การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี

ปริญญานิพนธ์

ของ

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2554

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี

ปริญญานิพนธ์
ของ
วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2554
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี

บทคัดย่อ

ของ

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2554

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์. (2554). *การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์.

พืชสกุลระกำ (*Salacca*) จัดเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในจังหวัดจันทบุรี โดยพันธุ์เศรษฐกิจที่นิยมปลูกมี 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ แต่เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลนี้ ทำให้เกษตรกรไม่สามารถจำแนกพันธุ์ในระยะต้นกล้าได้ และมักถูกหลอกลวงโดยการปลอมปนต้นกล้าของพืชในสกุลเดียวกันที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำกว่า งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจในจังหวัดจันทบุรี โดยเริ่มจากการใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ที่มีความแตกต่างกันระหว่างพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ กับพืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ 2 พันธุ์ (สละไร้หนาม และระกำ) ผลการวิเคราะห์โดยใช้ RAPD primer จำนวน 200 ชนิด พบว่ามี primer 5 ชนิด ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำ ซึ่งในจำนวน 5 ชนิดนี้พบว่ามีเพียง 1 ชนิด (NAPS062) ที่แสดงรูปแบบของแถบ DNA (ขนาดประมาณ 750 คู่เบส) ที่มีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ ดังนั้นจึงทำการ clone หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่จำเพาะนี้ และออกแบบ SCAR primer 1 คู่ จากนั้นนำ SCAR primer คู่นี้ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ร่วมกับ genomic DNA ของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ซึ่งให้ผลที่น่าสนใจเป็น repetitive SCAR ที่ให้แถบ DNA ที่สำคัญ 2 แถบ ดังนี้ (i) แถบ DNA ขนาดประมาณ 220 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ และ (ii) แถบ DNA ขนาดประมาณ 410 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อสละหม้อเพศเมียเท่านั้น เมื่อนำ SCAR primer คู่นี้ไปทดสอบกับตัวอย่างพืชสกุลระกำที่เก็บเพิ่มเติมจากจังหวัดจันทบุรีทั้ง 5 พันธุ์ จำนวน 80 ต้น พบรูปแบบของแถบ DNA ที่แสดงความจำเพาะ 100% ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจและระบุเพศของสละหม้อได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการยืนยันต้นกล้าของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากเรือนเพาะชำที่จำหน่ายต้นพันธุ์ได้

DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR IDENTIFICATION OF ECONOMIC CULTIVARS OF *SALACCA* FROM CHANTHABURI PROVINCE

AN ABSTRACT

BY

WALAILAK HATTABOON

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Education Degree in Biology

at Srinakharinwirot University

October 2011

Walailak Hattaboon. (2011). *Development of Molecular Markers for Identification of Economic Cultivars of Salacca from Chanthaburi Province.* Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assist. Prof. Dr. Achariya Rangsiruji, Assist Prof. Dr. Jessada Denduangboripant.

Salacca is one of important economic plants in Chanthaburi Province. There are three economic cultivars, namely Sala-Sumalee, Sala-Nernwong and Sala-Mho. Due to morphological similarities of plants belonging to the genus *Salacca*, agriculturalists are not able to identify the cultivars at seedling stage. They are often deceived by a substitution of seedlings of other plants in the same genus but with lower economic value. This research therefore, aimed to develop molecular markers for identification of economic cultivars of *Salacca* in Chanthaburi Province. First, RAPD technique was used to examine DNA fingerprints which showed polymorphisms among the three economic cultivars of *Salacca* and two non-economic cultivars (Sala-Rainam and Rakam). Results based on 200 RAPD primers used revealed that five primers generated polymorphic bands among the cultivars. Of these five primers, only one primer (NAPS062) produced a DNA band (*ca*. 750 base pairs) specific to all three economic cultivars of *Salacca*. This DNA fragment was cloned, sequenced and a pair of SCAR primers was designed. PCR reactions employing this pair of SCAR primers with genomic DNA from all five cultivars of *Salacca* yielded interesting results with repetitive SCARs of two important DNA bands as follows: (i) a DNA band of *ca.* 220 base pairs specific to the three economic cultivars of *Salacca* and (ii) a DNA band of *ca.* 410 base pairs specific to female Sala-Mho only. When this pair of SCAR primers was tested against additional samples of all five *Salacca* cultivars with 80 individuals collected from Chanthaburi Province, resulting DNA patterns showed 100% specificity. This study therefore, has led to a success in distinguishing the economic cultivars of *Salacca* as well as determining the sex of Sala-Mho. This is certainly helpful in verifying the seedlings of economic cultivars of *Salacca* from retail nurseries.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ
จากจังหวัดจันทบุรี
ของ
วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2554

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(ดร.อภิรดา สถาปัตยานนท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ธวัช ดอนสกุล)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์
จาก

1. ทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2553
2. ทุนเงินรายได้บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2554
3. ทุนในโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความดูแลและช่วยเหลืออย่างยิ่งดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ เสนอแนะ รวมถึงการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ตลอดมา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์ในการจัดทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา ความเอื้ออาทรของท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณสุธีวรรณ บินชัย และคุณสิทธิพร ปานเม่น ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาด้านเทคนิคต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ที่ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้และทักษะในด้านการปฏิบัติการทดลองเพิ่มมากยิ่งขึ้นและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้า และเพื่อนร่วมรุ่น กศ.ม. ชีววิทยาทุกท่าน สำหรับกำลังใจที่มีค่ายิ่งที่มอบให้กันเสมอมา และคุณประโยชน์จากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดามารดาผู้ให้กำเนิด บูรพาจารย์ผู้ประสิทธิประสาทวิชา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	สมมติฐานการวิจัย	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	พืชสกุลระกำ	4
	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	4
	การขยายพันธุ์	6
	พืชสกุลระกำจากจังหวัดจันทบุรีที่นำมาศึกษา	7
	รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุลระกำ	12
	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	13
	การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD เพื่อการจำแนกพันธุ์พืช	14
	Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)	15
	การประยุกต์ใช้เทคนิค SCAR เพื่อการจำแนกพันธุ์พืช	15
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	17
	อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	17
	อุปกรณ์	17
	สารเคมี	17
	วิธีดำเนินการทดลอง	19
	การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลระกำที่นำมาศึกษา	19
	การสกัด DNA	19
	การจำแนกพันธุ์ของพืชสกุลระกำโดยเทคนิค RAPD	19
	การสร้าง SCAR marker	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลการทดลอง**	25
	การสกัด DNA	25
	การตรวจสอบรูปแบบของ DNA ด้วยเทคนิค RAPD	26
	การ clone และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำ พันธุ์เศรษฐกิจ	32
	การออกแบบ SCAR primer และการตรวจสอบโดย PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำ พันธุ์เศรษฐกิจ	34
	การประยุกต์ใช้ SCAR marker	35
5	**สรุปผลการทดลอง**	37
	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	37
	ข้อเสนอแนะ	39
บรรณานุกรม		40
ภาคผนวก		45
ประวัติผู้วิจัย		54

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา..... 17

2 RAPD primer 5 ชนิด ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำ..... 26

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลระกำ	5
2	ระกำ	7
3	สละไร้หนาม	8
4	สละเนินวง	9
5	สละหม้อ	10
6	สละสุมาลี	11
7	การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค RAPD	13
8	แผนที่ของ pGEM®-T Easy Vector	21
9	ผลของการสกัด total genomic DNA จากใบของพืชสกุลระกำที่ศึกษา	25
10	RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS062	27
11	RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS759	28
12	RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS760	29
13	RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS764	30
14	RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS766	31
15	consensus sequence ของสละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ ที่ได้จาก primer NAPS062	33
16	ผลของ PCR ที่ใช้คู่ของ SCAR primer เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ	35
17	ผลของ PCR ที่ใช้คู่ของ SCAR primer กับตัวอย่างพืชสกุลระกำที่เก็บเพิ่มเติม ทั้ง 5 พันธุ์	36

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

พืชสกุลระกำ (*Salacca*) จัดอยู่ในวงศ์ Arecaceae (วงศ์ย่อย Calamoideae) พบทั้งหมด 21 ชนิด (Govaerts; et al. 2006: online) มีการกระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชีย ตั้งแต่ทางตอนใต้ของมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน ทางตอนใต้ของประเทศพม่า ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ สำหรับประเทศไทยพืชในสกุลนี้ที่รู้จักเป็นอย่างดี ได้แก่ ระกำ (*Salacca wallichiana* Mart.) สละเนินวง (*Salacca* sp.) และสละหม้อ (*Salacca* sp.) ในประเทศไทยมีการปลูกพืชสกุลระกำมานานแล้ว และมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตดีและมีรสชาติเป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้ได้รับความนิยมในการบริโภคเพิ่มมากขึ้นและมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

ในประเทศไทยพื้นที่ปลูกพืชสกุลระกำส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด โดยเฉพาะจังหวัดจันทบุรีที่มีการเพาะปลูกมากที่สุด พืชสกุลระกำที่นิยมปลูกเป็นพันธุ์เศรษฐกิจ ได้แก่ สละเนินวง สละหม้อ และสละสุมาลี (*Salacca* sp.) ซึ่งนับเป็นผลไม้ที่ปัจจุบันได้รับการยอมรับว่าเป็นพืชทดแทนไม้ผลที่มีราคาตกต่ำ นอกจากนี้ต้นพันธุ์ยังมีราคาสูง ทำให้เกษตรกรจำหน่ายได้ทั้งผลและต้นพันธุ์ อีกทั้งพืชชนิดนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในเกือบทุกพื้นที่ทั้งที่ลุ่มและที่ดอน (คณะกรรมการชมรมผู้ปลูกสละจันทบุรี. 2544: 9-22)

ในปัจจุบันพืชสกุลระกำที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จะมีรสชาติที่หวาน นอกจากนี้ยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสรรพคุณเป็นยาแก้ไอ และขับเสมหะ นอกเหนือจากการบริโภคผลผลิตของพืชสกุลระกำในลักษณะผลไม้สดแล้ว ยังนิยมนำมาแปรรูปเพื่อเก็บรักษาและเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิต เช่น การแช่อิ่ม อบแห้ง กวน และการทำไวน์หรือน้ำผลไม้ เป็นต้น ทำให้ผลไม้ชนิดนี้เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคอย่างกว้างขวาง ส่วนในด้านการตลาดของพืชสกุลนี้ พบว่ามีการขยายตัวกว้างขวางขึ้น โดยจากสถิติของจังหวัดตราดใน พ.ศ. 2541 นั้น มีผลผลิตประมาณ 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ และได้เพิ่มขึ้นเป็น 8,500 กิโลกรัมต่อไร่ใน พ.ศ. 2545 ซึ่งเพิ่มขึ้นถึงกว่า 4 เท่าตัวในช่วงระยะเวลาเพียง 4 ปีเท่านั้น (นฤมล มานิพพาน. 2548: คำนำ) และจากสถิติของจังหวัดจันทบุรีในช่วงตั้งแต่ พ.ศ. 2543-2552 พบว่าจำนวนพื้นที่เพาะปลูกและปริมาณผลผลิตนั้นมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ โดยใน พ.ศ. 2552 มีปริมาณพื้นที่ปลูกรวม 14,330 ไร่ ซึ่งให้ผลผลิตรวม 16,618 ตัน (สำนักงานเกษตรจังหวัดจันทบุรี. 2553: ออนไลน์)

เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องการขยายพันธุ์ที่ส่วนใหญ่ต้องมีการล้มต้นแม่เพื่อนำตาจากบริเวณลำต้นมาใช้ในการขยายพันธุ์ จึงทำให้ต้นพันธุ์ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจมีราคาสูง และต้องมีการสั่งจองต้นกล้าจากเรือนเพาะชำ แต่เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืชในสกุลนี้ และจากการขาดมาตรการในการควบคุมการผลิตพันธุ์ไม้ของ

เรือนเพาะชำทั่วไป ทำให้ไม่มีการควบคุมมาตรฐานของต้นพันธุ์ที่จำหน่ายให้ตรงตามพันธุ์ได้ จึงยังคงมีการปลอมปนต้นกล้าของพืชสกุลระกำที่ไม่ตรงตามพันธุ์ ซึ่งเกษตรกรจะทราบหรือจำแนกลักษณะของแต่ละพันธุ์ได้ก็ต่อเมื่อพืชที่ปลูกออกดอกและผลแล้วซึ่งใช้ระยะเวลาถึง 3 ปี ทำให้ต้องมีการทำลายต้นพันธุ์ที่ไม่ต้องการทิ้ง เกษตรกรจึงเสียเวลาในการดูแลรักษาและยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อต้นพันธุ์ใหม่ซึ่งมีราคาแพง (สำนักงานเกษตรจังหวัดตราด. 2540: 1-10)

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้อย่างแพร่หลาย เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ในบริเวณที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันสั้น มีรายงานวิจัยจำนวนมากแสดงว่าเทคนิคที่อาศัยพื้นฐานของ PCR ได้แก่ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ของพืชชนิดต่างๆ ได้ เช่น ถั่วฝักยาว มะเขือเทศ แตงกวา ไผ่ ข้าวโพด และถั่วเขียว เป็นต้น (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2553: ออนไลน์) นอกจากนี้เพื่อให้ผลที่ได้มีความแม่นยำ คงที่สม่ำเสมอ (consistency) และสามารถตรวจสอบได้เมื่อทำการทดลองซ้ำ (reproducibility) จึงมีการใช้เทคนิค Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) ที่ประยุกต์มาจากเทคนิค RAPD หรือเทคนิคอื่นที่เพิ่มปริมาณ DNA แบบสุ่มหลายตำแหน่ง ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค SCAR ในการจำแนกพันธุ์พืช ได้แก่ มะกอก (Bautista; et al. 2002: 33-41) และแอพริคอต (Mariniello; et al. 2002: 749-755) ดังนั้นเทคนิค RAPD และเทคนิค SCAR จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้จำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อออกจากพืชสกุลระกำพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ เพื่อประโยชน์ต่อเกษตรกรในด้านการคัดเลือกต้นพันธุ์และการขยายพันธุ์ที่ต้องการ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่แม่นยำและมีความจำเพาะในการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี โดยอาศัยเทคนิค PCR เป็นพื้นฐาน

ความสำคัญของการวิจัย

พืชสกุลระกำเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดจันทบุรี โดยพันธุ์เศรษฐกิจที่นิยมปลูกมี 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ แต่เนื่องจากความคล้ายคลึงของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืชในสกุลนี้ ทำให้เกษตรกรไม่สามารถจำแนกพันธุ์ในระยะต้นกล้าได้ จึงถูกเอาเปรียบโดยการปลอมปนต้นกล้าของพืชในสกุลเดียวกันที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำกว่าจากเรือนเพาะชำที่จำหน่ายต้นพันธุ์ ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี จึงเป็นประโยชน์ในการยืนยันต้นกล้าของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากเรือนเพาะชำได้ นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชสกุลอื่นได้

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบพืชสกุลระกำจำนวน 5 พันธุ์ ประกอบด้วย พืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ และพืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ 2 พันธุ์ ได้แก่ สละไร้หนามและระกำ จากแหล่งเพาะปลูกในจังหวัดจันทบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างแต่ละพันธุ์ๆ ละ 5-10 ต้น สกัด DNA จากใบพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ตรวจสอบรูปแบบของ DNA ด้วยเทคนิค RAPD ตัดเฉพาะแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ เพื่อนำไป clone และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นออกแบบ SCAR primer และตรวจสอบผลโดย PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ และเพื่อยืนยันผลที่ได้จากเทคนิค SCAR จึงมีการขยายผลการวิจัยโดยนำ SCAR primer ที่มีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจไปทดสอบกับพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ซึ่งได้เก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากจังหวัดจันทบุรี

สมมติฐานการวิจัย

พืชสกุลระกำแต่ละพันธุ์ที่ปลูกในจังหวัดจันทบุรีมีความแตกต่างทางพันธุกรรม และน่าจะมีลายพิมพ์ DNA ที่จำเพาะ ที่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิค RAPD และ SCAR ซึ่งส่งผลให้สามารถจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชสกุลระกำ

พืชสกุลระกำ (*Salacca*) เป็นพืชมีดอกใบเลี้ยงเดี่ยวที่อยู่ในวงศ์ Arecaceae (วงศ์ย่อย Calamoideae) พบทั้งหมด 21 ชนิดทั่วโลก (Govaerts; et al. 2006: online) มีการกระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชีย ตั้งแต่ทางตอนใต้ของมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน ทางตอนใต้ของประเทศพม่า ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ราก มีระบบรากแบบรากฝอยแผ่กระจายไปตามผิวดิน ไม่หยั่งลึก สามารถเจริญไปไกลถึงกว่า 2 เมตร (สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. 2546: 15)

