BRT 542012

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไย (*Dimocarpus longan Lour.*) ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เจนจิรา มาหา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มีนาคม 2545

P58

- 2 ส.ค. 2545

โครงการวิจัยเพื่อสนับสนุนการจัดทำนโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์วิจัยวิทยาการและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.) ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เจนจิรา มาหา

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มีนาคม 2545

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.) ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เจนจิรา มาหา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย

..... กรรมการ
นายบุญแถม ถาคำฟู

..... กรรมการ
ดร. นาตยา ดำอำไพ

18 มีนาคม 2545

© ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือและชี้แนวทางต่างๆ ตลอดระยะเวลาการวิจัยจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ นายบุญแถม ถาคำฟู และ ดร.นาตยา ดำอำไพ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัยอย่างดียิ่ง ตลอดจนให้ความเอาใจใส่ในการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จสมบูรณ์

กราบขอบคุณ โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงรายและสถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพันธุ์ลำไย และอาจารย์ผู้ควบคุมห้องปฏิบัติการอณูชีวโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยครุภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งหากปราศจากสิ่งเหล่านี้จะไม่สามารถดำเนินการทดลองได้

ขอบคุณ คุณสุปราณี สิทธิพรหม, คุณรัฐพร จันทร์เดช, คุณจรัสศรี แก่นเมือง, คุณสุภัค มหันธนภัค, คุณจุฬาภรณ์ ณ เชียงใหม่, คุณวีระชัย ตรีอรุณศิริ, คุณต่อนภา ผุสดี, คุณสุกัญญา พิทักษ์รัตนานุกูล และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำงานเสมอ

ขอบคุณ คุณสุกัญญา ดวงสินธุ์ ในทุกสิ่งทุกอย่างที่รบกวนเพื่อนคนนี้เสมอ ทั้งในเวลาที่ทุกข์ใจท้อแท้และประสบปัญหา เพื่อนช่วยอย่างเต็มใจ และเต็มกำลังความสามารถเสมอ และขอบใจ คุณธิดารัตน์ ดวงสินธุ์ น้องสาวที่น่ารักอีกคนหนึ่ง

กราบขอบพระคุณ คุณน้าทุกๆ ท่านอย่างสูงที่ให้การสนับสนุนปัจจัยการเรียนทุกอย่าง

ที่สำคัญเหนือสิ่งอื่นใด กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ทุกสิ่งทุกอย่างที่สามารถให้แก่ลูกคนนี้ได้ ให้กำเนิด ความรัก ความเมตตา ความอบอุ่น และการสนับสนุนทางด้านการศึกษา ตลอดจนกำลังใจ แนะนำตักเตือนสั่งสอนตลอดมา

เจนจิรา มาหา

BRT 542012

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.) ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ชื่อผู้เขียน นางสาวเจนจิรา มาหา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.สมบูรณ์	อนันตลาโภชัย	ประธานกรรมการ
นายบุญแถม	ถาคำฟู	กรรมการ
ดร. นาตยา	ดำอำไพ	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 ตอน โดย การทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP ในเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน ได้แก่ ใบ เนื้อ เปลือกผล และเมล็ด และระหว่างลำไย 9 พันธุ์ ในการทดลองที่ 1 สำหรับเทคนิค HAT-RAPD เลือกใช้ 3 ไพรเมอร์ คือ OPAT05 OPG13 และ OPH13 ส่วนเทคนิค AFLP เลือกใช้ 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ E+AAG/M+CTA E+ACT/M+CAG E+AGG/M+CTA และ E+AGG/M+CTT พบว่า เทคนิค HAT-RAPD มีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน แต่เทคนิค AFLP มีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน สำหรับการทดลองที่ 2 เทคนิค HAT-RAPD เลือกใช้ 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPAK10 OPAK14 OPAS10 OPD20 OPG13 และ OPH13 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 123 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงตั้งแต่ 150-2,700 คู่เบส และจากเทคนิค AFLP เลือกใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ คือ E+ACT/M+CAT มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 51 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงตั้งแต่ 50-800 คู่เบส พบว่า จากเทคนิค HAT-RAPD และเทคนิค AFLP แสดงเป็น dendrogram ที่มีการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำไยทั้ง 9 พันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่เหมือนกัน แต่ของเทคนิค AFLP พบว่า พันธุ์แห้ว สีชมพู พวงทอง เบี้ยวเขียว และสายพันธุ์ลิ้นจี่ มีการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ใกล้ชิดไม่สอดคล้องกับประวัติพันธุ์

