+	++	heterozygous
4	29 B43F	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+/-	+	0	
5	2/43 SF	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	+	0	
6	2/46 B5 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	+	++	heterozygous
7	CJ2	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
8	CJ1	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	+	++	heterozygous
9	CJ5	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	+	++	heterozygous
10	CJ3	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	+	0	
11	2/47-2B6	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	+	++	heterozygous
12	3/4-1F1 ต้น 7	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+/-	+	0	
13	2/29 B5 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
14	2/20 SFB3 (H420)	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+/-	-	-	
15	2/27 ต้น 3	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	+	++	heterozygous
16	2/24 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
17	3/4-1F1 ต้น 1	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
18	2/1 SMB4 (SL6)	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
19	1/2 B3 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+	-	-	
20	CJ 4	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	+	++	heterozygous
21	2/42SF	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	+	0	
22	3/4 -1 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
23	2/15 SFB1 (H420)	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
24	2/12 B1 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
25	2/15 B1 ต้น 1	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม	-	-	-	-	susceptible
26	2/29 B4 typica	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		+/-	-	-	
27	1/2 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
28	3/2 F	แม่พันธุ์		+	-	-	
29	3/8 F	แม่พันธุ์		+	++	0	homozygous
30	3/5 F	แม่พันธุ์		+	++	0	homozygous
31	2/5 F	แม่พันธุ์		-	++	0	?
32	2/8 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
33	3/10 F	แม่พันธุ์		+	-	-	

34	1/1 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
35	1/4 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
36	2/22 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
37	2/1 F	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
38	2/25 F	แม่พันธุ์		-	-	-	

ตารางที่ 1(ต่อ) การตรวจสอบยีนต้านทาน SH3 ในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคราสนิม โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis ด้วยไพรเมอร์ BA-124-12K 400bp, Sat244 400 bp และ Sat244 350bp.

ที่	ชื่อตัวอย่าง	กลุ่ม	S_H3 gene	BA ~400bp	SAT~ 400bp	SAT~ 350bp	Sh3 status
39	2/24 F	แม่พันธุ์		+, +/-	-	-	
40	2/20 F	แม่พันธุ์	-	-	-	-	susceptible
41	2/12 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
42	3/1 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
43	2/34 F	แม่พันธุ์		-	-	-	
44	SAN 1	พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม		-	-	-	
45	2/25M(พบราสนิม)	พ่อพันธุ์					
46	2/12 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
47	1/2 M	พ่อพันธุ์		+/-	-	-	
48	1/1 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
49	1/4 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
50	2/5 M	พ่อพันธุ์		+/-	-	-	
51	2/34 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
52	2/8 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
53	3/8 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
54	2/20 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
55	2/22 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
56	2/25 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
57	3/10 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
58	2/1 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
59	3/2 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
60	3/1 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
61	2/24 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	
62	3/5 M	พ่อพันธุ์		-	-	-	

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 เปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเทคนิค melting temperature analysis

ใบตัวอย่างพืชที่ใช้ได้แก่ พันธุ์ชียงใหม่ 80 (ลูกผสมระหว่าง HW.26/5 (Hibrido de Timor 832/1 Caturra) x SL.28) ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคราสนิม พันธุ์ Robusta พันธุ์ Liberica และ พันธุ์ Typica จากนั้น ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งดัดแปลงวิธีการจาก Li,M and Midmore (1999) บดตัวอย่างใบกาแฟด้วยไนโตรเจนเหลวโดยใช้ตัวอย่างใบ 0.1 กรัมต่อ extraction buffer 800 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการ ตรวจวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanometer และจำแนกความแตกต่างของพันธุ์กาแฟด้วย SSR คือ ทำการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยไพร์เมอร์ชนิด SSR จำนวน 17 คู่ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบลงไปหลอดละ 200 ng , 10X buffer 1.5 µl, 0.17 mM dNTP mix , 1.2 mM $MgCl_2$, 0.23 µM F/R Primer , *Taq* polymerase 0.1 u ในปริมาตรรวม 15 µl นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้

Pre denaturation	94 °C	5 นาที	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	35 Cycle
Annealing	**55 °C**	30 วินาที	
Extension	72 °C	30 วินาที	
Long Extension	72 °C	8 นาที	
Hold	25 °C	∞	

ตรวจผลด้วย Electrophoresis โดยใช้ gradient polyacrylamide gel 4-12% (Amersham ECL Gel) ย้อมดีเอ็นเอด้วย SYBR gold โดยมีรายละเอียดลำดับเบสของไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม ดังนี้

Primer #	Forward	Reverse
005F	5’-GGT CCC TGA TAC CAA ACC TC-3’	5’-CAA GAT CAC AGG AAG GCA CA-3’
007F	5’-AGT GGC TGG GAA CAA AGA GA-3’	5’-TTC TCC TCC CGC AAA CAG AG-3’
010F	5’-CTT CTT CAT CCA ACA ACA CG-3’	5’-TGC CAT TCC ACT GTG TCA CT-3’
012F	5’-CGC GTC TGC AAC AAA GGT A-3’	5’-GGG TGC TAG TCA GAG CCA TTT-3’
013F	5’-GCC TTG CTC ATA TCT GCT GTC T-3’	5’-GAT CCT TCA ACT GAG CCA AA-3’
023F	5’-GCC ATT TCA CAA TCT CAC CTC-3’	5’-AGA CCC AGC AGA CAA CAA CA-3’
025F	5’-AGA TAC CCA CCG CCT AAT CCT-3’	5’-GCA ACA ACT TCT GCT CAT CC-3’
027F	5’-ATG GAA GTG TCC TTG TCG TG-3’	5’-ATG TCG GTG GGT CGG TCA AA-3’
029F	5’-TTA ACC TCC TGC CAC ACA-3’	5’-GCC CAA ATA AAT CCC TCC A-3’
047F	5’-GCG TCA ATT AAG CCT CAT CAT C-3’	5’-CAG CCG CTT GCA AAG TAA TC-3’
048F	5’-TCC TCC TCG TGC TTC TCA AC-3’	5’-GGC AGC ATT CTC CTG ATC CT-3’
054F	5’-GTT AGC CGT TGG TGA TGG AA-3’	5’-TTG GTC GAG GGA GGA AGA AC-3’
055F	5’-TAC CAC CAG CAT CCA GAC CA-3’	5’-TGG GAG GAA ATC AAG AGC AA-3’
057F	5’-TTG TGT TCT TTC TCC ACC TC-3’	5’-CAG GAG TCG TAT AAC GCT GAA-3’
058F	5’-CAC ACT TGA TTC CGC TCA CA-3’	5’-GGA TGC TTG CTG CTG CTA TT-3’
069F	5’-TGA GCT AAC CAA GAC CAG TTC C-3’	5’-CAA CAG GAA ATC ACC GCC TA-3’
073F	5’-GAG GTC TTC CCA CCA CAA CA-3’	5’-GGA TAC GAG AGT CCC TTC CA-3’

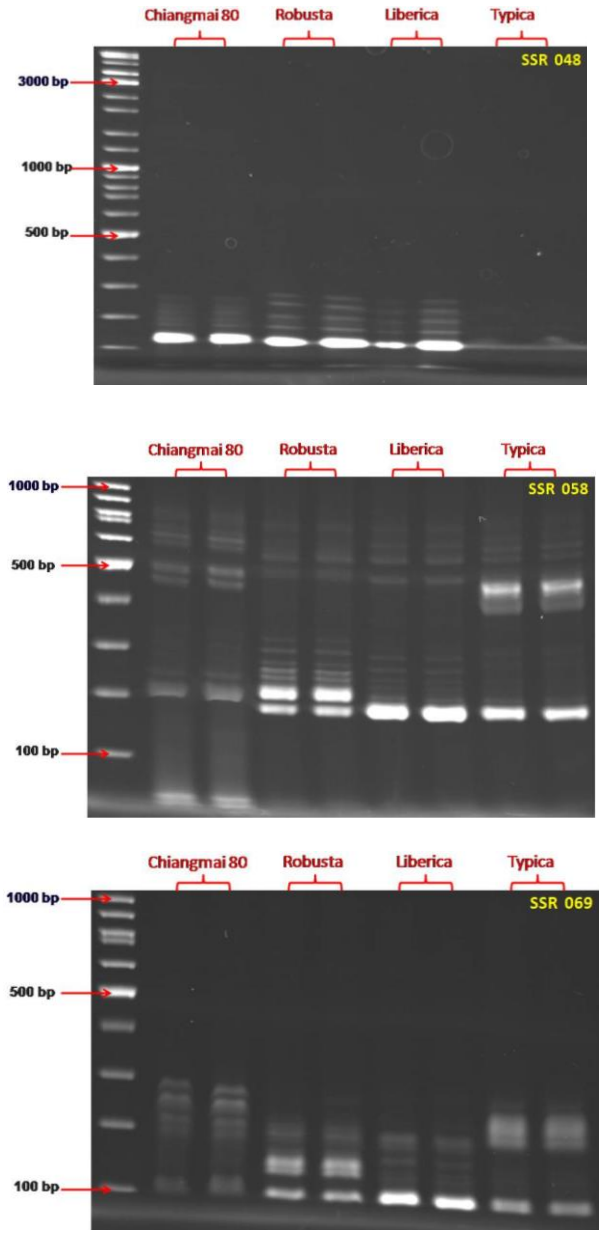
ผลการทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 17 คู่ ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 พันธุ์ Robuta พันธุ์ Liberica และพันธุ์ Typica พบว่ามีไพร์เมอร์เพียง 3 คู่เท่านั้นที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอในพันธุ์เชียงใหม่ 80 ได้ และมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ มีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากกาแฟอีก 3 พันธุ์ที่ทดสอบ โดยมีผลสรุปดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ SSR จำนวน 17 คู่ ในกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 พันธุ์ Robusta พันธุ์ Liberica และพันธุ์ Typica ใน Gradient polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4-12%