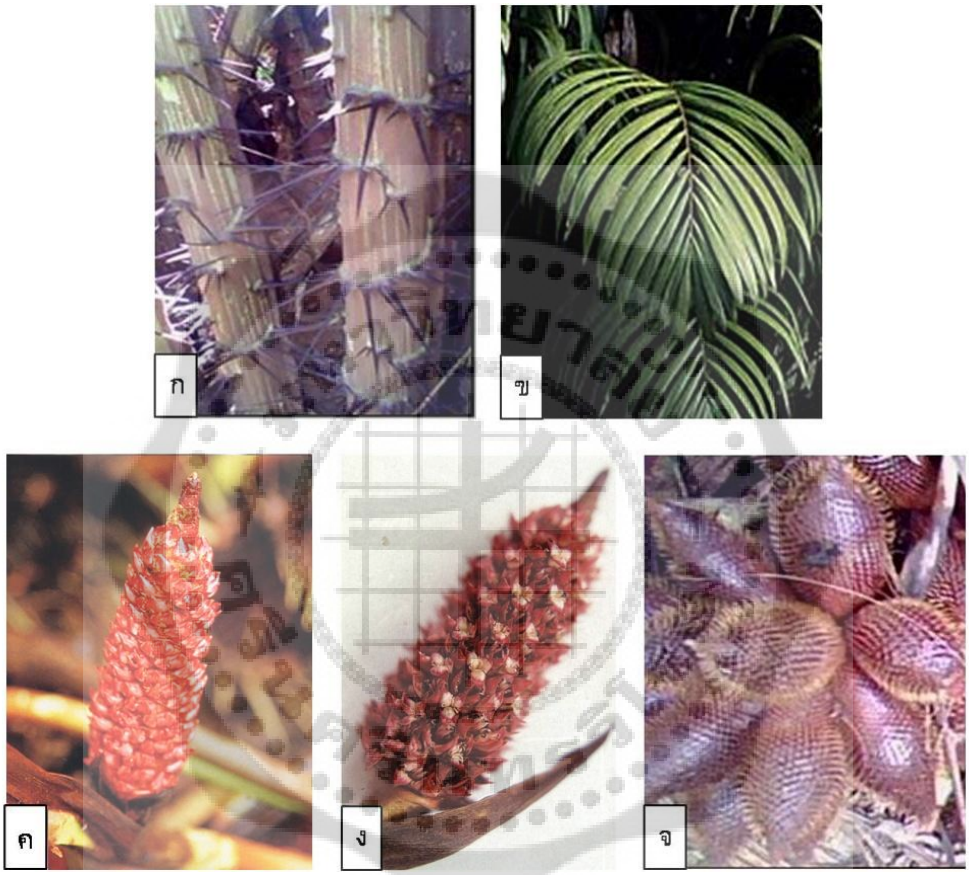
ลำต้น (ภาพประกอบ 1ก) อาจมีความสูงถึง 2-3 เมตร ขึ้นเป็นกอ และมีหนามแหลมโดยรอบ นอกจากนี้ยังมีลำต้นที่เอนทอดยาวไปตามพื้นดิน ซึ่งอาจมีรากงอกออกมาตรงส่วนที่สัมผัสกับดินและเกิดเป็นต้นใหม่ได้อีกด้วย (สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. 2546: 15-16)

หน่อ มี 3 ชนิด คือ หน่อชนิดแรกเป็นหน่อที่เกิดจากตาของลำต้นที่มีอายุมาก หน่อชนิดที่ 2 จะเกิดที่ปลายทะลายดอกที่มีอายุมาก หน่อจึงเกิดห่างจากลำต้นแม่ออกไป เมื่อหน่อมีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีน้ำหนักมาก โคนหน่อจะหย่อนตัวลงสัมผัสดินแล้วแทงรากออกทางด้านล่างของหน่อกลายเป็นต้นใหม่เกิดขึ้น สามารถแยกออกไปปลูกได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีหน่อชนิดที่ 3 ซึ่งเจริญออกจากรากแก่ได้เช่นกัน (สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. 2546: 16)

ใบ (ภาพประกอบ 1ข) ประกอบด้วยทางใบยาวประมาณ 3-6 เมตร เรียวยาว สีเขียวเข้ม มองเห็นก้านใบเด่นชัด ที่ใบและทางใบมีหนามแข็งแหลมคม เป็นหนามเดี่ยวหรือคู่ (สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. 2546: 16)

ดอก (ภาพประกอบ 1ค และภาพประกอบ 1ง) พืชสกุลระกำเป็นพืชประเภทแยกเพศกัน (dioecious) มีทั้งต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย เมื่อปลูกพืชสกุลระกำได้ประมาณ 3 ปี จึงมีทะลายดอก ซึ่งประกอบด้วยก้านทะลายดอก (อาจมีความยาวถึง 2 เมตร) ช่อดอก (มีจำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความยาวของก้านทะลายดอก) กาบหุ้มช่อดอก (มีลักษณะเป็นแผ่นยาว ปลายเรียวแหลมจะแห้งเป็นสีน้ำตาลก่อนที่ดอกจะบาน) ช่อดอกเป็นส่วนที่แยกออกมาจากก้านทะลายดอกประกอบด้วยดอกเล็กๆ จำนวนมาก (สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. 2546: 16) สำหรับช่อดอกบนต้นเพศผู้จะมีเฉพาะดอกที่มีเกสรเพศผู้ ซึ่งทำหน้าที่ผลิตละอองเกสรเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ ส่วนช่อดอกบนต้นเพศเมียนั้นมีทั้งดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite flower) และดอกเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminate flower) (สวนสละอาทิตย์. 2552: ออนไลน์)

ผล (ภาพประกอบ 1จ) เมื่อต้นอายุได้ 3 ปี จะเริ่มให้ผลผลิตและทยอยออกดอกตลอดปี เมื่อช่อดอกเพศเมียได้รับการผสมโดยเกสรเพศผู้แล้วจะให้ผลที่มีเปลือกลักษณะเป็นเกล็ดและมีหนามเล็กๆ เนื้อผลหนาและหอม เมื่อผลสุกเต็มที่เนื้อจะแน่นและไม่มีช่องว่างระหว่างเนื้อกับเปลือก (สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. 2546: 18)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลระกำ
ก: ลำต้น ข: ใบ ค: ช่อดอกเพศผู้ ง: ช่อดอกเพศเมีย จ: ผล

ที่มา: ก http://www.cmadong.com/board/index.php?topic=2635.1475. (2011: online)
ข http://www.asianflora.com/Arecaceae/Salacca-secunda.htm (2011: online)
ค สิริรักษ์ บางสุด. (2549). *สละ รสฉ่ำหวาน*. ครัว. 13(146): 86.
ง คณะกรรมการชมรมผู้ปลูกสะละจันทบุรี. (2544). *สาระของสะละ*. หจก. มิตรเกษตรการตลาดและโฆษณาฯ. หน้า 52.
จ http://www.kasetporpeang.com/forums/index.php?topic=19212.0 (2011: online)

การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์พืชสกุลระกำทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเมล็ด การตัดชำลำต้น การขยายพันธุ์ด้วยหน่อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2538: ออนไลน์)

การเพาะเมล็ด การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด แต่มีข้อด้อยคืออาจเกิดการกลายพันธุ์และต้นใหม่ที่ได้อาจไม่ใช่เพศเดียวกันกับต้นแม่

การตัดชำลำต้น ลำต้นที่จะนำมาใช้ชำควรมีอายุมากกว่า 10 ปีขึ้นไป โดยตัดส่วนของลำต้นให้มีตาติดอยู่แล้วนำไปชำในถุงพลาสติกที่มีอัตราส่วนดิน : แกลบ เท่ากับ 1 : 1 รดน้ำให้ชื้นอยู่เสมอนานประมาณ 3-4 เดือน ตาของพืชสกุลระกำจะแตกและเจริญเป็นต้นใหม่ที่มีใบและรากสมบูรณ์พร้อมนำไปปลูกได้ต่อไป การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ทำให้ได้ต้นที่เป็นเพศเดียวกันกับต้นแม่

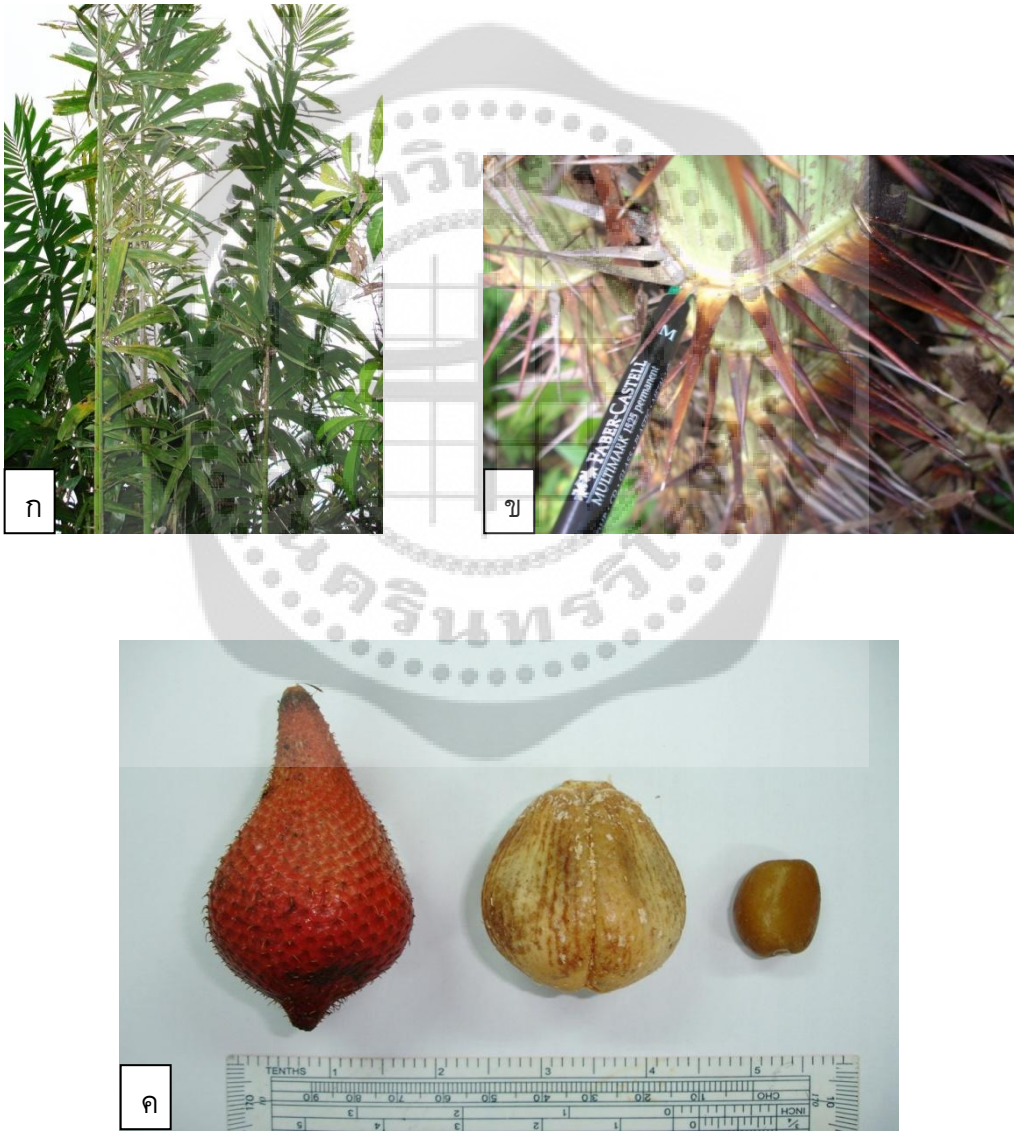
การขยายพันธุ์ด้วยหน่อ เมื่อพืชสกุลระกำมีหน่อแตกออกมา ควรตัดยอดของหน่อเพื่อกระตุ้นให้ตาข้างและรากเจริญเติบโตแล้วจึงแยกมาชำ แต่การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ได้ต้นพันธุ์ที่มีขนาดเล็กไม่อวบ และเมื่อนำลงปลูกในแปลงระยะแรกจึงเจริญเติบโตช้า

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ทำได้โดยการนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชสกุลระกำ เช่น ราก ใบอ่อน ยอด ตา หน่ออ่อน และคัพภะ เป็นต้น มาทดลองเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ พร้อมทั้งการควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสง

พืชสกุลระกำจากจังหวัดจันทบุรีที่นำมาศึกษา

1. ระกำ (*Salacca wallichiana* Mart.) (ภาพประกอบ 2)

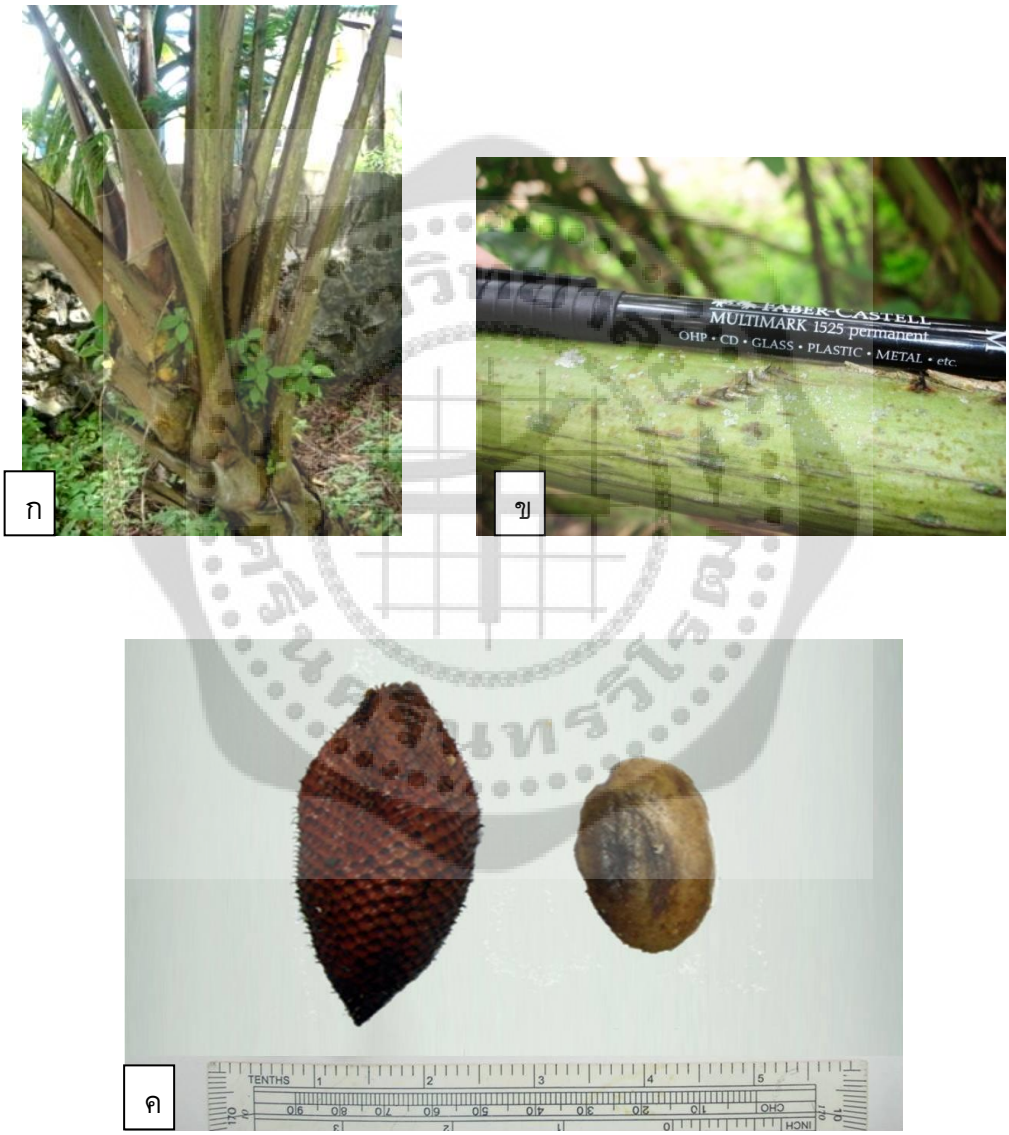
มีถิ่นกำเนิดจากประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย โดยในประเทศไทยสามารถพบตามธรรมชาติในป่าเขตภาคตะวันออกและภาคใต้ (สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. 2546: 11, 19) มีลำต้นและกิ่งก้านเต็มไปด้วยหนามยาวและแข็งปกคลุม ใบแตกออกเป็นกอใหญ่ สีเขียวแก่ ทางใบยาว ลักษณะของผลกลม ตรงปลายผลแหลม ผลอ่อนมีสีน้ำตาล เมื่อผลสุกจะเป็นสีแดงสด (ศูนย์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์. 2553: ออนไลน์)



ภาพประกอบ 2 ระกำ ก: ลำต้น ข: หนาม ค: ผล เนื้อผล และเมล็ด

2. สละไร้หนาม (*Salacca* sp.) (ภาพประกอบ 3)