การทดลองที่ 3 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการเลือกใช้ 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA13 OPAK10 OPB18 OPG13 OPT15 OPW06 OPW09 OPX01 OPX15 และ OPZ01 พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 163 แถบ คิดเป็น 53.44 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-2,500 คู่เบส การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ใกล้ชิดของลำไย 20 พันธุ์ มีการแบ่งกลุ่มเป็น 3 กลุ่มใหญ่ และมีการจัดกลุ่มความสัมพันธ์สอดคล้องตามประวัติพันธุ์

BRT 542012

Thesis Title	Genetic Variation of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) in the Upper Part of Northern Thailand by Using Molecular Markers
Author	Miss Jenjira Marha
M.S.	Biology

Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Somboon	Anuntalabhochai	Chairpersol
	Mr. Boontham	Thakumfu	Member
	Dr. Nataya	Dum Ampai	Member

Abstract

In this study, our experiment was divided into 3 parts. The first and the second were to compare DNA fingerprint pattern between HAT-RAPD and AFLP techniques in different longan tissues including leaf, aril, fruit-peel, and seeds and among nine varieties of longan respectively. To amplify polymorphic DNA, three arbitrary primers named OPAT05, OPG13 and OPH13 were chosen for HAT-RAPD as well as four primer combinations named E+AAG/M+CTA, E+ACT/M+CAG, E+AGG/M+CTA and E+AGG/M+CTT for AFLP in the first experiment. The DNA fingerprint pattern in different tissues generated by HAT-RAPD was identical whereas the pattern generated by AFLP was not. In the second experiment, using six arbitrary primers named OPAK10, OPAK14, OPAS10, OPD20, OPG13 and OPH13 for HAT-RAPD provided 123 polymorphic bands with molecular weight 150-2700 bp in range. While a primer combination named E+ACT/M+CAT for AFLP generated 51 polymorphic bands with molecular weight 50-800 bp in range. Regarding HAT-RAPD dendrogram, all 9 varieties was classified into 2 majors groups as well as in AFLP dendrogram. However, the AFLP dendrogram, Biewkhew, Lintchi, Heaw, Seechompoo and Puangthong were not classified correspondingly to their historical data.

BRT 542012.

The third experiment was to evaluate genetic variation among 20 varieties of longan using HAT-RAPD. Ten arbitrary primers named OPA13, OPAK10, OPB18, OPG13, OPT15, OPW06, OPW09, OPX01, OPX15 and OPZ01 provided 163 polymorphic bands (50.44%) with molecular weight 100-2500 bp in rang. All 20 varieties was classified into 3 major groups and matched to their histological background.

สารบาญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบาญตาราง	ฌ
สารบาญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	34
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	50
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก	68
ประวัติผู้เขียน	76

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
1	รายชื่อพันธุ์ลำไย	16
2	แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT-RAPD กับเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของลำไย	21
3	แสดงลำดับเบสของ adapter และคู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR I และ PCR II ของเทคนิค AFLP กับเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย	24
4	แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 9 พันธุ์	31
5	แสดงลำดับเบสของ adapter และคู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR I และ PCR II ของเทคนิค AFLP กับลำไย 9 พันธุ์	32
6	แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 20 พันธุ์	33
7	แสดงรายชื่อของไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 9 พันธุ์	36
8	แสดงลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค AFLP กับลำไย 9 พันธุ์	39
9	แสดงรายชื่อของไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 20 พันธุ์	44