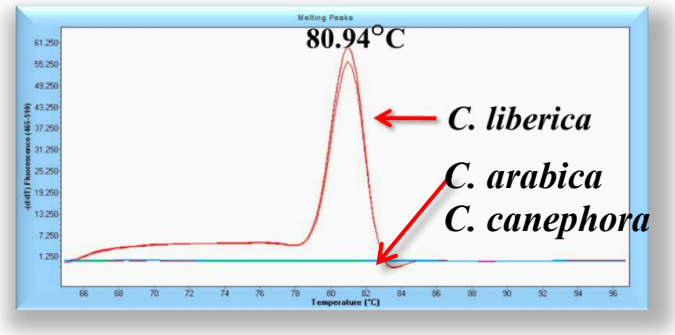
√ คือตรวจพบแถบดีเอ็นเอได้ 0 คือ ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

SSR #	พันธุ์ เชียงใหม่ 80	พันธุ์ Robusta	พันธุ์ Liberica	พันธุ์ Typica
005	0	√	√	√
007	0	√	√	√
010	0	√	√	√
012	0	√	√	√
013	0	0	√	√
023	0	√	√	√
025	0	√	√	√
027	0	√	√	√
029	0	√	√	√
047	0	√	√	√
048	√	√	√	0
054	0	√	√	√
055	0	√	√	√
057	0	√	√	√
058	√	√	√	√
069	√	√	√	√
073	0	√	√	√

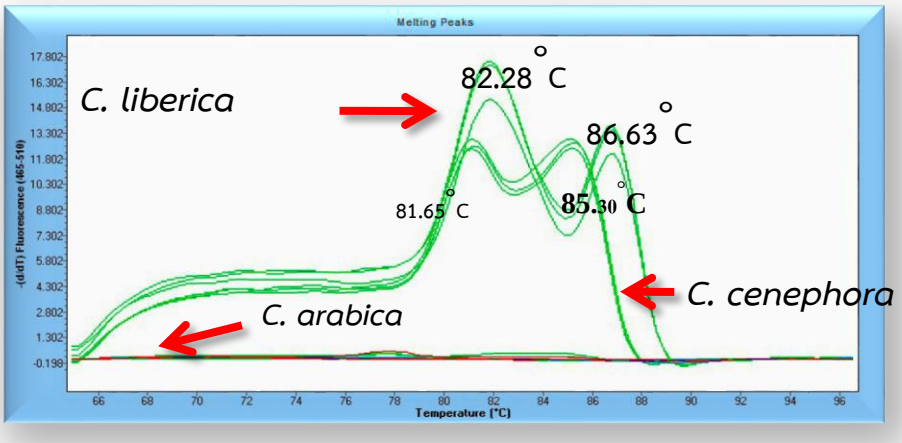
โดยไพร์เมอร์ 048, 058 และ 069 สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอในพันธุ์เชียงใหม่ 80 และมีรูปแบบที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน อาจจะสามารถนำมาใช้แยกพันธุ์นี้ได้ หากมีการทดสอบกับพันธุ์อื่นจำนวนมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 พันธุ์ Robuta พันธุ์ Liberica และพันธุ์ Typica ใน Gradient polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4-12% ตรวจด้วยไพร์เมอร์ SSR# 048, 058 และ 069 ตามลำดับ



ภาพที่ 2 แสดง peak ของ melting temperature ของยีน Sh3 ใน *C. liberica* ที่อุณหภูมิ 80.94 ^{0}C *ซึ่งไม่พบ peak ใดๆ ใน C. arabica และ C. cenephora ซึ่งไม่มียีนนี้* ในการตรวจยีน Sh3 ด้วย BA-124-12K-f

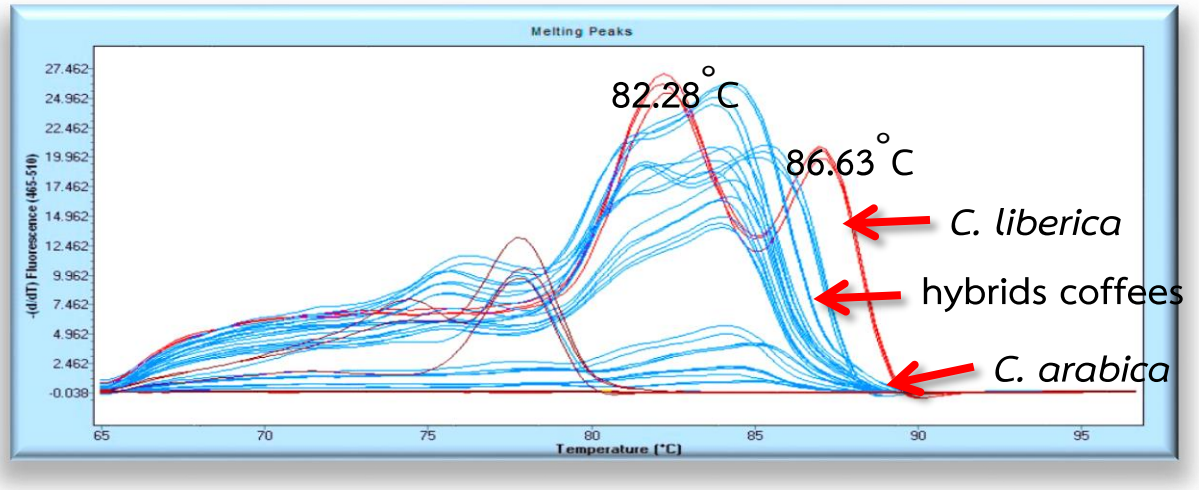


ภาพที่ 3 แสดง *C. liberica พบ melting peak 2 อุณหภูมิ คือ* 82.28 and 86.63°C

C. cenephora พบ melting peak 2 อุณหภูมิ คือ 81.65 and 85.30°C

C. arabica ไม่พบ melting peak ใด

ในการตรวจ zygosity status ของ Sh3 gene ด้วยดีเอ็นเอ มาร์เกอร์ Sat244



ภาพที่ 4 แสดงการตรวจในลูกผสม พบ peak ในตำแหน่งที่ต่างกันออกไปจาก C. liberica แสดงว่าไม่ใช่ยีนนี้ ซึ่งการตรวจพบ 2 peak ใน *C. liberica* ยังไม่สามารถใช้ยืนยันได้ว่าเป็น homozygous ต้องเทียบกับ control ที่เป็น homozygous Sh3 gene ก่อน จึงได้ peak อุณหภูมิ ที่ถูกต้อง

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟอะราบิกาลูกผสมชั่วที่ 1 เปรียบเทียบกับพ่อแม่พันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเทคนิค melting temperature analysis

โดยนำใบของกาแฟอะราบิกาลูกผสมชั่วที่ 1 และพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 10 คู่ผสม 17 สายต้น (ตารางที่ 3) มาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งดัดแปลงวิธีการจาก Li,M and Midmore (1999) บดตัวอย่างใบกาแฟด้วยไนโตรเจนเหลวโดยใช้ตัวอย่างใบ 0.1 กรัมต่อ extraction buffer 800 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการ ตรวจวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanometer และจำแนกความแตกต่างของพันธุ์กาแฟด้วยด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเทคนิค melting temperature analysis คือ ทำการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยไพร์เมอร์ชนิด SSR จำนวน 17 คู่ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบลงไปหลอดละ 200 ng , 10X buffer 1.5 µl, 0.17 mM dNTP mix , 1.2 mM $MgCl_2$, 0.23 µM F/R Primer , *Taq* polymerase 0.1 u ในปริมาตรรวม 15 µl นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้