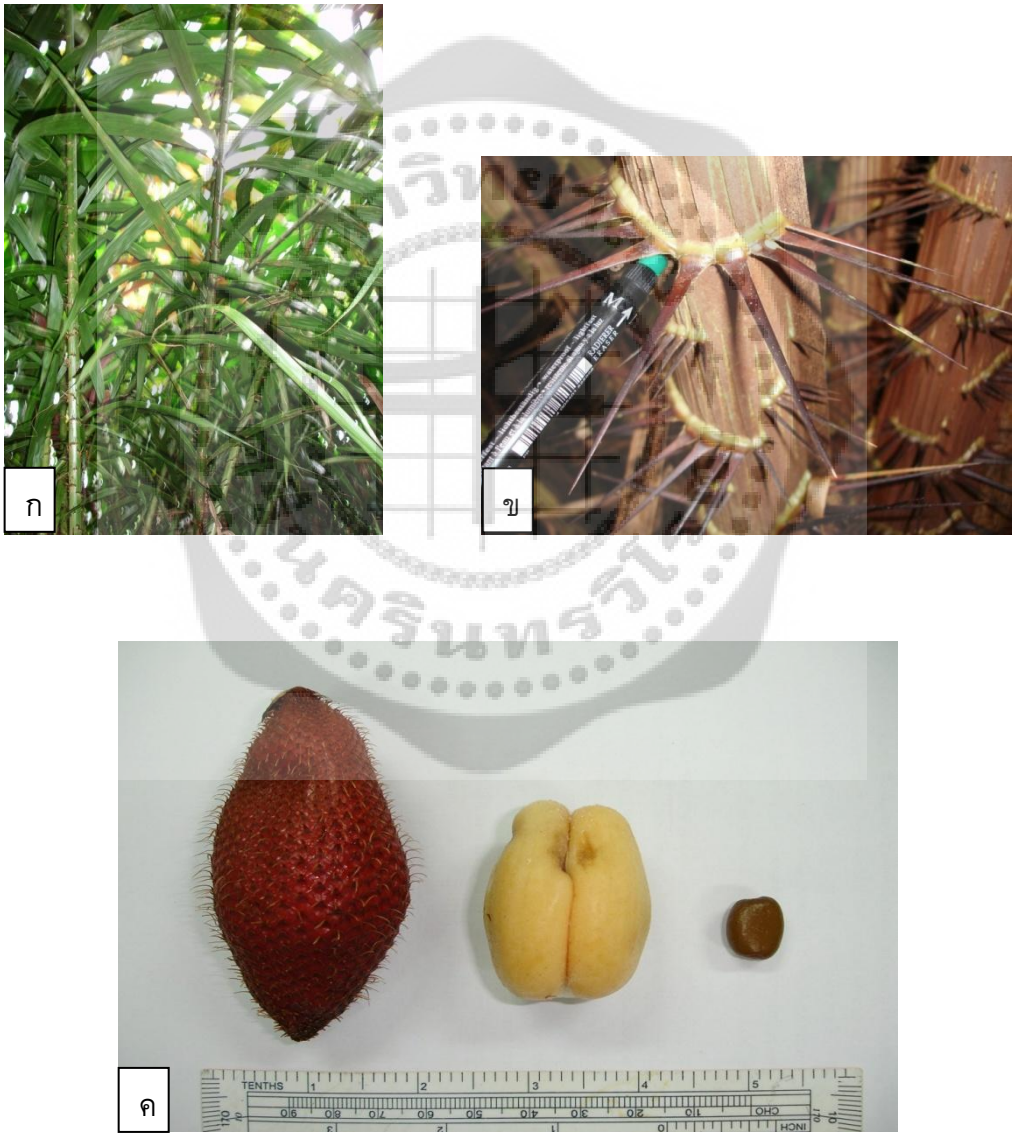
มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย มีลำต้นคล้ายระกำแต่ไม่มีหนาม ใบและทางใบใหญ่ ผลอ่อนมีสีน้ำตาลไหม้ แต่เมื่อผลสุกจะมีสีแดงอมส้มคล้ายระกำ เปลือกผลมีหนาม ขนาดของผลยาวกว่าระกำ ผลมีลักษณะฉ่ำน้ำและมีรสหวานอมเปรี้ยว เมล็ดมีขนาดใหญ่และเนื้อติดเมล็ด (สวนสละ อาทิตย์. 2552: ออนไลน์)



ภาพประกอบ 3 สละไร้หนาม ก: ลำต้น ข: หนาม ค: ผลและเนื้อผล

3. สละเนินวง (*Salacca* sp.) (ภาพประกอบ 4)

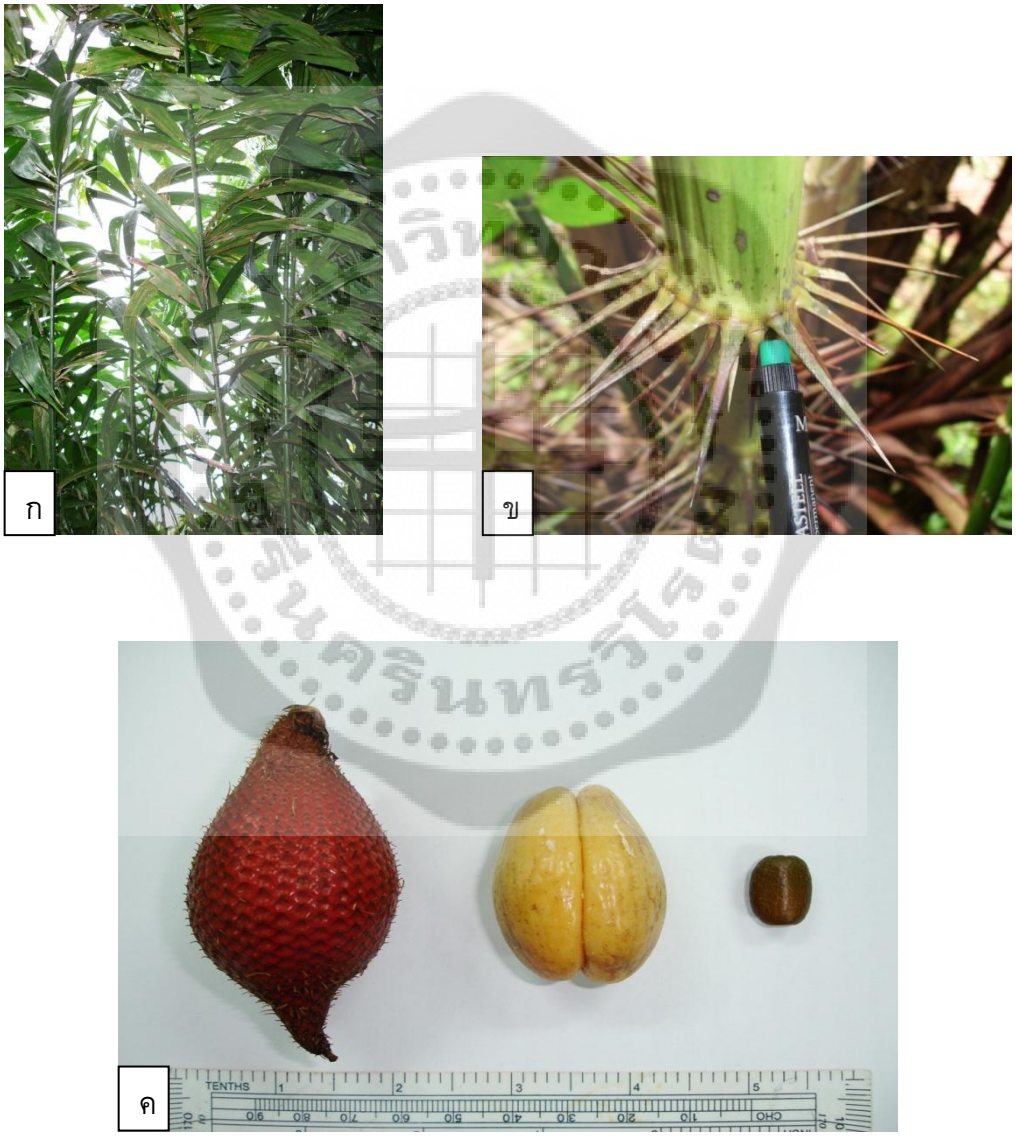
มีถิ่นกำเนิดในจังหวัดจันทบุรีมานานกว่า 100 ปี เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุด ลำต้นขึ้นเป็นกอแต่ไม่แน่นเหมือนระกำ ใบยาวและอ่อนลู่ (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2542: ออนไลน์) ผลมีรูปร่างยาวหัวท้ายเรียวคล้ายกระสวย หนามผลยาว อ่อนนิ่ม ผลอ่อนมีสีน้ำตาลไหม้ เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง เนื้อผลสุกมีสีเหลืองนวล หนานุ่ม รสชาติหวานฉ่ำอมเปรี้ยว มีกลิ่นหอมเมล็ดเล็ก เป็นที่นิยมของผู้บริโภค (คณะกรรมการชมรมผู้ปลูกสละจันทบุรี. 2544: 14)



ภาพประกอบ 4 สละเนินวง ก: ลำต้น ข: หนาม ค: ผล เนื้อผล และเมล็ด

4. สละหม้อ (*Salacca* sp.) (ภาพประกอบ 5)

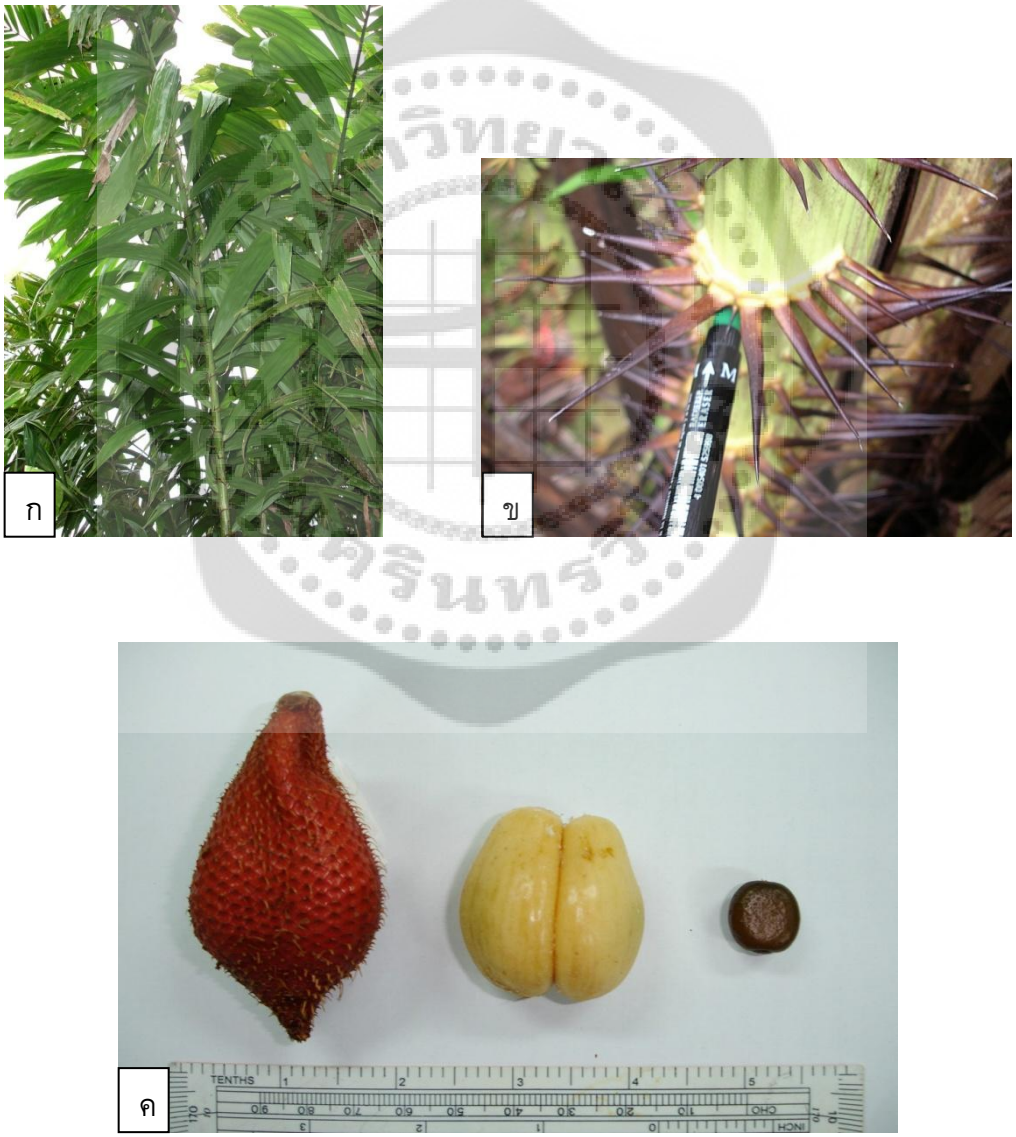
มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย ลำต้นมีขนาดเล็กและใบมีสีเข้ม ทางใบมีขนาดเล็กกว่าระกำ ปลายใบสั้น หนามยาวเล็กและอ่อน ช่อดอกยาว ติดผลง่าย ลักษณะผลมักยาวกว่าระกำ ด้านท้ายของผลเป็นจงอย เปลือกผลสีแดงเข้มมีหนาม เนื้อสีน้ำตาลหนาแต่ไม่แน่น ฉ่ำน้ำ รสชาติหวาน มีกลิ่นเฉพาะ เมล็ดเล็ก (นฤมล มานิพพาน. 2548: 27)



ภาพประกอบ 5 สละหม้อ ก: ลำต้น ข: หนาม ค: ผล เนื้อผล และเมล็ด

5. สละสุมาลี (*Salacca* sp.) (ภาพประกอบ 6)

มีถิ่นกำเนิดในจังหวัดจันทบุรี เป็นสละพันธุ์ใหม่ที่เริ่มเพาะปลูกในปี พ.ศ. 2535 ลักษณะลำต้นคล้ายระกำ ทางใบยาวมีสีเขียวอมเหลือง ใบใหญ่กว้าง ปลายใบสั้น ช่อดอกใหญ่ ติดผลง่าย (คณะกรรมการชมรมผู้ปลูกสละจันทบุรี. 2544: 14-17) รูปผลเรียว ผลอ่อนสีน้ำตาลไหม้ เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีแดง เปลือกผลมีหนามปกคลุม เนื้อผลหนาสีเหลืองอ่อน รสชาติหวานและมีกลิ่นหอมพิเศษเฉพาะตัว เป็นที่นิยมของผู้บริโภคมากและมีราคาแพง (สำนักงานเกษตรอำเภอท่าใหม่. 2552: ออนไลน์)



ภาพประกอบ 6 สละสุมาลี ก: ลำต้น ข: หนาม ค: ผล เนื้อผล และเมล็ด

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุลระกำ

ในการจำแนกพันธุ์พืชส่วนใหญ่นิยมใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ในพืชบางพันธุ์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจมีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ค่อนข้างน้อย นอกจากนี้ลักษณะดังกล่าวอาจมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงมีการใช้ biochemical marker เช่น isozyme ซึ่งพบว่าสามารถใช้จำแนกพันธุ์พืชได้หลายชนิด เช่น กีวี (Messina; Testolin; & Morgante. 1991: 899-902) มะนาว (Satrabhandhu; et al. 1996: 249-253) มะม่วง (ศิวพร จินตนาวงศ์; และสุจิตรา จางตระกูล. 2539) และทุเรียน (สุภาพ สุนทรนนท์; และคนอื่นๆ. 2539) และในการใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพบว่าสามารถแยกได้เพียง 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มสละและกลุ่มระกำ แต่ไม่สามารถจำแนกถึงระดับพันธุ์ได้ (ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล; และคนอื่นๆ. 2539)

การศึกษาคาริโอไทป์ของพืชสกุลระกำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ระกำ สละเนินวง สละหม้อ สละสายน้ำผึ้ง สละพอนโดะและสละบาหลี พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 ซึ่งพันธุ์ที่ได้มาจากประเทศอินโดนีเซีย (สละพอนโดะและสละบาหลี) พบแซทเทลไลท์โครโมโซมจำนวน 1 คู่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวไม่พบในพันธุ์ที่ได้จากประเทศไทย ดังนั้นแซทเทลไลท์โครโมโซมสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกพันธุ์ของพืชสกุลระกำในประเทศไทยออกจากอินโดนีเซียได้ (อัจฉริยา รังษิรุจิ; และคนอื่นๆ. 2549: 48-61) อย่างไรก็ดีจนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่พบการศึกษาใดที่สามารถจำแนกพันธุ์ต่างๆ ของพืชสกุลระกำที่พบในประเทศไทยได้

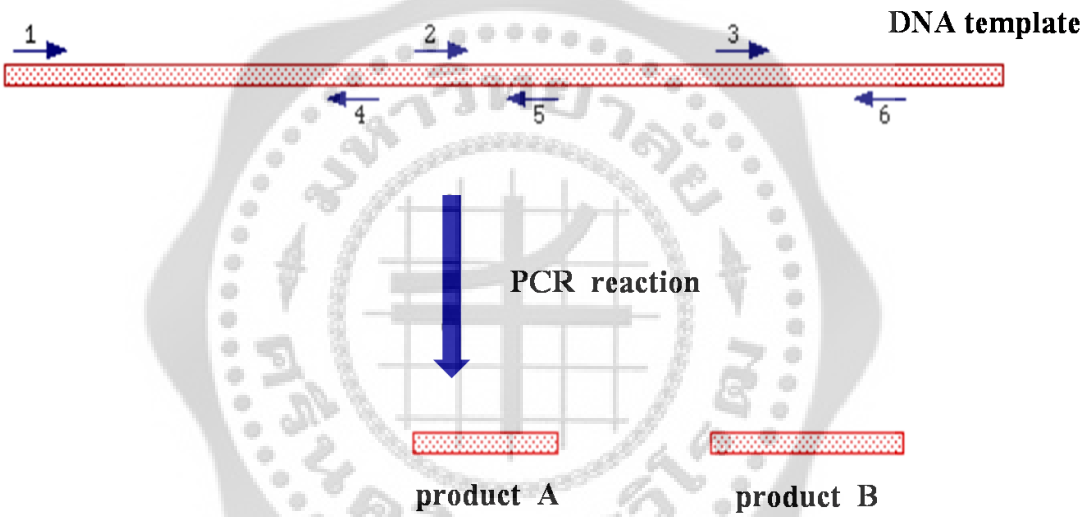
การศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพืชสกุลระกำจำนวน 12 taxa จากประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย โดยใช้บริเวณ internal transcribed spacer ของ nuclear ribosomal DNA พบว่า พืชสกุลระกำจากทั้ง 3 ประเทศสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน และพบว่าพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย ระกำ สละไร้หนาม สละสายน้ำผึ้ง และสละหม้อ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สละเนินวง และสละสุมาลี (Rangsiruji; et al. 2006: 98) สำหรับพืชสกุลระกำพันธุ์ต่างๆ เหล่านี้ถ้าต้องการจำแนกพันธุ์ให้ชัดเจนควรใช้เทคนิคที่ให้ผลแม่นยำและมีความจำเพาะต่อพันธุ์ (cultivar specific marker)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิด เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) เป็นต้น เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์พืช ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้อาศัย DNA และเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR-based technique) ทำให้มีความเสถียรกว่าการใช้ isozyme marker และสามารถตรวจสอบ

ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยได้ โดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอาจมีผลต่อการศึกษาเพียงเล็กน้อย (Micales; & Bonde. 1995: 115-130)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เทคนิค RAPD เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ล่วงหน้า เนื่องจาก primer ที่ใช้มีขนาดสั้น (ความยาวประมาณ 8-12 นิวคลีโอไทด์) และอุณหภูมิที่ให้ primer เข้าจับกับ DNA template ต่ำ (ประมาณ 37-40°C) จึงสามารถเพิ่มโอกาสการเกิด PCR product ขนาดต่างๆ ที่ใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้



ภาพประกอบ 7 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค RAPD ลูกศรแสดงตำแหน่งการจับแบบสุ่มของ primer บน DNA template และ PCR product ที่ได้คือ product A และ product B

ที่มา: http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html (2011: online)

การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD เพื่อการจำแนกพันธุ์พืช

พัฒนา ศรีฟ้า และคนอื่นๆ (2538: 164-173) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อแยกความแตกต่างของหญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides* Nash) 10 พันธุ์ จากงานวิจัยพบว่า primer 14 ชนิด ทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีขนาดตั้งแต่ 150 ถึง 2,300 คู่เบส จำนวน 158 แถบ และพบว่า primer 8 ชนิด คือ J-4, J-12, P-2, Q-2, R-2, R-6, R-12 และ S-11 สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์หญ้าแฝกทั้ง 10 พันธุ์ได้ชัดเจน

สุจิตรา จางตระกูล (2538: 177-185) นำ RAPD marker มาใช้จำแนกพันธุ์ของหวาย (*Calamus* species) 9 ชนิด และ clone ของหวายขริง (*Calamus palustris* Griff.) 20 clone พบว่า primer Operon 13 สามารถเพิ่มปริมาณ DNA และใช้จำแนกพันธุ์ของหวายได้ โดยพบ species specific marker ของหวายแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังสามารถจำแนก clone ของหวายขริง ซึ่งมีลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน

ธีระชัย ธนานันต์ (2542: 686) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบพันธุ์ต่างๆ ของพริก (*Capsicum* species) ในประเทศไทย จากตัวอย่างจำนวน 14 พันธุ์ พบว่ามี primer 20 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ในปริมาณสูง โดย primer บางชนิดทำให้เกิดแถบ DNA ที่จำเพาะกับพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง และพบ primer เพียงชนิดเดียวที่สามารถจำแนกพริกทั้ง 14 พันธุ์ได้

สมจิตต์ ทินกระโทก และคนอื่นๆ (2542) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อจำแนกพันธุ์กล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L.) พบว่ามี primer 11 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของกล้วยน้ำว้าทั้ง 19 พันธุ์ที่ศึกษา โดยให้แถบ DNA ที่แตกต่างกันจำนวน 114 แถบ นอกจากนี้ยังพบว่ามี primer 5 ชนิด ที่ให้แถบ DNA ที่จำเพาะในกล้วยน้ำว้าบางพันธุ์ ได้แก่ primer OPA-13 ให้แถบ DNA ขนาด 907 และ 1,404 คู่เบส ในกล้วยน้ำว้ามุกดาหาร และ primer OPC-11, OPC-15, OPD-03 และ OPD-13 ให้แถบ DNA ขนาด 1,250, 473, 967 และ 742 คู่เบส ในกล้วยน้ำว้านครศรีธรรมราช กล้วยน้ำว้าไส้เหลือง กล้วยน้ำว้าอ่องชัยภูมิ และกล้วยน้ำว้าสุรินทร์ ตามลำดับ

นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์ (2544: 172-175) ใช้ RAPD primer จำนวน 144 ชนิด เพื่อตรวจสอบส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) พันธุ์สายน้ำผึ้งและขาวน้ำผึ้ง พบว่ามี primer 131 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ และในจำนวนนี้พบว่า primer 36 ชนิด ให้ลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน

นฤมล ธนานันต์ และมานะ ขาวเมฆ (2549: 15-23) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบพันธุ์บัวหลวง (*Nilumbo nucifera* Gaertn.) จำนวน 6 พันธุ์ในประเทศไทย พบว่ามี primer จำนวน 31 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ในปริมาณสูง โดย primer บางชนิดให้แถบ DNA ที่จำเพาะกับพันธุ์ด้วย และพบ primer เพียงชนิดเดียวที่สามารถจำแนกบัวหลวงทั้ง 6 พันธุ์ได้

อมรรัตน์ พรหมบุญ และคนอื่นๆ (2552) ศึกษาการจำแนกหม่อน (*Morus* species) พันธุ์พื้นเมืองโดยใช้ RAPD marker พบว่า Operon primer จำนวน 62 ชนิด ให้แถบ DNA ที่แตกต่างในหม่อน 3 พันธุ์ และในการจำแนกหม่อนพันธุ์พื้นเมืองนั้น ได้เลือกใช้ primer จำนวน 33 ชนิด เพื่อทำการวิเคราะห์ในตัวอย่าง 2 ชุด รวม 25 พันธุ์ พบว่าแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้มี 543 แถบ มีขนาดระหว่าง 160-2,720 คู่เบส ทุก primer ให้ลักษณะแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน

จาวอร์นิค และคัมพ์ (Javornik; & Kump. 1993: 35-39) ใช้ RAPD primer เพื่อศึกษาการจำแนกพันธุ์ของ buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) และพบว่า primer 3 ชนิด สามารถจำแนก buckwheat 3 พันธุ์ได้

ไมอินี สมิต และพรีโทเรียส (Mienie; Smit; & Pretorius. 1995: 43-49) ใช้เทคนิค RAPD สำหรับการระบุพันธุ์ถั่วเหลืองแอฟริกาใต้ (*Glycine max* (L.) Merr.) จำนวน 37 พันธุ์ พบว่ามี primer 14 ชนิด ให้แถบ DNA ที่แตกต่างกัน 22 แถบ ซึ่งสามารถจำแนกถั่วเหลืองทั้ง 37 พันธุ์ออกจากกันได้

ฮามาดะ และฮากิโมริ (Hamada; & Hagimori. 1996: 215-218) ศึกษาการจำแนกพันธุ์ของคาลล่า ลิลลี่ (calla lily) (*Zantedeschia* species) จำนวน 13 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD จากการใช้ primer 60 ชนิด พบว่ามี primer 6 ชนิด ที่สามารถจำแนกพันธุ์คาลล่า ลิลลี่ ออกจากกันได้

หลี่ หลิว และเพิง (Li; Liu; & Peng. 2010) ศึกษาการจำแนกพันธุ์พีช (*Prunus persica* (L.) Batsch) จำนวน 6 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า primer 25 ชนิด ให้แถบ DNA ที่แตกต่างกันจำนวน 65 แถบ และจากการทดลองใช้ทั้ง primer เดี่ยว และ primer คู่ ทำให้สามารถแยกพีชทั้ง 6 พันธุ์ ออกจากกันได้

Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)

เทคนิค SCAR ใช้ตรวจสอบความผันแปรของแถบ DNA ที่ประยุกต์มาจากเทคนิค RAPD หรือเทคนิคอื่นที่เพิ่มปริมาณ DNA แบบสุ่มหลายตำแหน่ง โดยการ clone และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่มีความแตกต่าง เพื่อออกแบบ primer ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA แถบนั้นเพียงแถบเดียวโดยเทคนิค PCR ดังนั้นผลที่ได้จึงมีความแม่นยำกว่าผลของ RAPD พร้อมทั้งมีความคงที่สม่ำเสมอ และสามารถตรวจสอบได้เมื่อทำการทดลองซ้ำ

การประยุกต์ใช้เทคนิค SCAR เพื่อการจำแนกพันธุ์พืช

คิม และคนอื่นๆ (Kim; et al. 2000: 125-128) ศึกษาการใช้ SCAR marker เพื่อการระบุพันธุ์สาลี่ (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak.) จำนวน 19 พันธุ์ โดยออกแบบคู่ SCAR primer ที่จำเพาะจำนวน 7 คู่ คือ LCH322, LCH322-1, LCH322-4, LCH350, LCH351, LCH384 และ LCH387 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RAPD marker 6 ชนิด ซึ่งให้แถบ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกสาลี่ทั้ง 19 พันธุ์ได้

บาวทิสตา และคนอื่นๆ (Bautista; et al. 2002: 33-41) สามารถระบุพันธุ์มะกอก (*Olea europaea* L.) จำนวน 22 พันธุ์ ที่มาจากพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันได้ โดยใช้ SCAR primer จำนวน 10 คู่ ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RAPD marker

มาริเนลโล และคนอื่นๆ (Mariniello; et al. 2002: 749-755) สามารถจำแนกพันธุ์แอพริคอต (*Prunus armeniaca* L.) จำนวน 19 พันธุ์ โดยใช้ RAPD marker ซึ่งพบว่ามี primer 1 ชนิด จากทั้งหมด 44 ชนิด ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของแอพริคอต และพบว่า SCAR marker ที่ได้มาจาก RAPD marker สามารถจำแนกพันธุ์แอพริคอตจากทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี อเมริกาเหนือ และประเทศกรีซ ออกจากกันได้

หวาง และคนอื่นๆ (Wang; et al. 2007) ตรวจสอบพันธุ์ของสตรอเบอรี่ (*Fragaria* species) จำนวน 32 พันธุ์ โดยใช้ RAPD และ SCAR marker พบว่ามี RAPD primer 8 ชนิด ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกันจำนวน 71 แถบ สามารถจำแนกสตรอเบอรี่ได้จำนวน 25 พันธุ์ และพบว่า SCAR marker ที่พัฒนาจาก RAPD marker จำนวน 2 ชนิด คือ WS01 และ WS02 ให้ผลที่สอดคล้องกับผลของ RAPD ซึ่งสามารถจำแนกสตรอเบอรี่จำนวน 25 พันธุ์ได้

ลี และคนอื่นๆ (Lee; et al. 2010) สามารถระบุพันธุ์ชิโสะ (*Perilla frutescens* L.) จำนวน 30 พันธุ์ โดยใช้ SCAR primer ที่จำเพาะจำนวน 7 คู่ ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RAPD marker 7 ชนิด

จากการศึกษารายงานการวิจัยที่ผ่านมาแสดงว่าเทคนิค RAPD และ SCAR สามารถใช้จำแนกพันธุ์ของพืชหลายชนิดได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่แม่นยำ และมีความจำเพาะในการยืนยันพันธุ์ของพืชสกุลระกำ เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกต้นพันธุ์และตรวจสอบต้นกล้าพันธุ์เศรษฐกิจของพืชสกุลนี้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (thermal cycler)
2. ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis apparatus)
3. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet transilluminator)
4. ชุดถ่ายภาพเจล (gel documentation system)
5. เครื่องชั่งสาร
6. ไมโครปิเปต (micropipette)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)
8. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)
9. ตู้เย็น 4°C และ -20°C
10. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
11. หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ไมโครลิตร
12. แท่งบดพลาสติกสำหรับบดใบพืช

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมี	บริษัท
10x buffer	QIAGEN
6x loading dye	New England Biolabs
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs
Agar powder	Himedia
Agarose	BIO-RAD
Ammonium acetate	Riedel-de Haen
Ampicillin	Roche
Bacto™ Yeast Extract	Difco

ตาราง 1 (ต่อ)

สารเคมี	บริษัท
β-mercaptoethanol	Sigma
Boric acid	Promega
Chloroform	Merck
CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)	Fluka
dNTP mixture	BIO-RAD
*Eco*RI	Promega
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	Promega
Ethanol	Merck
Ethidium bromide	BIO-RAD
Glacial acetic acid	Merck
Glucose	GibcoBRL
Hydrochloric acid	Merck
IPTG (isopropylthiogalactoside)	Promega
Isoamyl alcohol	Sigma
Isopropanol	Merck
Magnesium chloride	QIAGEN
Nuclease-free water	GibcoBRL
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega
Potassium acetate	Merck
QIAGEN® Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAquick™ Gel Extraction Kit	QIAGEN
RNase A	QIAGEN
SDS (sodium dodecyl sulphate)	Promega
Sodium chloride	Univar
Sodium hydroxide	Merck
Taq DNA polymerase	QIAGEN
Tris base	Promega
Tryptone Type I	Himedia
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside)	Promega

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสกุลระกำที่นำมาศึกษา

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบพืชสกุลระกำจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ จากแหล่งเพาะปลูกในจังหวัดจันทบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างแต่ละพันธุ์ แบ่งเป็นพันธุ์ที่มีปลูกเฉพาะเพศเมีย (สละสุมาลี และสละเนินวง) พันธุ์ละ 5 ต้น และพันธุ์ที่มีปลูกทั้งเพศผู้และเพศเมีย (สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ) พันธุ์ละ 10 ต้น โดยแบ่งเป็นเพศผู้ 5 ต้น และเพศเมีย 5 ต้น

2. การสกัด DNA

สกัด total genomic DNA จากใบของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ด้วยวิธีการ CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของดอยล์และดอยล์ (Doyle; & Doyle. 1987: 11-15) ก่อนการสกัด DNA ทำความสะอาดใบพืชด้วย 70% ethanol ตัดใบพืชให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม liquid nitrogen แล้วบดใบพืชให้ละเอียดโดยเร็ว จากนั้นเติม CTAB buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (2% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2% (v/v) β-mercaptoethanol) นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้ส่วนผสมเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม RNase A (10 mg/mL) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติม “wet” chloroform (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลงเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใสส่วนบนไว้ และสกัดซ้ำด้วย “wet” chloroform อีกครั้งหนึ่ง เติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง เติม wash buffer (76% ethanol, 10 mM ammonium acetate) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง และดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นทำให้ DNA pellet แห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 10 นาที ละลาย DNA pellet ที่ได้ด้วย nuclease-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 x*g* เป็นเวลา 2 นาที

3. การจำแนกพันธุ์ของพืชสกุลระกำโดยเทคนิค RAPD

3.1 การเตรียม DNA template

สำหรับพืชสกุลระกำที่มีปลูกเฉพาะเพศเมีย (สละสุมาลี และสละเนินวง) แบ่ง DNA ที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างพันธุ์ละ 5 ต้น ออกมาตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร แล้วรวม DNA เป็น 1 ตัวอย่าง ส่วนพืชสกุลระกำที่มีปลูกทั้งเพศผู้และเพศเมีย (สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ) แบ่ง DNA ที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างเพศละ 5 ต้น ออกมาตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร แล้วรวม DNA เป็น 1 ตัวอย่างเช่นกัน ดังนั้นจึงมีตัวอย่าง DNA ที่ศึกษาทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอย่าง

3.2 การเพิ่มขยายปริมาณ DNA โดยเทคนิค RAPD

เพิ่มขยายปริมาณ DNA จากตัวอย่างของพืชสกุลระกำทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ RAPD primer ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mers) จำนวน 200 ชนิด (ภาคผนวก) เริ่มต้นโดยการเตรียม PCR reaction ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 2 ng/μL DNA template, 1x PCR buffer, 0.25 mM dNTP แต่ละชนิด, 2.5 mM $MgCl_2$, 1x Q-solution, 1 μM RAPD primer และ 0.03 U/μL *Taq* DNA polymerase นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

Initial heating	94°C	1.5	นาที	
Denaturation	94°C	1	นาที	40 รอบ
Annealing	37°C	1	นาที	
Extension	72°C	2	นาที	
Final extension	72°C	5	นาที	

ตรวจสอบผลที่ได้จากการทำ PCR โดยวิธี electrophoresis โดยใช้ 1% (w/v) agarose ใน 1x TBE buffer (เจือจางจาก 10x TBE stock : 89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้คือ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide และส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต วิเคราะห์รูปแบบของแถบ DNA เพื่อค้นหาแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) อย่างชัดเจนในพืชสกุลระกำที่ศึกษา

3.3 การยืนยันผลของเทคนิค RAPD กับตัวอย่างพืชสกุลระกำ

คัดเลือก RAPD primer ที่ให้แถบ DNA ปรากฏ ซึ่งแสดงความแตกต่างในพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ (จากข้อ 3.2) นำ primer แต่ละชนิดมาทดสอบกับ DNA ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องแต่ละตัวอย่าง เพื่อยืนยันผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD กับตัวอย่างของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละต้น

4. การสร้าง SCAR marker

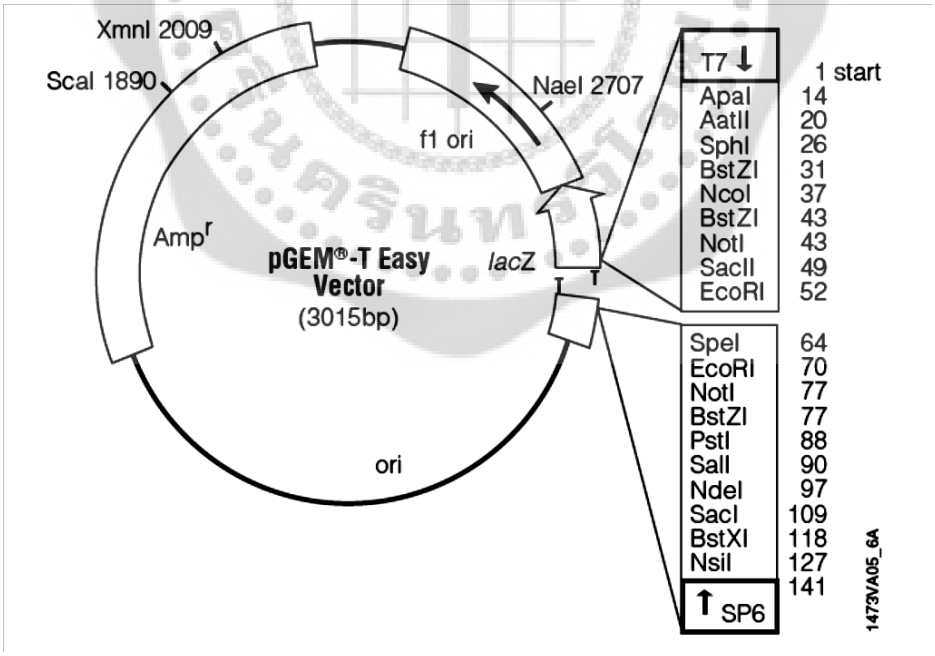
4.1 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