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
1	แสดงหลักการของปฏิกิริยา HAT-RAPD	6
2	แสดงหลักการของปฏิกิริยา AFLP	8
3	ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวนอน	23
4	ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวตั้ง	29
5	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย โดยเทคนิค HAT-RAPD	34
6	แสดงแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย โดยเทคนิค AFLP ด้วยการใช้ 4 คู่ไพรเมอร์	35
7	แสดงแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 9 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 6 ไพรเมอร์	37
8	dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 9 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 6 ไพรเมอร์	38
9	แสดงพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 9 สายพันธุ์ โดยเทคนิค AFLP ด้วยการใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ คือ E+ACT/M+CAT	39
10	dendrogra แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 9 พันธุ์ โดยเทคนิค AFLP ด้วยการใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ คือ E+ACT/M+CAT	40
11	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPA13(A) และ OPG13(B)	41
12	dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPA 13	42
13	dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPG 13	43
14	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPAK10(A) OPB18(B) และ OPT15(C)	45
15	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPW06(A) OPW09(B) และ OPX01(C)	46

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
16	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPX15(A) และ OPZ01(C)	47
17	dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 10 ไพรเมอร์	49

อักษรย่อ และสัญลักษณ์

λ	=	lambda
μ	=	micro หรือ ไมโคร
λ/*Pst* I	=	lamda DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst* I
°C	=	centigrade หรือ องศาเซลเซียส
μg	=	microgram (s) (10^{-6}) หรือ ไมโครกรัม
μl	=	microliter (s) (10^{-6}) หรือ ไมโครลิตร
3'	=	carbon atom ตำแหน่งที่ 3 ของ deoxyribose
5'	=	carbon atom ตำแหน่งที่ 5 ของ deoxyribose
A	=	adenine
AFLP	=	amplified fragment length polymorphism (s)
ATP	=	adenosine triphosphate
bp	=	base pair (s) หรือ คู่เบส
C	=	cytosine
cm.	=	centimeter (s) หรือ เซนติเมตร (ซม)
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNAase	=	deoxyribonuclease
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
Eco RI	=	*Escherichia coli* RY 13
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
G	=	guanine
kb	=	kilobase (s) หรือ กิโลเบส
l	=	liter (s) หรือ ลิตร
M	=	molar หรือ โมลาร์
m.	=	meter (s) หรือ เมตร
mg	=	milligram (s) หรือ มิลลิกรัม
min	=	minute (s) หรือ นาที

ml	=	millileter (s) หรือ มิลลิลิตร
mM	=	millimolar หรือ มิลลิโมลาร์
mmol	=	millimole หรือ มิลลิโมล
MW	=	molecular weight หรือ น้ำหนักโมเลกุล
ng	=	nanogram (s) (10^{-9}) หรือ นาโนกรัม
nm	=	nanometer (s) (10^{-9}) หรือ นาโนเมตร
OD	=	optical density
oligo	=	oligonucleotide (s) หรือ นิวคลีโอไทด์
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	=	polymerase chain reaction
pg	=	picogram (s) (10^{-12}) หรือ พิโคกรัม
pH	=	logarithm of recirprocal of hydrogen (H) ion concentration
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism (s)
rpm	=	revolutions per minute
sec	=	second (s) หรือ วินาที
SSR	=	single sequence repeat
T	=	thymine
TAE	=	Tris-acetate-EDTA
TBE	=	Tris-borate-EDTA
TE	=	Tris EDTA buffer
Tru 9I	=	*Thermus ruber* 9
U	=	unit (s)
U	=	uracil
UV	=	ultraviolet
V	=	voltage, volt (s)
vol	=	volume