Pre denaturation	94 °C	5 นาที	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	35 Cycle
Annealing	**55 °C**	30 วินาที	
Extension	72 °C	30 วินาที	
Long Extension	72 °C	8 นาที	
Hold	25 °C	∞	

ตรวจผลด้วย Electrophoresis โดยใช้ gradient polyacrylamide gel 4-12% (Amersham ECL Gel) ย้อมดีเอ็นเอด้วย SYBR gold โดยใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมเช่นเดียวกับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 เปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR

ตารางที่ 3 กาแฟอะราบิกาลูกผสมชั่วที่ 1 และพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 10 คู่ผสม 17 สายต้น

ตัวอย่างที่	รหัส	แม่		พ่อ
1	1/1B2T5	Caturra vermelho	X	K7
2	1/1SF	Caturra vermelho		
3	1/1SM			K7
4	1/4B3T3	Caturra vermelho	X	Sanramon
5	1/4SF	Caturra vermelho		
6	1/4SM			Sanramon
7	2/8B1T3	H.528/46ML2/10-29-65-32	X	K7
8	2/8SF	H.528/46ML2/10-29-65-32		
9	2/8SM			K7
10	2/12B1T3	H.420/9 ML2/4-78-62-28	X	SL6
11	2/12B1T6	H.420/9 ML2/4-78-62-31	X	SL6
12	2/12B2T1	H.420/9 ML2/4-78-62-26	X	SL6
13	2/12B2T3	H.420/9 ML2/4-78-62-26	X	SL6
14	2/12B3T6	H.420/9 ML2/4-78-62-26	X	SL6
15	2/12SF	H.420/9 ML2/4-78-62-28		
16	2/12SM			SL6
17	2/22B2T5	H.420/9 ML2/4-78-62-36	X	Colchin
18	2/22SF	H.420/9 ML2/4-78-62-36		
19	2/22SM			Colchin
20	2/27B4T5	Catimor CIFC 7963-661-36	X	Typica
21	2/27B5T4	Catimor CIFC 7963-661-36	X	Typica
22	2/27SF	Catimor CIFC 7963-661-36		
23	2/27SM			Typica
24	2/34B4T6	SL6	X	H.528/46 ML2/10-29-65-29
25	2/34SF	SL6		
26	2/34SM			H.528/46 ML2/10-29-65-29

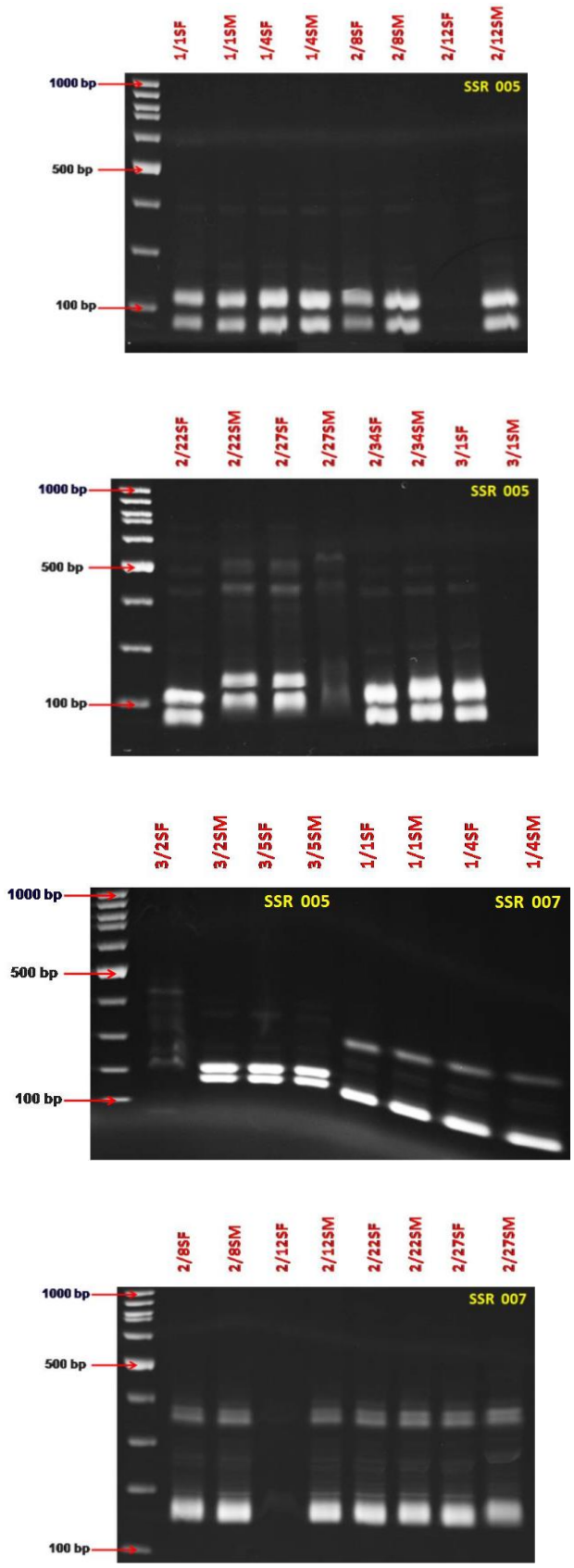
27	3/1B7T10	H.528/46 ML2/10-29-65-29	X	SL34
28	3/1SF	H.528/46 ML2/10-29-65-29		
29	3/1SM			SL34
30	3/2B7T7	H.528/46 ML2/10-29-65-29	X	Sanramon
31	3/2B7T8	H.528/46 ML2/10-29-65-29	X	Sanramon
32	3/2SF	H.528/46 ML2/10-29-65-29		
33	3/2SM			Sanramon
34	3/5B7T1	H.420/9 ML2/4-78-62-26	X	Sanramon
35	3/5B7T9	H.420/9 ML2/4-78-62-26	X	Sanramon
36	3/5SF	H.420/9 ML2/4-78-62-26		
37	3/5SM			Sanramon

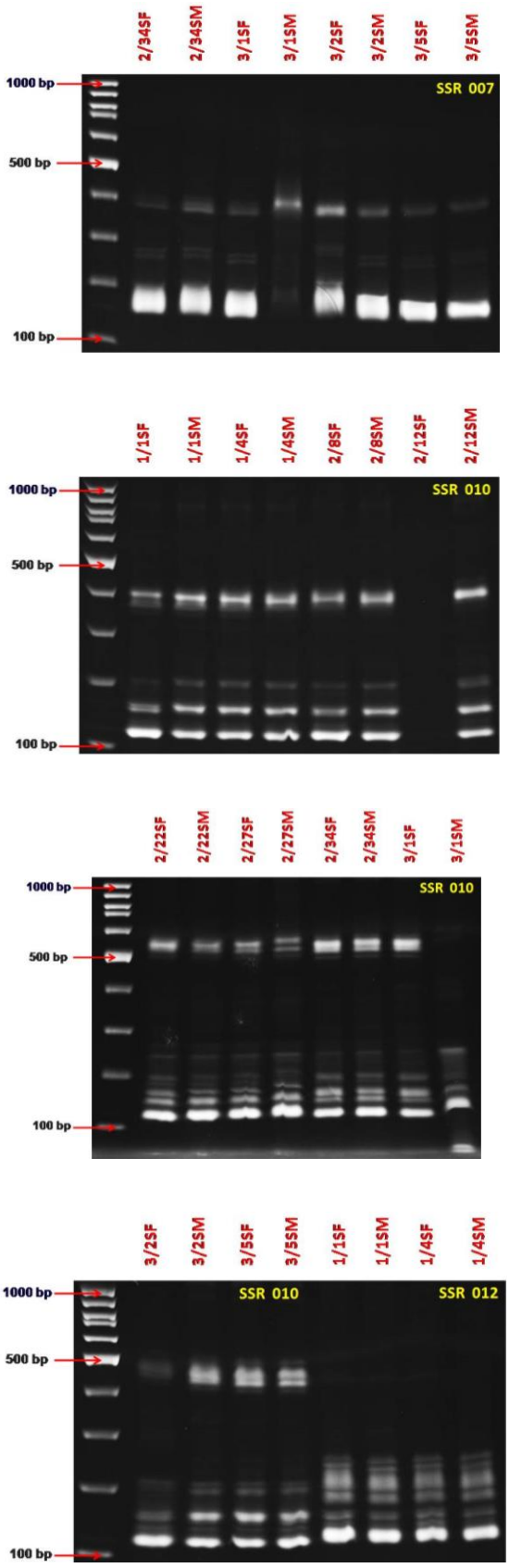
ผลการทดสอบและคัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์จำนวน 10 คู่ผสม โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 17 คู่ ในการจำแนกความแตกต่าง พบว่าแต่ละคู่ผสมมีไพร์เมอร์ที่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งต่างกันระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ได้ ดังตารางที่ 4 แสดงถึงตำแหน่งดีเอนเอที่พบเพียงในพ่อหรือในแม่เท่านั้น ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ต่างหมายเลขกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไพร์เมอร์บางหมายเลขสามารถแสดงรูปแบบดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ได้ (ไม่ได้แสดงผล) ตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างพ่อและแม่จะถูกใช้ในการตรวจในลูกผสม รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมาย SSR ในคู่ผสม 10 คู่ ดังแสดงในภาพ a จากนั้นสังเคราะห์ไพร์เมอร์ SSR เพิ่มอีก 31 คู่ไพร์เมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 5 สำหรับทดสอบพ่อและแม่พันธุ์ และทดสอบไพร์เมอร์คู่ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ในลูกผสม