เมื่อพบแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำ ตัดแถบ DNA ที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัด DNA ออกจากชิ้น agarose gel โดยใช้ QIAquick™ Gel Extraction Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ชั่งน้ำหนักชิ้น agarose gel แล้วเติม QG buffer ในปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้น agarose gel นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 50°C จนกว่าชิ้น agarose gel จะละลายหมด ระหว่างนี้ให้ผสมขึ้นลงเบาๆ ทุก 2-3 นาที จากนั้นเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม isopropanol ในปริมาตรเท่ากับน้ำหนักชิ้น

agarose gel เริ่มต้น ผสมให้เข้ากันแล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick® column ทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายที่ผ่าน column ออกมาทิ้งและเติม QG buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ทั้งหมด เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ทั้งหมด นำ column ไปวางไว้บนหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม nuclease-free water ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เก็บ DNA ที่ผ่าน column (PCR product ที่บริสุทธิ์) ไว้ใช้ต่อไป ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 x*g*

4.2 การ clone ชิ้น PCR product

ใช้ pGEM®-T Easy Vector (ภาพประกอบ 8) สำหรับการ clone ชิ้น PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (insert) โดยการเตรียม ligation mixture ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย molar ratio ที่เหมาะสมระหว่าง DNA vector กับ insert พร้อมด้วย 3 unit T_4 DNA ligase และ 1x Rapid Ligation Buffer ผสมส่วนผสมทั้งหมดเบาๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ insert เชื่อมต่อกับ plasmid vector ทำให้ได้ recombinant plasmid



ภาพประกอบ 8 แผนที่ของ pGEM®-T Easy Vector

ที่มา: Promega, pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Promega technical manual

4.3 การนำ recombinant plasmid เข้าสู่ competent cell และการคัดเลือก transformant ด้วยวิธี blue-white screening

นำ recombinant plasmid เข้าสู่ competent cell (*Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue) โดยการผสม ligation mixture ปริมาตร 15 ไมโครลิตร กับ competent cell ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน นำไปไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วย้ายกลับไปไว้ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 20 นาที เติม LB broth (1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) Bacto™ Yeast Extract, 1% (w/v) sodium chloride) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ cell culture ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,935 x*g* เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งโดยให้เหลือไว้ประมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมขึ้นลงเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์กระจายตัว เตรียม LB agar 2 plate ที่เติม ampicillin (100 μg/mL), X-gal (40 mg/mL) และ IPTG (200 ng/mL) โดยแต่ละ plate ดูด cell culture 50 ไมโครลิตร มา spread แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

คัดเลือก colony ที่มี recombinant plasmid ด้วยวิธี blue-white screening โดยอาศัยหลักการที่ pGEM®-T Easy Vector มีบริเวณสำหรับการ clone อยู่ภายในยีน *lac* Z ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ที่สามารถย่อย X-gal และทำให้เปลี่ยนจากสารไม่มีสีให้เป็นสีน้ำเงิน ดังนั้น colony ที่ได้รับ plasmid ที่ปราศจาก insert จะมีสีน้ำเงิน เนื่องจากยังมียีน *lac* Z ที่สมบูรณ์ ในขณะที่ colony ที่ได้รับ plasmid ที่มี insert (recombinant plasmid) จะมีสีขาว เนื่องจากไม่มีการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase เพื่อย่อย X-gal

เลือก colony สีขาวจำนวน 10 colony ที่ได้จากการ clone ชิ้น PCR product จากพืชสกุลระกำพันธุ์ต่างๆ มา streak บน LB agar ที่มี ampicillin (100 μg/mL) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C

4.4 การสกัด plasmid โดยวิธี alkaline lysis

นำ colony สีขาวแต่ละ colony ที่เลือกไว้ทั้งหมดมาเลี้ยงใน LB broth 1.5 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin (100 μg/mL) โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำ cell culture มาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วเติม GTE buffer (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)) 100 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายดี ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที การสกัด plasmid โดยวิธี alkaline lysis โดยดัดแปลงจากวิธีของแซมบรูค ฟริทช์ และเมเนียทิส (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 1989) เริ่มจากการเติม 1% (w/v) SDS ใน 0.2 N sodium hydroxide ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน cell culture ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม 3 M potassium acetate (60% (v/v) 5 M potassium acetate, 11.5% (v/v) glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 7 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เติม absolute ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ว

นำมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสทิ้งให้หมด ล้าง plasmid DNA ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 10 นาที ละลาย plasmid DNA ด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับนำไปวิเคราะห์หา recombinant plasmid ที่มี insert ที่ต้องการต่อไป ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 x*g*

4.5 การวิเคราะห์หา recombinant plasmid ที่มี insert ที่ต้องการ

ใช้ *Eco*RI endonuclease ในการตรวจหา recombinant plasmid ซึ่งบรรจุชิ้น DNA insert ที่ต้องการ โดยใน reaction ที่มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย plasmid ปริมาตร 8 ไมโครลิตร (จากวิธี alkaline lysis), 1x *Eco*RI buffer, 1 unit *Eco*RI endonuclease และ 10 mg/mL RNaseA ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี electrophoresis (1% (w/v) agarose)

4.6 การสกัด plasmid โดยใช้ QIAGEN® Plasmid Mini Kit

การสกัด plasmid และการทำให้บริสุทธิ์ได้ดำเนินการตามคู่มือของ QIAGEN® Plasmid Mini Kit โดยมีขั้นตอนดังนี้ เลือก colony สีขาว (2 colonies/insert) ที่ตรวจสอบแล้วว่ามี recombinant plasmid ที่ต้องการอยู่ มาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin (100 μg/mL) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำ cell culture มาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งให้หมด เติม P1 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายดี เติม P2 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม P3 buffer ที่แช่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนเก็บไว้ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เตรียม QIAGEN-tip column โดยนำมาวางบนหลอดปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติม QBT buffer 1 มิลลิลิตร เพื่อปรับสภาพสมดุลของ column รอให้สารละลายไหลผ่าน column ออกมาจนหมด ดูดสารละลายที่เก็บไว้ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ใส่ลงใน QIAGEN-tip column รอให้สารละลายไหลผ่าน column ออกมาจนหมด แล้วล้าง QIAGEN-tip column ด้วย QC buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง ย้าย QIAGEN-tip column มาวางบนหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์อันใหม่ ชะ plasmid DNA ออกจาก QIAGEN-tip column โดยการเติม QF buffer ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เก็บสารละลายที่ผ่าน column ออกมาทั้งหมด เติม isopropanol ปริมาตร 560 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายทิ้ง เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ดูด ethanol ออกให้หมด นำ plasmid DNA ไปอบที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม nuclease-free water ปริมาตร 35 ไมโครลิตร เพื่อละลาย plasmid DNA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ในการปั่นเหวี่ยงแต่ละครั้งใช้ความเร็ว 13,800 x*g*

4.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ insert และการออกแบบ SCAR primer

นำ plasmid ที่พบว่ามี insert ที่ต้องการ (2 colonies/insert) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ SP6 promoter primer และ T7 promoter primer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุลระกำที่ศึกษากับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST จากนั้นวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับออกแบบ SCAR primer ที่จำเพาะต่อพันธุ์ของพืชสกุลระกำ ตรวจสอบคุณสมบัติของ SCAR primer ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer Design Ver. 2.0 (Scientific & Educational Software. 1990-1991)

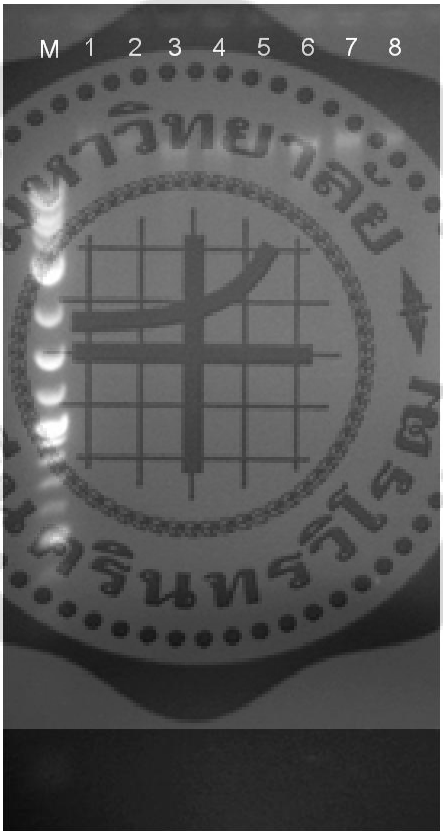
4.8 การประยุกต์ใช้ SCAR marker

นำ SCAR primer ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ไปทดสอบความจำเพาะต่อพันธุ์ของพืชสกุลระกำที่ศึกษาโดยใช้ตัวอย่างเดิมจำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR (annealing step ที่ ~50-60°C และจำนวน PCR cycle 30 รอบ) จากนั้นขยายผลการวิจัยโดยนำคู่ของ SCAR primer ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปทดสอบกับตัวอย่างพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ที่เก็บเพิ่มเติมจากจังหวัดจันทบุรี โดยเก็บตัวอย่างใบจากพืชจำนวน 80 ต้น ซึ่งแบ่งเป็นสละสุมาลีและสละเนินวงพันธุ์ละ 10 ต้น (เพศเมียทั้งหมด) สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ พันธุ์ละ 20 ต้น (เพศผู้พันธุ์ละ 10 ต้น และเพศเมียพันธุ์ละ 10 ต้น) โดยผ่านขั้นตอน PCR ตรวจสอบผลที่ได้จากการทำ PCR ทุกครั้งด้วยวิธี electrophoresis (1% (w/v) agarose gel)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การสกัด DNA

ผลของการสกัด total genomic DNA จากใบของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อ สละไร้หนาม และระกำ โดยประยุกต์ใช้วิธีการ CTAB แสดงในภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 ผลของการสกัด total genomic DNA จากใบของพืชสกุลระกำที่ศึกษา

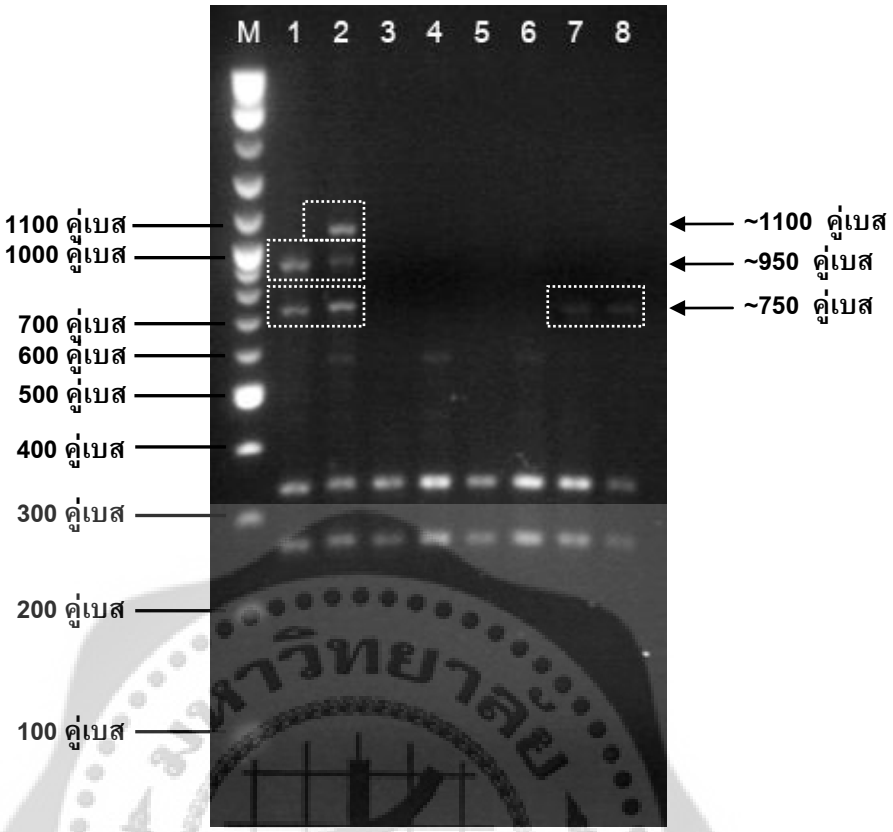
Lane M: 2-Log DNA marker, lane 1: สละสุมาลี, lane 2: สละเนินวง, lane 3: สละไร้หนามเพศผู้, lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย, lane 5: ระกำเพศผู้, lane 6: ระกำเพศเมีย, lane 7: สละหม้อเพศผู้, lane 8: สละหม้อเพศเมีย

การตรวจสอบรูปแบบของ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

การตรวจสอบรูปแบบของ DNA จากตัวอย่างของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ primer จำนวน 200 ชนิด พบว่ามี primer จำนวน 158 ชนิด ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และในจำนวนนี้พบ primer ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ primer NAPS062, NAPS759, NAPS760, NAPS764 และ NAPS766 ดังรายละเอียดแสดงในตาราง 2 และภาพประกอบ 10-14 ตามลำดับ

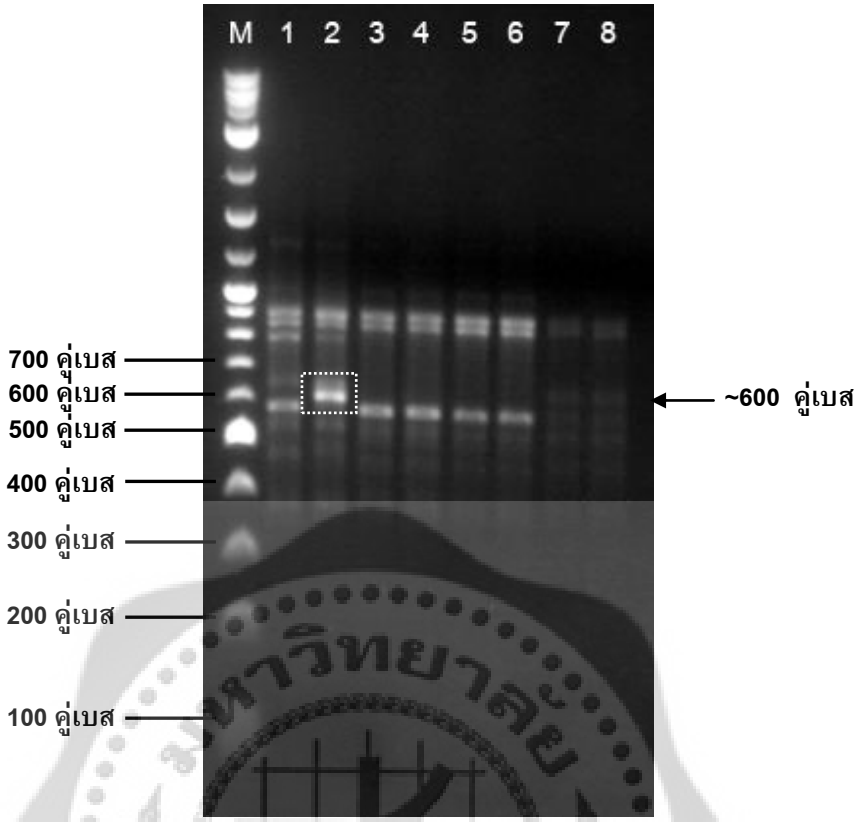
ตาราง 2 RAPD primer 5 ชนิดที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำ โดย ✓ หมายถึง การมีแถบ DNA ปรากฏ และ X หมายถึง การไม่มีแถบ DNA ปรากฏ

RAPD primer [ขนาดของแถบ DNA (คู่เบส)]	พืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ				พืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ			
	สละสุมาลี	สละเนินวง	สละหม้อ		สละไร้หนาม		ระกำ	
	(เพศเมีย)	(เพศเมีย)	(เพศผู้)	(เพศเมีย)	(เพศผู้)	(เพศเมีย)	(เพศผู้)	(เพศเมีย)
NAPS062 [~750]	✓	✓	✓	✓	X	X	X	X
NAPS062 [~950]	✓	✓	X	X	X	X	X	X
NAPS062 [~1100]	X	✓	X	X	X	X	X	X
NAPS759 [~600]	X	✓	X	X	X	X	X	X
NAPS760 [~380]	X	✓	X	X	X	X	X	X
NAPS764 [~380]	✓	✓	X	X	X	X	X	X
NAPS766 [~800]	✓	✓	X	X	X	X	X	X