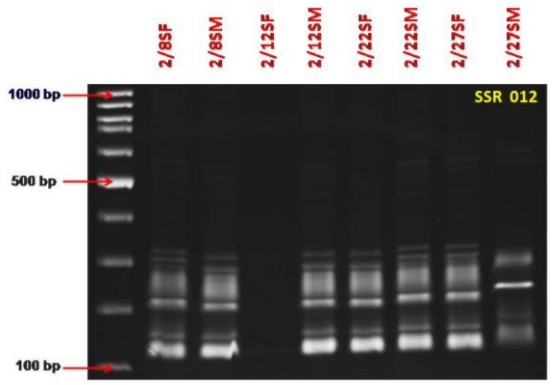
<u>ตารางที่ 4</u> ขนาดดีเอ็นเอ (กิโลเบส : kb) จากการทดสอบและคัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ SSR จำนวน 17 คู่ ด้วย gradient polyacrylamide gel electrophoresis (4-12%) ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์กาแฟอะราบิกา จำนวน 10 คู่ผสม คู่ตัวเลขที่เหมือนกันในแถว : คือ คู่ผสม F และ M คือ ต้น พ่อ และ แม่

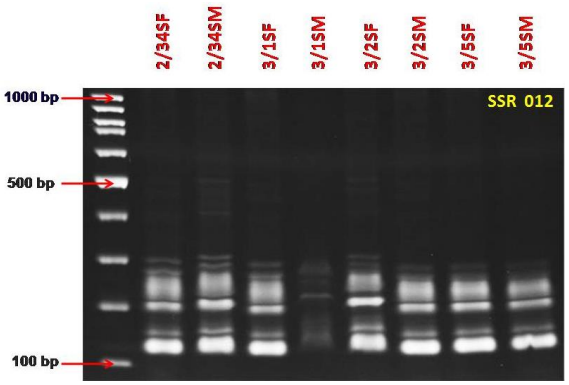
No	Primer	1/1 SF	1/1 SSM	1/4 SF	1/4 SM	2/8 SF	2/8 SM	2/12 SF	2/12 SM	2/22 SF	2/22 SM	2/27 SF	2/27 SM	2/34 SF	2/34 SM	3/1 SF	3/1 SM	3/2 SF	3/2 SM	3/5 SF	3/5 SM
1	005F	-	-	-	-	-	-	0.218	-	-	0.243	0.243	-	-	-	0.221	-	-	0.207	-	-
	005R																				
2	007F	-	-	-	-	-	-	-	0.158	-	-	0.191	-	-	-	-	0.155	0.198	-	-	-
	007R																				
3	010F	0.157	-	-	-	-	-	-	0.118	-	-	-	-	-	-	0.151	-	-	0.194	-	-
	010R																				
4	012F	-	-	0.149	-	-	-	-	0.131	-	-	0.131	-	-	-	0.527	-	-	-	-	-
	012R																				
5	013F	-	0.294	-	-	0.364	-	-	0.300	0.441	-	-	-	0.291	-	0.293	-	-	0.298	-	-
	013R																				
6	023F	-	0.184	-	-	-	-	-	0.228	0.238	-	0.269	-	-	0.571	0.271	-	-	0.265	-	-
	023R																				
7	025F	-	-	-	-	-	-	-	0.092	-	-	-	-	-	-	-	-	0.103	-	-	-
	025R																				
8	027F	0.318	-	0.400	-	-	0.298	-	0.298	0.767	-	-	-	0.513	-	0.272	-	-	0.263	0.139	-
	027R																				
9	029F	-	0.190	-	0.187	-	0.190	-	0.162	0.192	-	0.205	-	-	-	0.195	-	-	0.183	0.189	-
	029R																				
10	047F	0.232	-	-	-	-	-	-	0.205	0.419	-	0.251	-	0.414	-	0.202	-	-	0.198	-	-
	047R																				
11	048F	-	-	-	-	-	-	-	0.130	-	-	0.231	-	-	-	-	0.256	0.208	-	-	-
	048R																				
12	054F	-	0.300	-	-	-	-	-	0.205	-	-	0.230	-	-	-	0.297	-	-	0.300	-	-
	054R																				
13	055F	-	-	-	-	-	-	-	0.283	-	-	0.283	-	-	-	0.271	-	0.337	-	-	-
	055R																				
14	057F	-	-	-	-	-	-	-	0.268	-	-	0.417	-	-	-	0.331	-	-	0.247	-	-
	057R																				
15	058F	-	0.311	0.460	-	-	0.314	-	0.305	0.314	-	0.344	-	0.665	-	0.656	-	-	0.302	0.459	-
	058R																				
16	069F	-	-	-	-	-	-	-	0.196	-	-	0.317	-								
	069R																				
17	073F																				
	073R																				

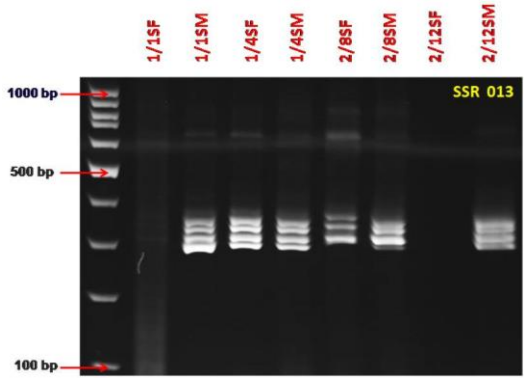
<u>ภาพ a</u> รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 17 คู่ไพร์เมอร์ ในคู่ผสมกาแฟ 10 คู่ผสม

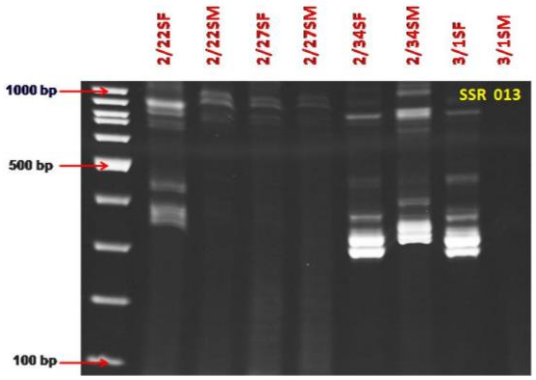


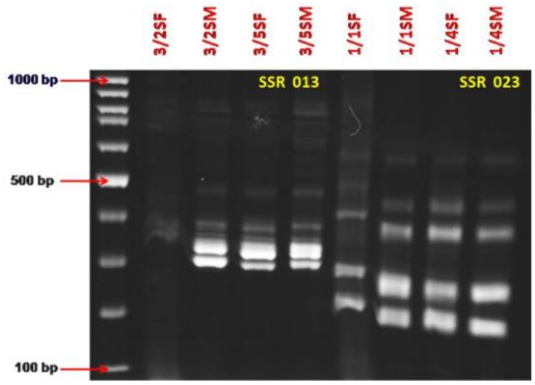

2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
3/2SF
3/2SM
3/5SF
3/5SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 007
1/1SF
1/1SM
1/4SF
1/4SM
2/8SF
2/8SM
2/12SF
2/12SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 010
2/22SF
2/22SM
2/27SF
2/27SM
2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 010
3/2SF
3/2SM
3/5SF
3/5SM
1/1SF
1/1SM
1/4SF
1/4SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 010
SSR 012

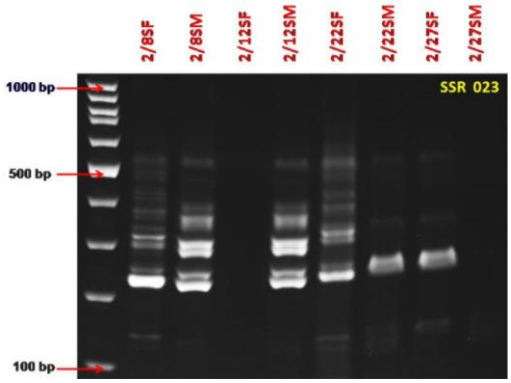

2/8SF
2/8SM
2/12SF
2/12SM
2/22SF
2/22SM
2/27SF
2/27SM
SSR 012
1000 bp
500 bp
100 bp

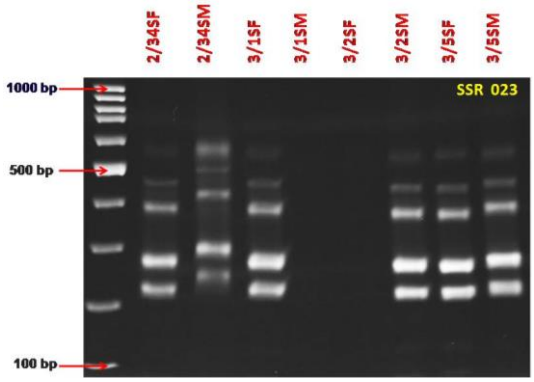

2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
3/2SF
3/2SM
3/5SF
3/5SM
SSR 012
1000 bp
500 bp
100 bp

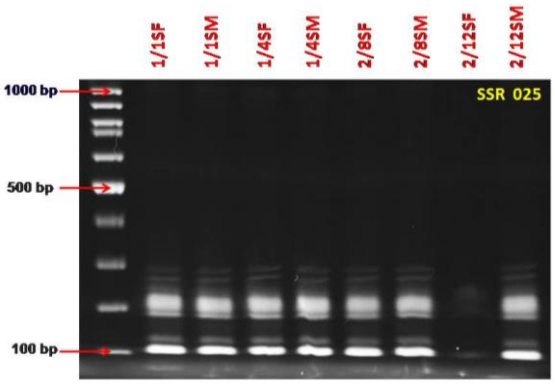

1/1SF
1/1SM
1/4SF
1/4SM
2/8SF
2/8SM
2/12SF
2/12SM
SSR 013
1000 bp
500 bp
100 bp

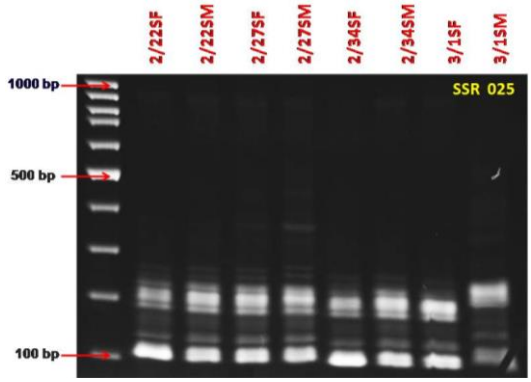

2/22SF
2/22SM
2/27SF
2/27SM
2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
SSR 013
1000 bp
500 bp
100 bp

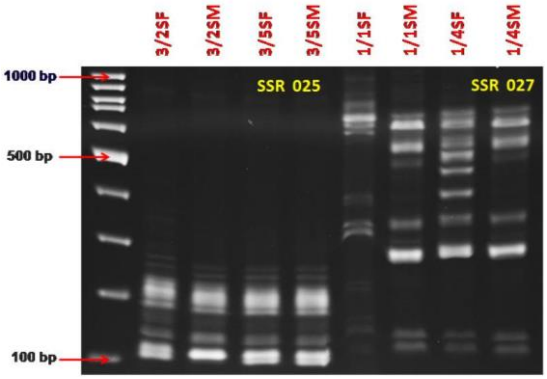

3/2SF
3/2SM
3/5SF
3/5SM
1/1SF
1/1SM
1/4SF
1/4SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 013
SSR 023

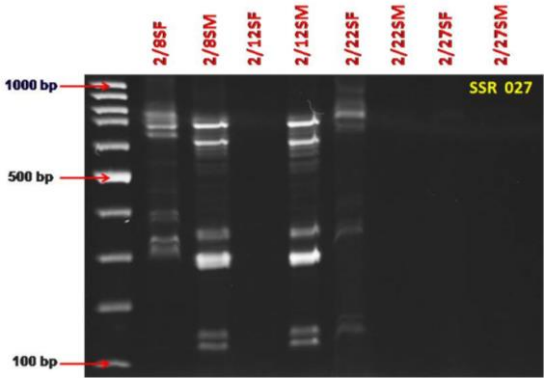

2/8SF
2/8SM
2/12SF
2/12SM
2/22SF
2/22SM
2/27SF
2/27SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 023

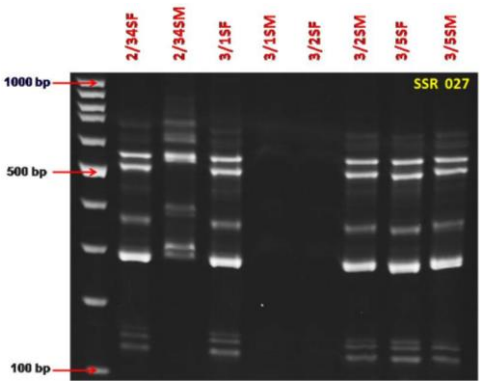

2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
3/2SF
3/2SM
3/5SF
3/5SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 023

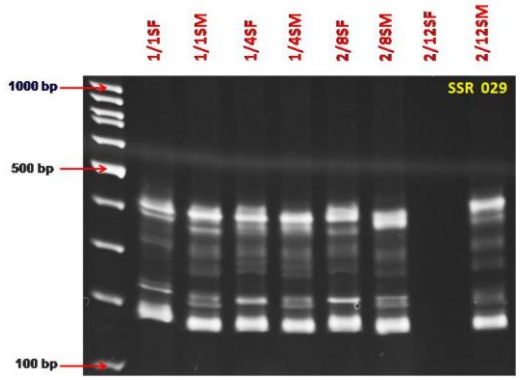

1/1SF
1/1SM
1/4SF
1/4SM
2/8SF
2/8SM
2/12SF
2/12SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 025

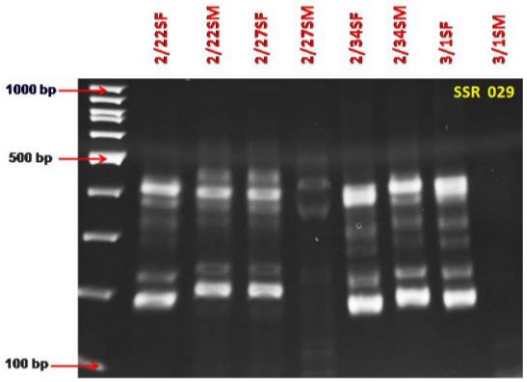

2/22SF
2/22SM
2/27SF
2/27SM
2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 025


3/2SF
3/2SM
3/5SF
3/5SM
1/1SF
1/1SM
1/4SF
1/4SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 025
SSR 027


2/8SF
2/8SM
2/12SF
2/12SM
2/22SF
2/22SM
2/27SF
2/27SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 027


2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
3/2SF
3/2SM
3/5SF
3/5SM
1000 bp
500 bp
100 bp
SSR 027


1/1SF
1/1SM
1/4SF
1/4SM
2/8SF
2/8SM
2/12SF
2/12SM
SSR 029
1000 bp
500 bp
100 bp


2/22SF
2/22SM
2/27SF
2/27SM
2/34SF
2/34SM
3/1SF
3/1SM
SSR 029
1000 bp
500 bp
100 bp

ตารางที่ 5 รายชื่อไพร์เมอร์ที่สังเคราะห์เพิ่มเติมจำนวน 31 คู่ SSR Primer (Alemayehu Teressa *et al.*)