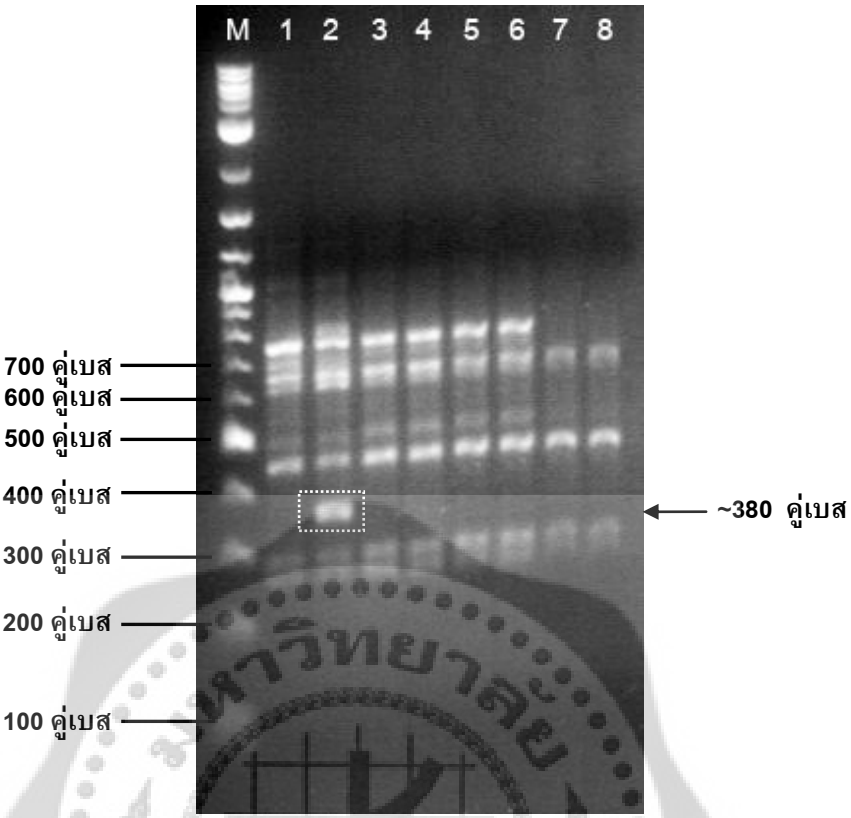
ภาพประกอบ 10 RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS062

Lane M: 2-Log DNA marker, lane 1: สละสุมาลี, lane 2: สละเนินวง, lane 3: สละไร้หนามเพศผู้, lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย, lane 5: ระกำเพศผู้, lane 6: ระกำเพศเมีย, lane 7: สละหม้อเพศผู้, lane 8: สละหม้อเพศเมีย



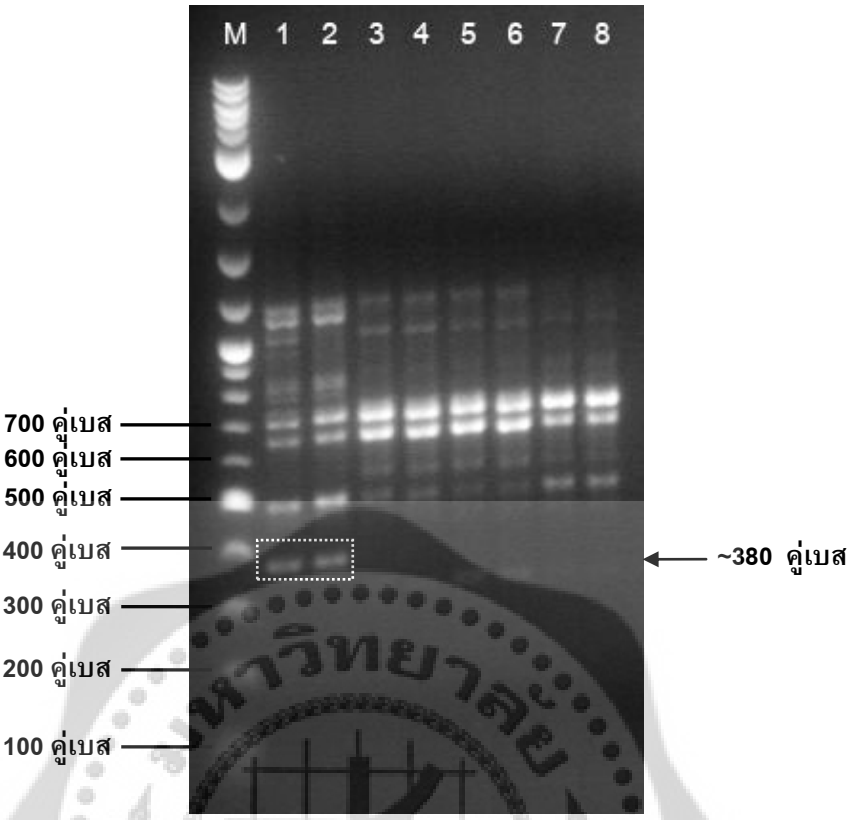
ภาพประกอบ 11 RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS759

Lane M: 2-Log DNA marker, lane 1: สละสุมาลี, lane 2: สละเนินวง, lane 3: สละไร้หนามเพศผู้, lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย, lane 5: ระกำเพศผู้, lane 6: ระกำเพศเมีย, lane 7: สละหม้อเพศผู้, lane 8: สละหม้อเพศเมีย



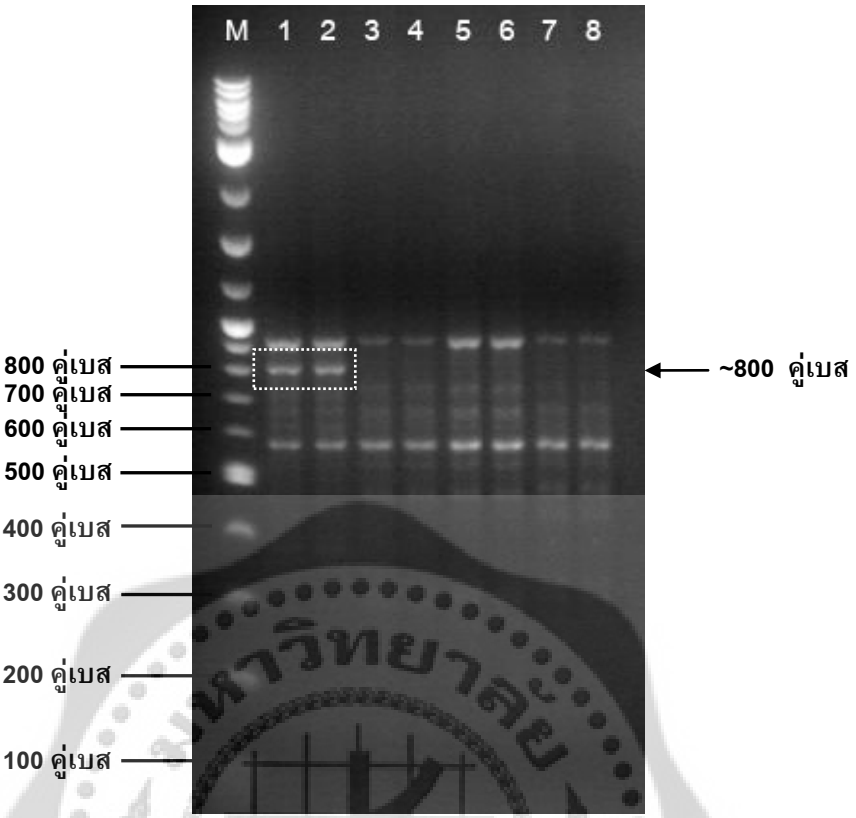
ภาพประกอบ 12 RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS760

Lane M: 2-Log DNA marker, lane 1: สละสุมาลี, lane 2: สละเนินวง, lane 3: สละไร้หนามเพศผู้, lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย, lane 5: ระกำเพศผู้, lane 6: ระกำเพศเมีย, lane 7: สละหม้อเพศผู้, lane 8: สละหม้อเพศเมีย



ภาพประกอบ 13 RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS764

Lane M: 2-Log DNA marker, lane 1: สละสุมาลี, lane 2: สละเนินวง, lane 3: สละไร้หนามเพศผู้, lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย, lane 5: ระกำเพศผู้, lane 6: ระกำเพศเมีย, lane 7: สละหม้อเพศผู้, lane 8: สละหม้อเพศเมีย



ภาพประกอบ 14 RAPD profile ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ โดยใช้ primer NAPS766

Lane M: 2-Log DNA marker, lane 1: สละสุมาลี, lane 2: สละเนินวง, lane 3: สละไร้หนามเพศผู้, lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย, lane 5: ระกำเพศผู้, lane 6: ระกำเพศเมีย, lane 7: สละหม้อเพศผู้, lane 8: สละหม้อเพศเมีย

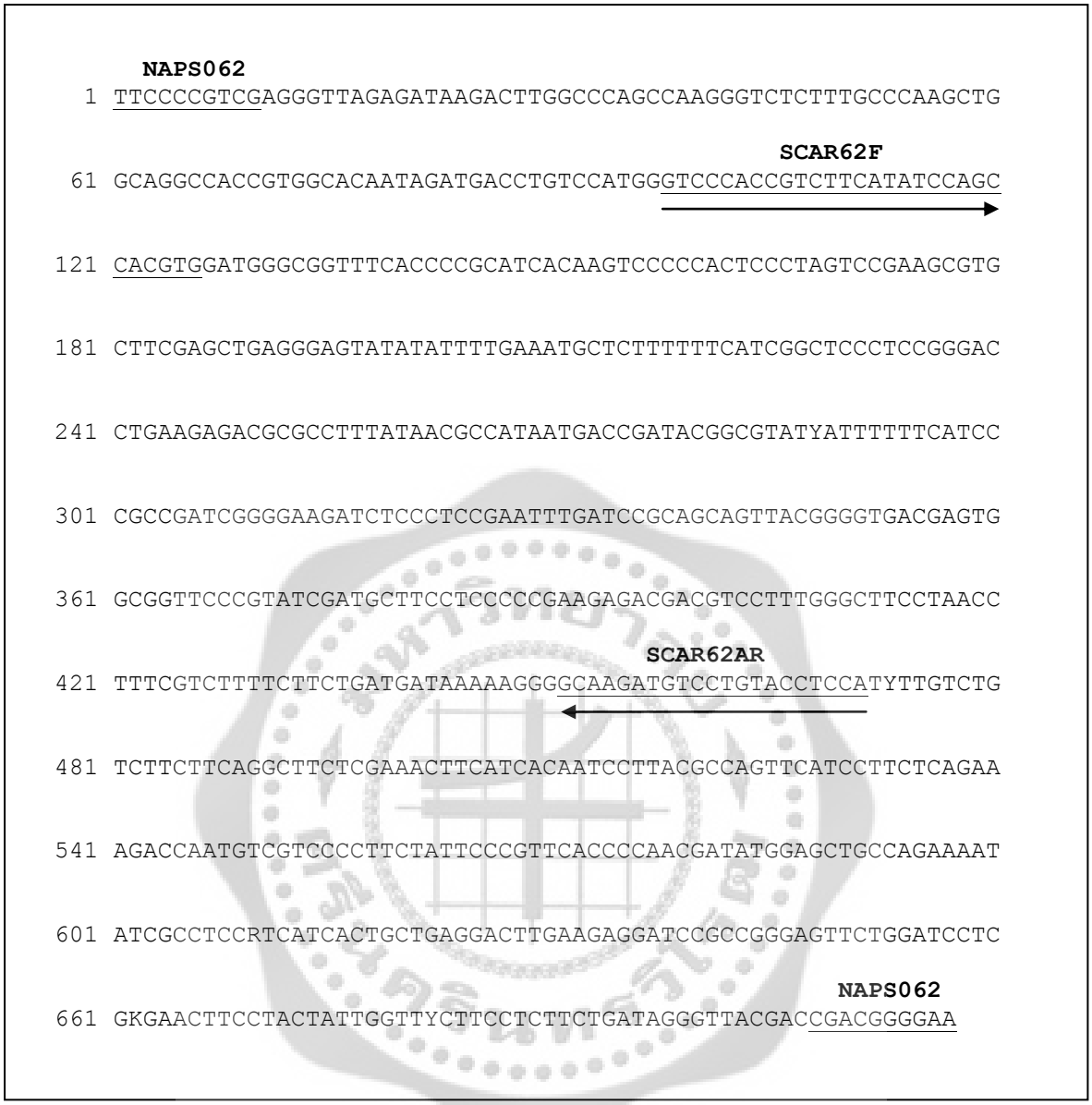
จากตาราง 2 และภาพประกอบ 10-14 แสดงว่า RAPD primer ทั้ง 5 ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง primer NAPS062 สามารถใช้จำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ (สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ) ออกจากพืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ (สละไร้หนาม และระกำ) ได้ (ขนาดของแถบ DNA ~750 คู่เบส) นอกจากนี้ primer NAPS062 รวมทั้ง primer NAPS764 และ primer NAPS766 ยังสามารถแยกสละสุมาลี และสละเนินวงออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้ (ขนาดของแถบ DNA ~950, ~380 และ ~800 คู่เบส ตามลำดับ) RAPD primer 3 ชนิด ได้แก่ NAPS062, NAPS759 และ NAPS760 สามารถใช้ระบุพันธุ์สละเนินวงได้ (ขนาดของแถบ DNA ~1100, ~600 และ ~380 คู่เบส ตามลำดับ)

อย่างไรก็ดีในการยืนยันผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD กับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละต้น โดยใช้ primer 5 ชนิด ที่ให้ผลบวกกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

พบว่ามีเพียง primer NAPS062 เท่านั้นที่ให้ผลบวกกับ DNA ของพืชสกุลระกำพันธ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องแต่ละตัวอย่างถึง 80% ในขณะที่ primer ชนิดอื่นๆ ให้ผลบวกกับ DNA ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องแต่ละตัวอย่างเพียง 50-60%

การ clone และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

จากการตรวจสอบรูปแบบ DNA ของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า primer NAPS062 ให้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส ซึ่งสามารถใช้จำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อได้ นอกจากนี้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า มีเพียง primer NAPS062 เท่านั้นที่ให้ผลบวกกับ DNA ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องแต่ละตัวอย่างถึง 80% ดังนั้นจึงได้ทำการ clone ชิ้น DNA ที่เป็น PCR product ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละพันธุ์ แล้วสกัด plasmid และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พร้อมทั้งตัดส่วนของ universal primer (SP6 promoter primer และ T7 promoter primer) ออก ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert ที่ต้องการ (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 Consensus sequence ของสละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ ที่ได้จาก primer NAPS062 (PCR product ~750 คู่เบส) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แน่ชัดใช้รหัสแทน ดังนี้ R = A/G, Y = C/T และ K = G/T และบริเวณที่มีลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของ SCAR primer

การออกแบบ SCAR primer และการตรวจสอบโดย PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ ทำให้สามารถออกแบบ SCAR primer ได้ 1 คู่ (forward primer และ reverse primer)

Forward primer: SCAR62F 5'- GTC CCA CCG TCT TCA TAT CCA GCC ACG TG -3'

Reverse primer: SCAR62AR 5'- TGG AGG TAC AGG ACA TCT TGC -3'

นำคู่ของ SCAR primer นี้มาใช้ในการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ในขั้นตอนการทำ PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ โดยใช้ total genomic DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างในขั้นตอนแรก และเริ่มต้นโดยการเตรียม PCR reaction ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 2 ng/μL DNA template, 1x PCR buffer, 0.15 mM dNTP แต่ละชนิด, 1.5 mM $MgCl_2$, 1x Q-solution, 1.32 μM forward primer, 1.32 μM reverse primer และ 0.04 U/μL *Taq* DNA polymerase นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycle (Eppendorf) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

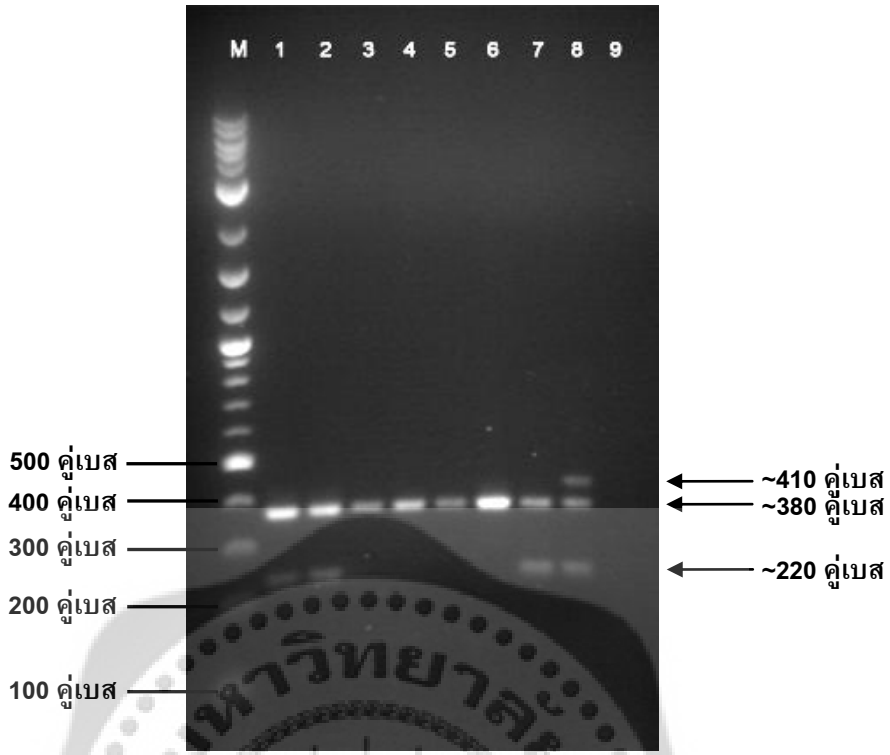
Initial heating	94°C	1.5	นาที	
Denaturation	94°C	1	นาที	30 รอบ
Annealing	55°C	1	นาที	
Extension	72°C	1.5	นาที	
Final extension	72°C	1	นาที	

การตรวจสอบรูปแบบของ DNA ได้ผลดังนี้ (ภาพประกอบ 16)

(1) พืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ จาก DNA จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละไร้หนามเพศผู้ สละไร้หนามเพศเมีย ระกำเพศผู้ ระกำเพศเมีย สละหม้อเพศผู้ และสละหม้อเพศเมีย มีการปรากฏของแถบ DNA ขนาดประมาณ 380 คู่เบส

(2) เฉพาะพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ 3 พันธุ์ จาก DNA จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อเพศผู้ และสละหม้อเพศเมีย มีการปรากฏของแถบ DNA ขนาดประมาณ 220 คู่เบส

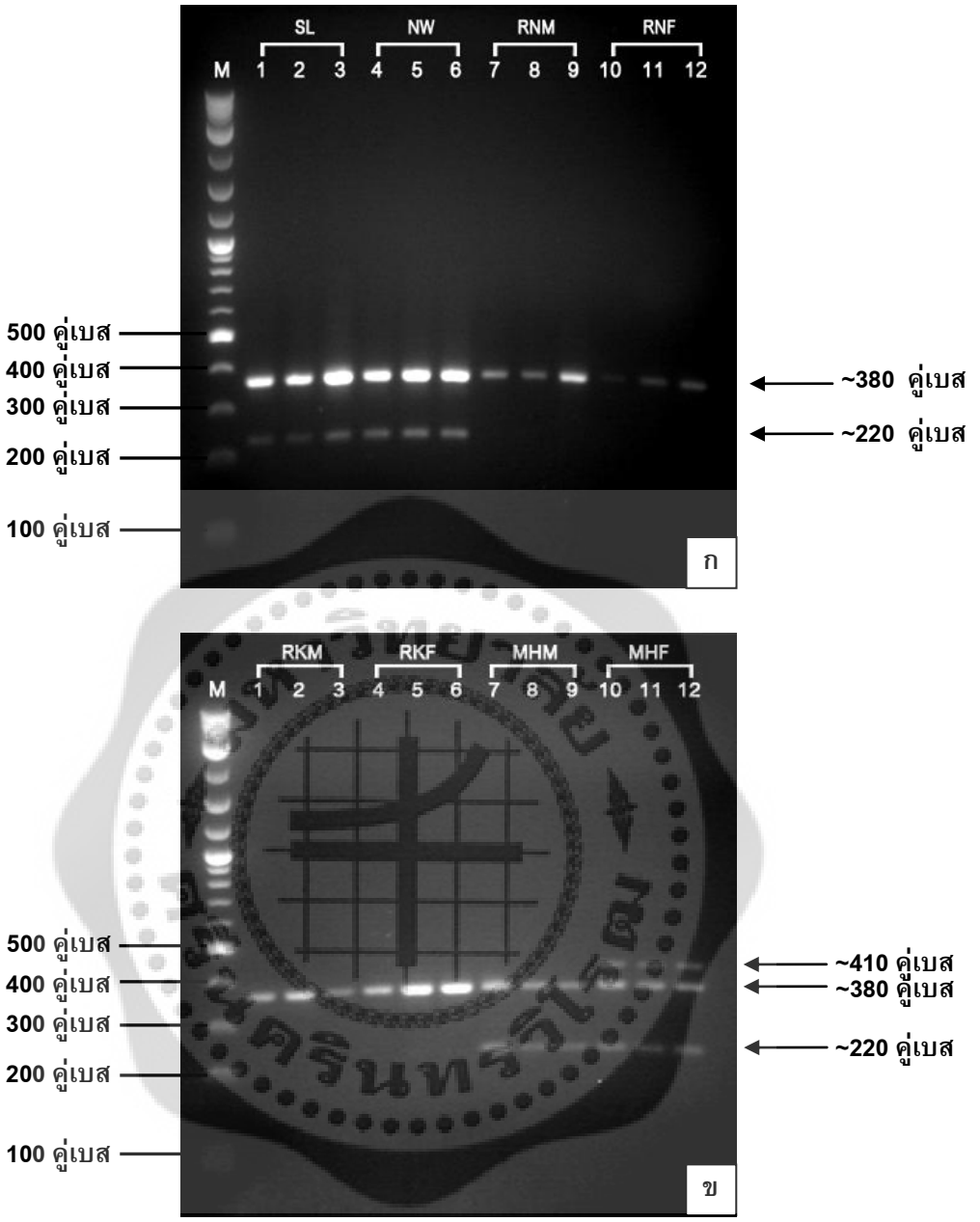
(3) เฉพาะสละหม้อเพศเมีย มีการปรากฏของแถบ DNA ขนาดประมาณ 410 คู่เบส



ภาพประกอบ 16 ผลของ PCR ที่ใช้คู่ของ SCAR primer เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ Lane M: 2-Log DNA marker, lane 1: สละสุมาลี, lane 2: สละเนินวง, lane 3: สละไร้หนามเพศผู้, lane 4: สละไร้หนามเพศเมีย, lane 5: ระกำเพศผู้, lane 6: ระกำเพศเมีย, lane 7: สละหม้อเพศผู้, lane 8: สละหม้อเพศเมีย และ lane 9: negative control

การประยุกต์ใช้ SCAR marker

จากการขยายผลการวิจัย โดยการนำคู่ของ SCAR primer คือ primer SCAR62F และ SCAR62AR ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปทดสอบโดยเทคนิค PCR กับตัวอย่างพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ที่เก็บเพิ่มเติมจากจังหวัดจันทบุรี โดยแบ่งเป็นสละสุมาลีและสละเนินวงพันธุ์ละ 10 ต้น (เพศเมียทั้งหมด) สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อพันธุ์ละ 20 ต้น (เพศผู้พันธุ์ละ 10 ต้น และเพศเมียพันธุ์ละ 10 ต้น) พบว่าผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้ตรงกับผลการศึกษาในข้างต้นทุกประการ (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 ผลของ PCR ที่ใช้คู่ของ SCAR primer กับตัวอย่างพืชสกุลระกำที่เก็บเพิ่มเติมทั้ง 5 พันธุ์ โดยแบ่งเป็นสละสุมาลี และสละเนินวงพันธุ์ละ 10 ต้น (เพศเมียทั้งหมด) สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อพันธุ์ละ 20 ต้น (เพศผู้พันธุ์ละ 10 ต้น และเพศเมียพันธุ์ละ 10 ต้น) โดยจากภาพแสดงเพียงอย่างละ 3 ต้น

ก. Lane M: 2-Log DNA marker, lanes 1-3 SL: สละสุมาลี, lanes 4-6 NW: สละเนินวง, lanes 7-9 RNM: สละไร้หนามเพศผู้, lanes 10-12 RNF: สละไร้หนามเพศเมีย

ข. Lane M: 2-Log DNA marker, lanes 1-3 RKM: ระกำเพศผู้, lanes 4-6 RKF: ระกำเพศเมีย, lanes 7-9 MHM: สละหม้อเพศผู้, lanes 10-12 MHF: สละหม้อเพศเมีย

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบรูปแบบของ DNA ของพืชสกุลระกำ 5 พันธุ์ จากจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อ สละไร้หนาม และระกำ ด้วยเทคนิค RAPD พบ primer ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ primer NAPS062, NAPS759, NAPS760, NAPS764 และ NAPS766 ในจำนวนนี้พบ primer เพียง 1 ชนิด คือ primer NAPS062 ที่แสดงรูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างระหว่างพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ (สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ) และพืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ (สละไร้หนาม และระกำ) โดยให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 750 คู่เบส เฉพาะในพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจเท่านั้น สละสุมาลีและสละเนินวงสามารถจำแนกออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้โดยใช้ primer NAPS062, NAPS764 และ NAPS766 (ขนาดของแถบ DNA ~950, ~380 และ ~800 คู่เบส ตามลำดับ) นอกจากนี้ผลการวิจัยยังพบว่า primer 3 ชนิด ได้แก่ NAPS062, NAPS759 และ NAPS760 สามารถใช้ระบุสละเนินวงได้ อย่างไรก็ดีในการยืนยันผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD กับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละต้น พบว่า primer 5 ชนิด ให้ผลบวกกับ DNA ของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องแต่ละตัวอย่างในช่วง 50-80% โดย primer NAPS062 ให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือสูงสุด

จากผลการตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA ในการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจด้วยเทคนิค RAPD เมื่อพิจารณารูปแบบของแถบ DNA ที่ปรากฏกับความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมของพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์นั้น พบว่ารูปแบบของแถบ DNA ที่ได้สามารถจำแนกพืชสกุลระกำออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1: สละสุมาลีและสละเนินวง และกลุ่มที่ 2: สละไร้หนาม ระกำ และสละหม้อ โดยในกลุ่มที่ 2 พบว่าสละไร้หนามและระกำมีความใกล้ชิดกันมากกว่าสละหม้อ ซึ่งผลของรูปแบบ DNA ที่ปรากฏดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพืชสกุลระกำจำนวน 12 taxa จากประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย โดยใช้บริเวณ internal transcribed spacer ของ nuclear ribosomal DNA (Rangsiruji; et al. 2006)

จากการ clone และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่จำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ (แถบ DNA ขนาดประมาณ 750 คู่เบส) ทำให้สามารถออกแบบ SCAR primer ได้ 1 คู่ (SCAR62F และ SCAR62AR) ซึ่งควรให้ผล PCR product ขนาดประมาณ 380 คู่เบส เพียง 1 แถบที่จำเพาะกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ 3 พันธุ์ จาก DNA จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อเพศผู้ และสละหม้อเพศเมียเท่านั้น แต่ผลจากการวิจัยนี้พบว่า PCR product ขนาดประมาณ 380 คู่เบส นี้ปรากฏในพืชสกุลระกำทั้งที่เป็นพันธุ์เศรษฐกิจ และที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 5 พันธุ์ ดังนั้นแถบ DNA ดังกล่าวนี้จึงไม่สามารถใช้จำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้

จากผลการตรวจสอบรูปแบบของ DNA โดย PCR ที่ใช้คู่ของ SCAR primer เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ พบ PCR product ขนาดประมาณ 380 คู่เบส ในพืชสกุลระกำทุกพันธุ์ (พันธุ์เศรษฐกิจและที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจ) ทั้งที่ในความเป็นจริงควรจะปรากฏแถบ DNA ดังกล่าวเฉพาะในพืชสกุลระกำที่เป็นพันธุ์เศรษฐกิจเท่านั้น สาเหตุที่ได้ผลเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนของการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD กับตัวอย่างพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละต้น โดยใช้ primer 5 ชนิด ที่ให้ผลบวกกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ พบว่ามีเพียง primer NAPS062 เท่านั้นที่ให้ผลบวกกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องแต่ละตัวอย่างถึง 80% ดังนั้นจึงได้นำเฉพาะพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้อง (สละสุมาลี สละเนินวง สละหม้อเพศผู้ และสละหม้อเพศเมีย) เท่านั้นมาตรวจสอบ แต่ไม่ได้ทำการตรวจสอบกับพืชสกุลระกำพันธุ์อื่นๆ (สละไร้หนาม และระกำ) จึงไม่ทราบผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่จะปรากฏในแต่ละต้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าถ้านำ primer NAPS062 นี้มาตรวจสอบกับพืชสกุลระกำพันธุ์อื่นๆ แต่ละต้น อาจให้ผลบวกกับ DNA ของตัวอย่างพืชสกุลระกำที่ไม่ใช่พันธุ์เศรษฐกิจในบางต้นของแต่ละตัวอย่าง ทั้งนี้เกิดจากความผิดพลาดของผู้วิจัยที่ไม่ได้ทำการทดสอบในกรณีดังกล่าวนี้ และเมื่อใช้คู่ของ SCAR primer ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RAPD marker ในการตรวจสอบรูปแบบของ DNA เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ จึงปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 380 คู่เบส ในพืชสกุลระกำทุกพันธุ์ดังที่ปรากฏในผลการทดลอง

อย่างไรก็ดีการวิจัยนี้ยังให้ผลที่น่าสนใจเป็น repetitive SCAR ซึ่งเกิดจากการที่คู่ของ SCAR primer เข้าจับในบริเวณอื่นของจีโนม ซึ่งไม่ใช่บริเวณที่มีการออกแบบ SCAR primer ตั้งแต่เริ่มแรก แต่ผลของ repetitive SCAR ซึ่งให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 220 คู่เบส นั้นมีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ ดังนั้นแถบ DNA ดังกล่าวนี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้

นอกจากนี้ยังได้ผล repetitive SCAR อีก 1 ตำแหน่ง ซึ่งให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 410 คู่เบส ที่มีความจำเพาะต่อสละหม้อเพศเมียเท่านั้น จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกสละหม้อเพศเมียออกจากสละหม้อเพศผู้ และในเชิงมูลค่าทางเศรษฐกิจ เครื่องหมายโมเลกุลนี้ยังสามารถใช้จำแนกสละหม้อเพศเมียออกจากพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจเพศเมียอื่นๆ ได้แก่ สละสุมาลีที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงสุด และสละเนินวงที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำสุดได้

จากการประยุกต์ใช้ SCAR marker กับพืชสกุลระกำทั้ง 5 พันธุ์ ที่เก็บเพิ่มเติมจากจังหวัดจันทบุรีจำนวน 80 ตัวอย่าง พบว่าได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำกับตัวอย่างทั้งหมด จึงสามารถยืนยันได้ว่า SCAR marker ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้มีความจำเพาะสูงถึง 100%

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจและระบุเพศของสละหม้อได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการยืนยันต้นกล้าของพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากเรือนเพาะชำที่จำหน่ายต้นพันธุ์ได้

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบปัญหาภายหลังจากการออกแบบ SCAR primer 1 คู่ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ที่จำเพาะกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ และนำคู่ของ SCAR primer นี้มาเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR เพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นๆ โดยผลการทดลองพบว่ามีแถบ DNA เกิดขึ้นหลายแถบ ซึ่งในความเป็นจริงในหลักการของเทคนิค SCAR นั้น จะต้องปรากฏแถบ DNA ที่จำเพาะเพียงแถบเดียวเท่านั้น แต่ผลการทดลองนี้ไม่เป็นไปตามหลักการของ SCAR ดังกล่าว ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น โดยให้ได้แถบ DNA ที่มีความจำเพาะกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจเพียงแถบเดียวเท่านั้น อาจใช้แนวทางในการแก้ไขปัญหา ดังต่อไปนี้

1. ออกแบบ SCAR primer ใหม่ เพื่อให้มีความจำเพาะกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจมากขึ้น โดยจะทำให้ SCAR primer ดังกล่าวเข้าจับกับ DNA ในตำแน่งหรือบริเวณที่จำเพาะที่ต้องการเพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น

2. ใช้ PCR product จากการทำ RAPD มาเป็น template ในการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ในครั้งต่อไป ซึ่งจะทำให้ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะมากขึ้น และง่ายต่อการตรวจสอบขนาดของแถบ DNA ที่ปรากฏ

3. นำแถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 220 และ 410 คู่เบส ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบ DNA ทั้งสองดังกล่าวนั้น เป็นส่วนหนึ่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบ DNA ขนาดประมาณ 750 คู่เบส ที่ใช้เป็น RAPD marker ซึ่งมีความจำเพาะกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจหรือไม่

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

คณะกรรมการชมรมผู้ปลูกสะละจันทบุรี. (2544). *สาระของสะละ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: หจก. มิตรเกษตรการตลาดและโฆษณาฯ. หน้า 9-32.

ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. (2538). *พืชในสกุล "ระกำ"*. บทความวิทยุรายการสาระความรู้ทางการเกษตร สถานีวิทยุมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ FM 88 MHz ประจำวันจันทร์ที่ 6 มีนาคม 2538. สืบค้นเมื่อ 19 ธันวาคม 2553, จาก http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio37-38/3738 0023.htm

----------. (2542). *สละพืชเศรษฐกิจตัวใหม่ที่มีอนาคตไกล*. บทความวิทยุรายการสาระความรู้ทางการเกษตร สถานีวิทยุมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ FM 88 MHz ประจำวันจันทร์ที่ 6 กันยายน 2542. สืบค้นเมื่อ 19 ธันวาคม 2553, จาก http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio41-42/41-420048.htm

ธีระชัย ธนานันต์. (2542). การพัฒนาเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อการจำแนกและรับรองสายพันธุ์พริก. ใน *หนังสือรวมบทคัดย่อผลงานวิจัยของคณาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษาไทยในระหว่างปี 2540-2542*. หน้า 686. กรุงเทพฯ: สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย สำนักมาตรฐานอุดมศึกษาส่วนวิจัยและพัฒนา.

นฤมล ธนานันต์; และธีระชัย ธนานันต์. (2544). การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบสัมโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและขาวน้ำผึ้ง. *ใน เอกสารสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 12*. หน้า 172-175. กรุงเทพฯ: พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ; และสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.

นฤมล ธนานันต์; และมานะ ขาวเมฆ. (2549, กันยายน-ธันวาคม). การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. *วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์*. 1(3): 15-23.

นฤมล มานิพพาน. (2548). *การปลูกและขยายพันธุ์สละและระกำ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เพชรกะรัต. หน้า 1-51.