No	SSR Locus code	Sequence Forward/Reverse
1	ssrR105	CACCAATTCCACTGACAATG/ TCCCTGCCAACACACTTC
2	ssrR126	GCACAATCACTCCCAAAG/ TGACGGCCTACTACTTACAG
3	ssrR175	GCAGTGACGCAGCAATG/ AAAAGGAGAGCCAAAGCAGT
4	ssrR209	CGGGGGTAAAAAGATTGTAA/ TTGGTGGGAGGGGAGTA
5	ssrR268	GTATCCCACAATGAAATCAC/ AGTAGAATTTTCAACATATAAG
6	ssrR278	TGTAGATTTGAAACCCAATC/ AAGTCTCGACAAGTTTTGAC
7	ssrR325	CCTTGTTGTTGGGGAATGTC/ GGCTGTTCTGGGCTTTGTG
8	ssrR338	CGAAGGCTGTCAACAACTGG/ GGGATAAACAAGTTAAAGGA
9	ssrR339	ATTATGCTCGCTGGGCTGTT/ TGGGATCACTCCTGTGTGGC
10	ssrA8783	CTTCGTATGGTTGTCTGTGT/ AATGATAGGAGGCACTTGAC
11	ssrA8837	AAAAGTGAGCACGTCATGTG/ GCGTGAGAGGGACCAT
12	ssrA8847	GCACACATGAAAAAGATGCT/ GATGGACAGGAGTTGATGG
13	ssrAY2434	CGCAAATGTTTATGTCAATC/ GCAACTTATGAGCCTAATCC
14	ssrAY2449	CGAAAATATGCTGCCCATTG/ CCGAACCCATAAGGTGTGAC
15	ssrZAP25	GCGAAATCTTTCTCCCTCCC/ CCGTCCTTTTCCTCGAACTC
16	ssrCMA008	CATTCTGGTCCTGATGCTCT/ TCATTCACTTATTAACGTCCATC
17	ssrCMA055	TTGAGCAAAAACCCTATTCC/ TAAACCCAAAAAGACCACAA
18	ssrCMA059	GATGGACAGGAGTTGATGGT/ TTTTAACACTCATTTTGCCAAT
19	ssrCMA151	GCCAGAAGAAGCTGGATGAC/ ACCGTCCTTTTCCTCGAACT
20	ssrCMA198	AGCAACTCCAGTCCTCAGGT/ TGGAAGCCCGCATATAGTTT
21	ssrCMA199	CATGCCATCATCAATTCCAT/ CTAGCTAGCTGGATCAGTACCC
22	ssrCMA233	CAACGAGATAACTGGCAGGTC/ CAAACCAATATTAGGAATAAAGAACG
23	ssrCMA263	TGCTTGGTATCCTCACATTCA/ ATCCAATGGAGTGTGTTGCT
24	SSR124577	GATGGCTTTTCTCCGTTATCC/ GGATTCGACTGCTGGATGAT
25	SSR122850	TCCAGTTTGATCAGCAACCA/ CCATCTTGGGGATAGAGCAA
26	SSR124195	ATCCCCATCAGAAGACCTCA/ CCTCCACCGCCTGTTTATTA
27	SSR119699	GCCGTGGTGGAAGATGTACT/ CGAGTTCACCAAGAACGTCA
28	SSR129793	CTTGTAGCGGGGAAAATTGA/ GCGATGGAAAAACCGATTAC
29	SSR123909	AGGCTTGCTGGAACTCTTGA/ GAAAGACTTGTCCTTTGCCG
30	SSR124161	TGCGAAACCATTGAGAACAG/ CCGGAGGATGAGATTGAAAA
31	SSR123557	ATCTCCTCGTTCTTCCCCAT/ GCTTGTAGCAGGCAGGAAAC

การทดสอบการจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 10 คู่ผสม ด้วยไพร์เมอร์ SSR

การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ชนิด SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง พบว่า บางตำแหน่งแสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ในคู่ผสมพันธุ์ต่างๆ ซึ่งตำแหน่งที่แตกต่างเหล่านี้ ถูกนำใช้ในการตรวจลูกผสมของคู่ผสมต่างๆ โดยใช้เทคนิค Electrophoresis ใน 2% agarose โดยมีรายละเอียดผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยไพร์เมอร์ SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง ทำการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 2% Electrophoresis

No.	Primer	ตำแหน่ง (bp)	Female	Male	ลูกต้นที่ 1	ลูกต้นที่ 2	ลูกต้นที่ 3	ลูกต้นที่ 4	ลูกต้นที่ 5	หมายเหตุ
1	SSR010F/010R		1/1SF	1/1SM	1/1B2T5					
		218	×	✓	×					2% AG
		162	×	✓	×					
		190	✓	×	✓					
		144	✓	×	✓					
	SSR023F/023R	248	×	✓	✓					พ่อไม่ขึ้นแถบ
	SSR025F/025R	133	×	✓	×					
		144	✓	×	✓					
		123	✓	×	✓					
	SSR029F/029R	265	×	✓	×					
		252	✓	×	✓					
		207	✓	×	✓					
	SSR047F/047R	296	✓	×	✓					พ่อไม่ขึ้นแถบ
		243	✓	×	✓					
	SSR058F/058R	296	✓	×	✓					พ่อไม่ขึ้นแถบ
		243	✓	×	✓					
2	SSR023F/023R		1/4SF	1/4SM	1/4B3T3					
		227	×	✓	✓					
		212	✓	×	×					
	SSR058F/058R	205	✓	✓	✓					
		237	✓	×	✓					
3	SSR012F/012R		2/8SF	2/8SM	2/8B1T3					พ่อไม่ขึ้นแถบ
		172	✓	×	✓					
		148	✓	×	✓					
	SSR013F/013R	354	✓	×	×					พ่อไม่ขึ้นแถบ
		329	×	×	✓					
	SSR023F/023R	311	×	✓	×					
		257	✓	×	✓					
	SSR027F/027R	405	×	✓	×					
		367	✓	×	✓					

		323	✓	×	✓					
	SSR029F/029R	273	✓	✓	✓					
		246	×	×	✓					????
		217	✓	✓	✓					
	SSR047F/047R	273	✓	✓	✓					
		217	✓	×	✓					
	SSR058F/058R	290	×	✓	×					

ตารางที่ 6(ต่อ) การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยไพร์เมอร์ SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง ทำการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 2% Electrophoresis

No.	Primer	ตำแหน่ง (bp)	Female	Male	ลูกต้นที่ 1	ลูกต้นที่ 2	ลูกต้นที่ 3	ลูกต้นที่ 4	ลูกต้นที่ 5	หมายเหตุ
		275	✓	×	✓					
		230	✓	×	✓					
4	SSR005F/005R		2/12SF	2/12SM	2/12B1T3	2/12B1T6	2/12 B2T1	2/12 B2T3	2/12 B3T6	พ่อไม่ขึ้นแถบ
		182	✓	×	✓	×	✓	✓	✓	
	SSR007F/007R	178	×	×	×	✓	×	×	×	พ่อไม่ขึ้นแถบ
		164	✓	×	✓	×	✓	✓	✓	??????
5	SSR005F/005R		2/22SF	2/22SM	2/22B2T5					
		261	✓	×	×					
		214	×	✓	✓					
	SSR012F/012R	166	✓	×	✓					
		150	×	✓	✓					
	SSR023F/023R	300	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		245	×	×	✓					
	SSR027F/027R	534	×	×	✓					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		363	×	✓	×					
		323	×	×	✓					
		274	×	×	✓					
	SSR029F/029R	261	✓	✓	✓					
		210	✓	✓	✓					
	SSR047F/047R	267	×	✓	×					
		261	✓	×	×					
		255	×	×	✓					
		227	×	✓	×					
		218	×	×	✓					
		226	✓	×	×					
		203	×	✓	✓					
	SSR058F/058R	279	×	✓	×					
		272	✓	×	×					
		258	×	×	✓					
		226	×	✓	×					

		203	×	×	✓					
	SSR069F/069R	160	✓	✓	✓					
		128	✓	✓	✓					
6	SSR005F/005R		2/27SF	2/27SM	2/27B4T5	2/27B5T4				แม่ไม่ขึ้นแถบ
		217	×	✓	×	×				
		184	×	×	✓	✓				
	SSR010F/010R	200	✓	×	×	×				
		184	×	✓	×	×				
		175	×	×	✓	✓				
		150	✓	×	×	×				
		139	×	✓	×	×				
		136	×	×	✓	✓				
	SSR012F/012R	169	✓	×	×	×				

ตารางที่ 6(ต่อ) การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยไพร์เมอร์ SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง ทำการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 2% Electrophoresis

No.	Primer	ตำแหน่ง (bp)	Female	Male	ลูกต้นที่ 1	ลูกต้นที่ 2	ลูกต้นที่ 3	ลูกต้นที่ 4	ลูกต้นที่ 5	หมายเหตุ
		157	×	×	✓	✓				
		142	×	✓	×	×				
		135	×	×	✓	✓				
	SSR029F/029R	254	×	✓	×	×				
		231	×	×	✓	✓				
		228	✓	×	×	×				
		218	×	✓	×	×				
		198	×	×	✓	✓				
		232	✓	×	×	×				
		202	×	✓	×	×				
		209	✓	×	×	×				
		187	×	✓	✓	✓				
		169	×	×	✓	✓				
7	SSR013F/013R		2/34SF	2/34SM	2/34B4T6					
		364	✓	×	×					
		329	×	×	✓					
		292	×	✓	×					
	SSR023F/023R	257	✓	×	×					
		216	×	✓	×					
		213	×	×	✓					
	SSR027F/027R	304	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		318	×	×	✓					
		286	×	×	✓					
		270	×	✓	×					
	SSR029F/029R	243	✓	✓	✓					

	SSR047F/047R	239	×	×	✓					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		230	×	✓	×					
		211	×	×	✓					
		205	×	✓	×					
	SSR048F/048R	159	✓	×	✓					
		157	×	✓	×					
	SSR054F/054R	213	×	×	✓					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		202	×	✓	×					
	SSR058F/058R	269	✓	×	×					
		256	×	×	✓					
		247	×	✓	×					
		241	✓	×	×					
		229	×	×	✓					
		213	×	✓	×					
8	SSR005F/005R		3/1SF	3/1SM	B7T10					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		174	×	✓	×					
	SSR007F/007R	151	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
	SSR010F/010R	164	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		126	×	✓	×					
	SSR012F/012R	135	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ

ตารางที่ 6(ต่อ) การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยไพร์เมอร์ SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง ทำการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 2% Electrophoresis

No.	Primer	ตำแหน่ง (bp)	Female	Male	ลูกต้นที่ 1	ลูกต้นที่ 2	ลูกต้นที่ 3	ลูกต้นที่ 4	ลูกต้นที่ 5	หมายเหตุ
	SSR013F/013R	289	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
	SSR023F/023R	231	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
	SSR025F/025R	132	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		108	×	✓	×					
	SSR027F/027R	518	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		287	×	✓	×					
		251	×	✓	×					
	SSR029F/029R	212	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		177	×	✓	×					
	SSR047F/047R	229	×	✓	×					แม่ไม่ขึ้นแถบ
		196	×	✓	×					
	SSR048F/048R	140	×	✓	×					
		166	✓	×	✓					
9	SSR005F/005R		3/2SF	3/2SM	3/2B7T7	3/2B7T8				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		203	✓	×	✓	✓				
	SSR007F/007R	193	×	✓	×	×				
		166	✓	×	✓	✓				
	SSR010F/010R	170	✓	×	✓	✓				

		139	×	✓	×	×				
		127	✓	×	✓	✓				
	SSR012F/012R	162	✓	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		142	✓	×	✓	✓				
	SSR013F/013R	314	✓	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ
	SSR023F/023R	236	✓	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ
	SSR025F/025R	143	✓	✓	✓	✓				
		119	✓	✓	✓	✓				
	SSR027F/027R	505	✓	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		462	✓	×	✓	✓				
		297	✓	×	✓	✓				
		262	✓	×	✓	✓				
	SSR029F/029R	237	×	×	✓	×				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		229	✓	×	×	✓				
		198	×	×	✓	×				
		193	✓	×	×	✓				
	SSR047F/047R	219	✓	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		184	✓	×	✓	✓				
	SSR048F/048R	144	✓	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ
	SSR054F/054R	208	×	×	✓	×				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		200	✓	×	×	✓				
	SSR055F/055R	211	×	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		197	✓	×	×	×				
		187	×	×	✓	✓				
		179	✓	×	×	×				
	SSR057F/057R	154	×	×	✓	×				พ่อไม่ขึ้นแถบ
		146	✓	×	×	✓				
	SSR058F/058R	244	✓	×	✓	✓				พ่อไม่ขึ้นแถบ

ตารางที่ 6(ต่อ) การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยไพร์เมอร์ SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง ทำการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 2% Electrophoresis

No.	Primer	ตำแหน่ง (bp)	Female	Male	ลูกต้นที่ 1	ลูกต้นที่ 2	ลูกต้นที่ 3	ลูกต้นที่ 4	ลูกต้นที่ 5	หมายเหตุ
		225	×	×	✓	✓				
		208	✓	×	✓	✓				
10	SSR007F/007R		3/5SF	3/5SM	3/5B7T1	3/5B7T9				
		154	✓	✓	✓	✓				
	SSR013F/013R	293	✓	×	×	×				
		283	×	✓	✓	✓				
	SSR027F/027R	518	×	✓	✓	✓				
		477	×	✓	✓	✓				
		311	✓	×	×	×				
		293	×	✓	✓	✓				

		271	✓	×	×	×				
		258	×	✓	✓	✓				
	SSR029F/029R	218	✓	✓	✓	✓				
		182	✓	✓	✓	✓				
	SSR047F/047R	220	✓	✓	✓	✓				
		189	✓	✓	✓	✓				
	SSR054F/054R	193	✓	✓	✓	✓				
	SSR058F/058R	222	✓	✓	✓	✓				
		204	×	✓	✓	✓				
		190	✓	✓	✓	✓				

พบลูกผสมชั่วที่ 1 ที่แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ทั้งในพ่อและแม่พันธุ์ จำนวน 7 คู่ผสม 8 สายต้น (ตารางที่ 7) ได้แก่

1. ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Caturra vermelho x K7 จำนวน 2 สายต้น ได้แก่ รหัส 1/1B2T5 และ 1/4B3T3
2. ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Caturra vermelho x Sanramon จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/8B1T3
3. ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Colombia (Colchin) x H.420/9 ML2/4-78-62-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/22B2T5
4. ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Typica x Catimor CIFC 7963-661-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/27B4T5
5. ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง H.528/46 ML2/10-29-65-29 x SL6 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/34B4T6
6. ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Sanramon x H.528/46 ML2/10-29-65-29 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 3/2B7T7
7. ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Sanramon x H.420/9 ML2/4-78-62-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 3/5B7T1

ตารางที่ 7 ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ทั้งในพ่อและแม่พันธุ์

แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ลูกผสมชั่วที่ 1
1/1SF	1/1SM	1/1B2T5
1/4SF	1/4SM	1/4B3T3
2/8SF	2/8SM	2/8B1T3
2/22SF	2/22SM	2/22B2T5
2/27SF	2/27SM	2/27B4T5
-	-	2/27B5T4
2/34SF	2/34SM	2/34B4T6
3/2SF	3/2SM	3/2B7T7
-	-	3/2B7T8
3/5SF	3/5SM	3/5B7T1
-	-	3/5B7T9

พบลูกผสมชั่วที่ 1 ที่แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่ตรวจพบในแม่พันธุ์ จำนวน 3 สายต้น (ตารางที่ 8) ได้แก่

1. ลูกผสมชั่วที่ 1 รหัส 2/12B1T3 ซึ่งมีแถบเหมือนแม่พันธุ์ H.420/9 ML2/4-78-62-36 รหัส 2/12B1SF
2. ลูกผสมชั่วที่ 1 รหัส 3/1B7T10 ซึ่งมีแถบเหมือนแม่พันธุ์ H.528/46 ML2/10-29-65-29 รหัส 3/1B7SF
3. ลูกผสมชั่วที่ 1 รหัส 3/2B7T7 ซึ่งมีแถบเหมือนแม่พันธุ์ H.528/46 ML2/10-29-65-29 รหัส 3/2B7SF

ตารางที่ 8 ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่ตรวจพบในแม่พันธุ์

แม่พันธุ์	พ่อพันธุ์	ลูกผสมชั่วที่ 1
2/12SF	2/12SM	2/12B1T3
-	-	2/12B2T1
-	-	2/12B2T3
-	-	2/12B2T16
3/1SF	3/1SM	B7T10
3/2SF	3/2SM	3/2B7T7
-	-	3/2B7T8

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

9.1 ได้พัฒนาวิธีการและตรวจยีนทนโรคราสนิม Sh3 เนื่องจากพบว่า ยีน Sh3 มีประสิทธิภาพในการทนต่อโรคราสนิมมากกว่ายีนอื่น ในพันธุ์กาแฟที่รวบรวมไว้ ด้วยเทคนิค melting temperature analysis ด้วย ดีเอ็นเอมาร์เกอร์ BA-124-12K-f และ Sat244 และมีประสิทธิภาพ และแม่นยำกว่าการใช้ gel electrophoresis