พัฒนา ศรีฟ้า; และคนอื่นๆ. (2538). การใช้ Random Amplified Polymorphic DNA Technique ในการจัดจำแนกสายพันธุ์หญ้าแฝกหอมในประเทศไทย. *ใน เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาพืช*. หน้า 164-173. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวพร จินตนาวงศ์; และสุจิตรา จางตระกูล. (2539). การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมะม่วงโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมี. ใน *เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ประจำปี 2539*. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล; และคนอื่นๆ. (2539). การศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ไอโซไซม์ในการจำแนกพืชสกุลระกำ. ใน *เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ประจำปี 2539*. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

ศูนย์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์. (2553). *ฐานความรู้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแหล่งท่องเที่ยวจังหวัดชุมพร : ระกำ*. สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2553, จาก http://chumphon.most.go.th/index.php?option=com_content&taskview&id=852&Itemid=38

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2553). *พันธุกรรมพืชกับการอนุรักษ์*. คอลัมน์เกษตรวิจัย. เดลินิวส์. สืบค้นเมื่อ 29 ธันวาคม 2553, จาก http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/july8/pl_gen.htm

สมจิตต์ ทินกระโทก; และคนอื่นๆ. (2542). *การจำแนกสายพันธุ์กล้วยน้ำว้าโดยเทคนิค RAPD*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. สืบค้นเมื่อ 10 มกราคม 2554, จาก http://www.doae.go.th/library/html/detail/banana/page126.htm

สวนสละอาทิตย์. (2552). *พืชในสกุล "ระกำ"*. สืบค้นเมื่อ 19 ธันวาคม 2553, จาก http://www.salaartit.com/index.php/2010-05-13-05-12-46/2009-11-16-14-32-12/89-qq

สิริรักษ์ บางสุด. (2549). *สละ รสฉ่ำหวาน*. ครัว. 13(146): 86.

สำนักงานเกษตรจังหวัดจันทบุรี. (2553). *สถิติการปลูกพืชเศรษฐกิจจังหวัดจันทบุรี : สถิติการปลูกสละ*. สืบค้นเมื่อ 25 ธันวาคม 2553, จาก http://www.chanthaburi.doae.go.th/data1/static_planting5.htm

สำนักงานเกษตรจังหวัดตราด. (2540). *ระกำ*. กรุงเทพฯ: ฝ่ายเอกสารคำแนะนำ กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร. 10 หน้า.

สำนักงานเกษตรอำเภอท่าใหม่. (2552). *สละพันธุ์สุมาลี*. สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2553, จาก http://thamai.chanthaburi.doae.go.th/sumalee.htm

สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2553). *การปลูกและดูแลรักษาสละ*. สืบค้นเมื่อ 21 ธันวาคม 2553, จาก http://www.rakbankerd.com/agriculture/open.php?id=506&s=tblplant

สุจิตรา จางตระกูล. (2538). การจำแนกพันธุ์และ clone ของหวายโดยใช้ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker. ใน *รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้แห่งชาติ ประจำปี 2538*. หน้า 177-185. กรุงเทพฯ: กรมป่าไม้.

สุพจน์ ตั้งจตุพร; และนพคุณ นองเมือง. (2546). *8 เซียนสวนสละ & ระกำหวาน : คู่มือการทำสวนสละและระกำหวานอย่างมืออาชีพ*. กรุงเทพฯ: นาคา อินเตอร์มีเดีย. หน้า 8-46.

สุภาพ สุนทรนนท์; และคนอื่นๆ. (2539). เทคนิคการใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกพันธุ์และ clone ทุเรียน. ใน *เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ประจำปี 2539*. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

อมรรัตน์ พรหมบุญ; และคนอื่นๆ. (2552). *การจำแนกสายพันธุ์หม่อนพื้นเมืองโดยใช้ RAPD markers*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สืบค้นเมื่อ 29 ธันวาคม 2553, จาก http://www.researchgate.net/publication/31869484__RAPD_markers

อัจฉริยา รังษิรุจิ; ฐปวิตรา ผ่องแผ้ว; และธวัช ดอนสกุล. (2549). คาริโอไทป์ของพืชสกุลระกำ (*Salacca*) บางชนิดในประเทศไทยและประเทศอินโดนีเซีย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว*. 22(2): 48-61.

Bautista, R.; et al. (2002). Identification of Olive-Tree Cultivars with SCAR Markers. *Euphytica*. 129: 33-41

Doyle, J.J.; & Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry Bulletin*. 19: 11-15.

Govaerts, R.; et al. (2006). World Checklist of Arecaceae. *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*. Retrieved November 26, 2010, from http://www.kew.org/wcsp

Hamada, K.; & Hagimori, M. (1996). RAPD-based Method for Cultivar-Identification of Calla Lily (*Zantedeschia* spp.). *Scientia Horticulturae*. 65: 215-218.

Javornik, B.; & Kump, B. (1993). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Buckwheat. *Fagopyrum*. 13: 35-39.

Kim, C.; et al. (2000). SCARs Markers Derived from RAPD for Cultivar Identification in *Pyrus pyrifolia*. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. 41(2): 125-128.

Lee, M.H.; et al. (2010). SCARs Markers Derived From RAPD for Cultivar Identification in *Perilla Frutescens*. *Crop Breeding & Genetics*. 188. Retrieved March 18, 2011, from http://a-c-s.confex.com/crops/2010am/webprogram/Paper60498.html

Li, L.; Liu, Y.X.; & Peng, J.Y. (2010). Identification and Analysis on Several New Peach Cultivars by RAPD Markers. *Journal of Agricultural University of Hebei*. Retrieved January 18, 2011, from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-CULT201001008.htm

Mariniello, L.; et al. (2002). Identification of *Prunus armeniaca* Cultivars by RAPD and SCAR Markers. *Biotechnology Letters*. 24(10): 749-755.

Messina, R.; Testolin, R.; & Morgante, M. (1991). Isozymes for Cultivar Identification in Kiwifruit. *Hortscience*. 26: 899-902

Micales, J.A.; & Bonde, M.R. (1995). Isozymes: Methods and Applications. In: Singh, R.P. and Singh, U.S. (eds.). *Molecular methods in plant pathology*. CRC Press, Inc., Lewis Publishers, London, pp. 115-130.

Mienie, C.M.S.; Smit, M.A.; & Pretorius, P.J. (1995). Use of Amplified Polymorphic DNA for Identification of South African Soybean Cultivars. *Field Crops Research*. 43: 43-49.

Primer. (1990). Primer Design Ver. 2.0. Copy Right 1990-1991. *Scientific & Educational Software.*

Rangsiruji, A.; Pongpawe, T.; & Donsakul, T. (2006). Molecular Phylogenetic Relationships of Some *Salacca* in Thailand, Malaysia and Indonesia. *Proceedings of the 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*. Bangkok, Thailand. p. 98

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; & Maniatis. T. (1989). Molecular Cloning, 2nd edition, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Prees.

Satrabhandhu, A.; et al. (1996). Identification of Lime Cultivars and Hybrid by Isozyme Patterns. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 30(2): 249-253.

Wang, Z.G.; et al. (2007). Identification of Strawberry Cultivars by RAPD and SCAR Markers. *Acta Horticulturae Sinica.* Retrieved March 18, 2011, from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YYXB200703011.htm

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตาราง ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer

Name	Sequence 5’ to 3’
NAPS061	TTC CCC GAC C
NAPS062	TTC CCC GTC G
NAPS063	TTC CCC GCC C
NAPS064	GAG GGC GGG A
NAPS065	AGG GGC GGG A
NAPS066	GAG GGC GTG A
NAPS067	GAG GGC GAG C
NAPS068	GAG CTC GCG A
NAPS069	GAG GGC AAG A
NAPS070	GGG CAC GCG A
NAPS071	GAG GGC GAG G
NAPS072	GAG CAC GGG A
NAPS073	GGG CAC GCG A
NAPS074	GAG CAC CTG A
NAPS075	GAG GTC CAG A
NAPS076	GAG CAC CAG T
NAPS077	GAG CAC CAG G
NAPS078	GAG CAC TAG C
NAPS079	GAG CTC GTG T
NAPS080	GTG CTC TAG A
NAPS081	GAG CAC GGG G
NAPS082	GGG CCC GAG G
NAPS083	GGG CTC GTG G
NAPS084	GGG CGC GAG T
NAPS085	GTG CTC GTG C
NAPS086	GGG GGG AAG G
NAPS087	GGG GGG AAG C
NAPS088	CGG GGG ATG G

ตาราง (ต่อ)

Name	Sequence 5’ to 3’
NAPS089	GGG GGC TTG G
NAPS090	GGG GGT TAG G
NAPS101	GCG GCT GGA G
NAPS102	GGT GGG GAC T
NAPS103	GTG ACG CCG C
NAPS104	GGG CAA TGA T
NAPS105	CTC GGG TGG G
NAPS106	CGT CTG CCC G
NAPS107	CTG TCC CTT T
NAPS108	GTA TTG CCC T
NAPS109	TGT ACG TGA C
NAPS110	TAG CCC GCT T
NAPS111	AGT AGA CGG G
NAPS112	GCT TGT GAA C
NAPS113	ATC CCA AGA G
NAPS114	TGA CCG AGA C
NAPS115	TTC CGC GGG C
NAPS116	TAC GAT GAC G
NAPS117	TTA GCG GTC T
NAPS118	CCC GTT TTG T
NAPS119	ATT GGG CGA T
NAPS120	GAA TTT CCC C
NAPS121	ATA CAG GGA G
NAPS122	GTA GAC GAG C
NAPS123	GTC TTT CAG G
NAPS124	ACT CGA AGT C
NAPS125	GCG GTT GAG G
NAPS126	CTT TCG TGC T
NAPS127	ATC TGG CAG C
NAPS128	GCA TAT TCC G

ตาราง (ต่อ)

Name	Sequence 5’ to 3’
NAPS129	GCG GTA TAG T
NAPS130	GGT TAT CCT C
NAPS131	GAA ACA GCG T
NAPS132	AGG GAT CTC C
NAPS133	GGA AAC CTC T
NAPS134	AAC ACA CGA G
NAPS135	AAG CTG CGA G
NAPS136	TAC GTC TTG C
NAPS137	GGT CTC TCC C
NAPS138	GCT TCC CCT T
NAPS139	CCC AAT CTT C
NAPS140	GTC GCA TTT C
NAPS141	ATC CTG TTC G
NAPS142	ATC TGT TCG G
NAPS143	TCG CAG AAC G
NAPS144	AGA GGG TTC T
NAPS145	TGT CGG TTG C
NAPS146	ATG TGT TGC G
NAPS147	GTG CGT CCT C
NAPS148	TGT CCA CCA G
NAPS149	AGC AGC GTG G
NAPS150	GAA GGC TCT G
NAPS151	GCT GTA GTG T
NAPS152	CGC ACC GCA C
NAPS153	GAG TCA CGA G
NAPS154	TCC ATG CCG T
NAPS155	CTG GCG GCT G
NAPS156	GCC TGG TTG C
NAPS157	CGT GGG CAG G
NAPS158	TAG CCG TGG C

ตาราง (ต่อ)

Name	Sequence 5’ to 3’
NAPS159	GAG CCC GTA G
NAPS160	CGA TTC AGA G
NAPS161	CGT TAT CTC G
NAPS162	AAC TTA CCG C
NAPS163	CCC CCC AGA T
NAPS164	CCA AGA TGC T
NAPS165	GAA GGC ACT G
NAPS166	ACT GCT ACA G
NAPS167	CCA ATT CAC G
NAPS168	CTA GAT GTG C
NAPS169	ACG ACG TAG G
NAPS170	ATC TCT CCT G
NAPS701	CCC ACA ACC C
NAPS702	GGG AGA AGG G
NAPS703	CCA ACC ACC C
NAPS704	GGA AGG AGG G
NAPS705	GGA GGA AGG G
NAPS706	GGT GGT TGG G
NAPS707	CCC AAC ACC C
NAPS708	GGG TTG TGG G
NAPS709	CCT CCT CCC T
NAPS710	GGT GGT GGG T
NAPS711	CCC TCT CCC T
NAPS712	GGG TGT GGG T
NAPS713	CCC TCC CTC T
NAPS714	GGG TGG GTG T
NAPS715	CCA CCA CCC A
NAPS716	GGA GGA GGG A
NAPS717	CCC ACA CCC A
NAPS718	GGG AGA GGG A

ตาราง (ต่อ)

Name	Sequence 5’ to 3’
NAPS719	CCC ACC CAC A
NAPS720	GGG AGG GAG A
NAPS721	CCC TTC CCT C
NAPS722	CCT CTC CCT C
NAPS723	CCC TCT CCT C
NAPS724	CTC CCT CCT C
NAPS725	GGG TTG GGT G
NAPS726	GGT GTG GGT G
NAPS727	GGG TGT GGT G
NAPS728	GTG GGT GGT G
NAPS729	CCC AAC CCA C
NAPS730	CCA CAC CCA C
NAPS731	CCC ACA CCA C
NAPS732	CAC CCA CCA C
NAPS733	GGG AAG GGA G
NAPS734	GGA GAG GGA G
NAPS735	GGG AGA GGA G
NAPS736	GAG GGA GGA G
NAPS737	GGT GGG TGT G
NAPS738	GGT GGG TGG T
NAPS739	GGA GGG AGA G
NAPS740	GGA GGG AGG A
NAPS741	CCT CCC TCT C
NAPS742	CCT CCC TCC T
NAPS743	CCA CCC ACA C
NAPS744	CCA CCC ACC A
NAPS745	GGG AAG AGG G
NAPS746	GGG TGT TGG G
NAPS747	CCA CCA ACC C
NAPS748	CCC TTC TCC C

ตาราง (ต่อ)

Name	Sequence 5’ to 3’
NAPS749	GGG AGG AGA G
NAPS750	GGG TGG TGT G
NAPS751	CCC ACC ACA C
NAPS752	CCC TCC TCT C
NAPS753	GGG AGG AGG A
NAPS754	GGG TGG TGG T
NAPS755	CCC ACC ACC A
NAPS756	CCC TCC TCC T
NAPS757	GGA AGG GAG G
NAPS758	GGT TGG GTG G
NAPS759	CCA ACC CAC C
NAPS760	CCT TCC CTC C
NAPS761	GAG AGG AGG G
NAPS762	GTG TGG TGG G
NAPS763	CAC ACC ACC C
NAPS764	CTC TCC TCC C
NAPS765	AGG GAG GAG G
NAPS766	TGG GTG GTG G
NAPS767	ACC CAC CAC C
NAPS768	TCC CTC CTC C
NAPS769	GGG TGG TGG G
NAPS770	GGG AGG AGG G
NAPS771	CCC TCC TCC C
NAPS772	CCC ACC ACC C
NAPS773	GGG TGG TTG G
NAPS774	GGT GTG TGG T
NAPS775	GGT TTG GTG G
NAPS776	CTT CCC TCC T
NAPS777	GGA GAG GAG A
NAPS778	CCA CAC CAC A

ตาราง (ต่อ)

Name	Sequence 5’ to 3’
NAPS779	CCT TTC TCC C
NAPS780	CCT CTT CCT C
NAPS781	GGG AGG AGG G
NAPS782	GGG AGG AGA G
NAPS783	GGT GGG TTG T
NAPS784	GTG GGT GTT G
NAPS785	CAC CCA ACC A
NAPS786	TCC CTT CCT C
NAPS787	CCC TTC TTC C
NAPS788	CCT TCC CTC T
NAPS789	GGA AGG GAG A
NAPS790	GGG TGT GGT T
NAPS791	GTG GGT TGT G
NAPS792	CAA CCC ACA C
NAPS793	CTC CTC TCT C
NAPS794	GAG GGG AAA G
NAPS795	TGG TGT GGG T
NAPS796	AGA GGG AGG A
NAPS797	CCA CCA ACA C
NAPS798	GAG AGG AAG G
NAPS799	TGT GGT GGT G
NAPS800	TCT CCC TCC T

ตาราง การยืนยันผลของรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD กับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละต้น จำนวนพันธุ์ละ 5 ต้น โดยใช้ primer 5 ชนิด คือ NAPS062, NAPS759, NAPS760, NAPS764 และ NAPS766 ที่ให้ผลบวกกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ โดย ✓ แสดงผลบวก และ X แสดงผลลบ ของ primer ต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจแต่ละต้น

RAPD primer	สละสุมาลี (ต้นที่)					สละเนินวง (ต้นที่)					สละหม้อเพศผู้ (ต้นที่)					สละหม้อเพศเมีย (ต้นที่)					ค่าเฉลี่ยการให้ผลบวกของ primer (%)
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
NAPS062	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	80
NAPS759	✓	X	✓	X	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	X	✓	X	X	✓	✓	55
NAPS760	X	✓	X	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	X	X	X	✓	✓	X	✓	✓	X	X	50
NAPS764	X	✓	✓	X	✓	✓	✓	X	X	✓	X	✓	✓	X	✓	✓	X	✓	✓	X	60
NAPS766	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	X	✓	X	X	✓	✓	X	X	✓	X	X	✓	✓	55

หมายเหตุ: ทำการตรวจสอบยืนยันผลเฉพาะกับพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องเท่านั้น ส่วนพืชสกุลระกำพันธุ์อื่นๆ ไม่ได้นำมาตรวจสอบยืนยันผล

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาววลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์

วัน เดือน ปีเกิด 8 พฤศจิกายน 2525

สถานที่เกิด อำเภอพยุหะคีรี จังหวัดนครสวรรค์

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 527/1 หมู่ 4 ตำบลนิคมเขาบ่อแก้ว อำเภอพยุหะคีรี จังหวัดนครสวรรค์ 60130

ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน ครู รับเงินเดือนอันดับ ค.ศ.1

สถานที่ทำงานปัจจุบัน โรงเรียนวัดเลา (คณะศิษย์เทพสิทธิอุทิศ) สำนักงานเขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร

E-mail address : w_anaruk@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนสตรีนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์
พ.ศ. 2548	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2549	ประกาศนียบัตรบัณฑิตวิชาชีพครู จาก มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์
พ.ศ. 2554	การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