9.2 การตรวจ homozygous หรือ heterozygous ของยีน Sh3 ต้องมีการทดสอบในพันธุ์ที่มี Sh3 gene ทั้ง 2 แบบ เพื่อให้ได้ รูปแบบของ peak ที่ถูกต้อง สำหรับใช้เทียบกับตัวอย่างอื่น

9.3 ไม่พบ Sh3 gene ในลูกผสม (Arabica x Robusta) 25 accessions ด้วยวิธี melting temperature

9.4 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟพันธุ์ เชียงใหม่ 80 เปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ซึ่งการจำแนกความแตกต่างของกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 17 คู่ ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างกาแฟพันธุ์เชียงใหม่ 80 พันธุ์ Robuta พันธุ์ Liberica และพันธุ์ Typica พบว่ามีไพร์เมอร์เพียง 3 คู่เท่านั้นที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอในพันธุ์เชียงใหม่ 80 ได้ และมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ มีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากกาแฟอีก 3 พันธุ์ที่ทดสอบ ไพร์เมอร์ดังกล่าวได้แก่ 048, 058 และ 069 ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอในพันธุ์เชียงใหม่ 80 และมีรูปแบบที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน

9.5 การทดสอบและคัดเลือกคู่ไพร์เมอร์ SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์จำนวน 10 คู่ผสม โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 17 คู่ ในการจำแนกความแตกต่าง พบว่าแต่ละคู่ผสมมีไพร์เมอร์ที่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งต่างกันระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ได้ ที่แสดงถึงตำแหน่งดีเอนเอที่พบเพียงในพ่อหรือในแม่เท่านั้น ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ต่างหมายเลขกัน และพบว่าไพร์เมอร์บางหมายเลขสามารถแสดงรูปแบบดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ได้ โดยตำแหน่งดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างพ่อและแม่จะถูกใช้ในการตรวจในลูกผสม

9.6 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่พันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR พบว่า การจำแนกลูกผสมกาแฟอะราบิกา จำนวน 25 สายต้น จาก 10 คู่ผสม ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ชนิด SSR จำนวน 15 คู่ มีตำแหน่งในการทดสอบทั้งสิ้น 167 ตำแหน่ง พบว่า บางตำแหน่งแสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ในคู่ผสมพันธุ์ต่างๆ ซึ่งตำแหน่งที่แตกต่างเหล่านี้ ถูกนำใช้ในการตรวจลูกผสมของคู่ผสมต่างๆ โดยใช้เทคนิค Electrophoresis ใน 2% agarose พบว่า มีลูกผสมชั่วที่ 1 ที่แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ทั้งในพ่อและแม่พันธุ์ จำนวน 7 คู่ผสม 8 สายต้น ได้แก่

9.6.1 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Caturra vermelho x K7 จำนวน 2 สายต้น ได้แก่ รหัส 1/1B2T5 และ 1/4B3T3

9.6.2 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Caturra vermelho x Sanramon จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/8B1T3

9.6.3 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Colombia (Colchin) x H.420/9 ML2/4-78-62-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/22B2T5

9.6.4 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Typica x Catimor CIFC 7963-661-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/27B4T5

9.6.5 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง H.528/46 ML2/10-29-65-29 x SL6 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 2/34B4T6

9.6.6 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Sanramon x H.528/46 ML2/10-29-65-29 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 3/2B7T7

9.6.7 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Sanramon x H.420/9 ML2/4-78-62-36 จำนวน 1 สายต้น ได้แก่ รหัส 3/5B7T1

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอกาแฟพันธุ์ เชียงใหม่ 80 ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร และข้อมูลดีเอ็นเอของกาแฟลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในโครงการปรับปรุงพันธุ์กาแฟ

2. ได้มีการนำเสนอผลงาน และตีพิมพ์ ได้เผยแพร่งานวิจัยโดยมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศจำนวน 3 เรื่องคือ

2.1 Discrimination of SH3 Rust Resistant Gene in Coffee by Real-Time PCR แหล่งสืบค้น: http://cnki.caas.cn/KCMS/detail/detail.aspx?filename=DIDD201405015023&dbcode=IPFD&dbname=IPFD2014 และ http://coffja.com/17/image/17023.pdf

2.2 Discrimination of fragment linked to SH3 rust resistant gene in coffee by melting temperature analysis

แหล่งสืบค้น: http://asic-cafe.org/en/system/files/2014_pb242_sakuanrungsirikul.pdf

2.3 Research and Development of Arabica Coffee in Thailand แหล่งสืบค้น: http://asic-cafe.org/en/system/files/2014_a18_noppakoonwong.pdf

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

ข้าราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานราชการของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

12. เอกสารอ้างอิง :

Baruah A, Hendre PS, Rajkumar R, Rajendrakumar P, Aggarwal K. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L. showing wide cross-species amplifications. Mol. Ecol. Notes 3:647-650.

Bergamin-Filho, A. 1976. Possibilidades do emprego da resistência vertical no melhoramento do cafeeiro contra Hemileia vastatrix. Summa Phytopathol., 2, 103.

Bhat PR, Krishnakumar V, Hendre PS, Rajendrakumar P, Varshney RK, Aggarwal RK. 2005. Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeats markers from Robusta coffee variety “Cx R” (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* x *Coffea congensis*). Mol. Ecol. Notes 5:80-83.

Campa C, Noirot M, Bourgeois M, Pervent M, Ky CL, Chrestin H, Hamon S, de Kochko A. 2003. Genetic mapping of a caffeoyl-coenzyme A 3-0-methltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. Theor. Appl. Genet. 107:751-756.

Combes MC, Andrzejewski S, Anthony F, Bertrand B, Rovelli P, Grasiozi G, Lashermes P. 2000. Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. Mol. Ecol. Notes 9:1171-1193.

Coulibaly I, Revol B, Noirot M, Poncet V, Lorieux M, Carasco-Lacombe C, Minier J, Dufour M, Hamon P. 2003. AFLP and SSR polymorphism in a *Coffea* interspecific backcross progeny ((*C. heterocalyx* x *C. canephora*) x *C. canephora*). Theor. Appl. Genet. 107:1148-1155.

Crouzillat D, Rigoreau M, Bellanger L, Priyono P, Mawardi S, Syahrudi, McCarthy J, Tanksley S, Zaenudin I, Pétiard V. 2004. A Robusta consensus map using RFLP and microsatellite markers for the detection of QTL. In: 20th International Scientific Colloquium on Coffee. Bangalore, pp.546-553.

Dufour M, Hamon P, Noirot M, Risterucci AM, Brottier P, Vico V, Leroy T. 2001. Potential use of SSR markers for *Coffea* spp. genetic mapping. In: 19th International Scientific Colloquium on Coffee. Trieste, CD-ROM.

Eskes, A. B. 1983. Incomplete resistance to coffee leaf rust (Hemileia vastatrix). 140 f. Doctoral thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands

Ky CL, Barre P, Lorieux M, Trouslot P, Akaffou S, Louarn J, Charrier A, Hamon S, Noirot M. 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). Theor. Appl. Genet. 101:669–676.

Ky CL, Guyot B, Louarn J, Hamon S, Noirot M. 2001. Trigonelline inheritance in the interspecific *Coffeapseudozanguebariae* x *C. liberica* var. dewevrei cross. Theor. Appl. Genet. 102:630-634.

Lashermes P, Combes MC, Prakash NS, Trouslot P, Lorieux M, Charrier A. 2001. Genetic linkage map of *Coffeacanephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. Genome 44:589-596.

Leroy T.,Ribeyre, F., Bertrand, B., Charmetant, P., Dufour, M., Montagnon, C., Marraccini, P. and Pot, D. 2006. Genetics of coffee quality ; Minireview. Braz. J. Plant Physiol., 18(1):229-242.

Li, M. and D. J. Midmore. 1999. Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*E. dulcis* (Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPDs. *J. of Hort and Biotec*. 74 (2): 224-231.

Moncada P, McCouch S. 2004. Simple sequences repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. Genome 47:501-509.

N'diaye A. 2005. Etude de la différenciation génétique de *Coffea liberica* Hiern. Cartographie génétique du croisement interspécifique entre *Coffea liberica* et *Coffeacanephora*. Recherche de QTL. University of Montpellier, France, PhD thesis.

Paillard M, Lashermes P, Pétiard V. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet. 93:41-47.

Poncet V, Hamon P, Minier J, Carasco C, Hamon S, Noirot M. 2004. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). Genome 47:1071-1081.

Prakash N S, Muniswamy B, Hanumantha B.T. 2011. Marker assisted selection and breeding for leaf rust resistance in coffee (*Coffea Arabica* L.)–some recent leads[J]. The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 71(2): 1-6.

13. ภาคผนวก :