บทที่ 1

บทนำ

ลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.) เป็นไม้ผลเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการส่งออกทำรายได้ให้กับประเทศไทยปีละหลายล้านบาท ในปี พ.ศ. 2544 มีมูลค่าการส่งออกประมาณ 310.6 ล้านบาท (ม.ค.-พ.ค.) นอกจากการส่งออกลำไยสดไปจำหน่าย ปัจจุบันมีการพัฒนาอุตสาหกรรมแปรรูปลำไยในรูปแบบต่างๆ ซึ่งเป็นการกระจายรายได้และสร้างงานให้เกิดขึ้นภายในเขตภาคเหนือ (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2545) พันธุ์ลำไยที่นิยมใช้ในทางการค้ามีมากมายหลายพันธุ์ โดยธรรมชาติลำไยเป็นพืชผสมข้าม จึงเกิดการผสมข้ามพันธุ์กันเป็นสาเหตุให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในประชากรลำไย (เกศิณี, 2528) นอกจากนี้ในอดีตที่ผ่านมานิยมขยายพันธุ์ลำไยโดยการเพาะเมล็ดแต่ในปัจจุบันนิยมขยายพันธุ์ด้วยกิ่งตอนจากต้นที่ส่วนใหญ่คัดเลือกได้จากการเพาะเมล็ด ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ อีกทั้งในแต่ละท้องถิ่นมีประวัติพันธุ์ที่ไม่แน่นอน อาจมีการตั้งชื่อที่ต่างกันในพันธุ์เดียวกัน หรือชื่อเหมือนกันในพันธุ์ต่างกัน (สัมฤทธิ์, 2523) การขาดข้อมูลทางประวัติพันธุ์แล้วนำมาปลูกทำให้มีการตั้งชื่อใหม่ก่อให้เกิดความสับสนขึ้น และจากลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของพืชมักเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ทำให้การจำแนกพันธุ์โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทางโครงสร้างของลำไย (morphology) หรือลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) เพียงอย่างเดียวไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมากได้ และความชัดเจนยังไม่เพียงพอ (Ramingwong and Chiewilp, 1994) โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนบนซึ่งเป็นแหล่งปลูกลำไยที่สำคัญของประเทศไทย จึงควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ลำไยให้ละเอียดในระดับโมเลกุลด้วยอาศัยการพิสูจน์โดยใช้ข้อมูลทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เพื่อที่จะได้ทราบลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไยแต่ละพันธุ์ และรวบรวมเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ การขยายพันธุ์ การตลาด การตรวจสอบทางการค้า คุณภาพ รวมไปถึงการคุ้มครองพันธุ์พืชในอนาคต และเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อช่วยสนับสนุนงานทางด้านอนุกรมวิธาน (Taxonomy)

สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือก molecular markers เช่น HAT - RAPD (High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA) และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) ซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างของพันธุ์ จำแนกความแตกต่างระหว่างชนิด (species) หรือการจำแนกในระดับสายต้น (clone) ของพืช รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมและวิวัฒนาการ ตลอดจนศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช เช่น ใช้จำแนกพืชชนิดเดียวกันแต่เจริญเติบโตในพื้นที่แตกต่างกัน นอกจากนี้เทคนิคนี้ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลูกผสม (inbreed purity) เพื่อประมาณเปอร์เซ็นต์การผิดปกติ (off-type) ของลูกผสม โดยตรวจสอบจากการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ปริมาณความแตกต่างของแถบน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ ดังนั้นการนำ molecular markers มาใช้ในการจัดจำแนกพันธุ์ลำไยจะช่วยให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ลำไยได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และแม่นยำ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยในเขตภาคเหนือตอนบน โดยใช้ molecular markers เพื่อประกอบการจำแนกสายพันธุ์
2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ในระดับพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ลำไย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ลำไยเป็นพืชในวงศ์ Sapindaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus longan* Lour. (เกศิณี, 2528; รวี, 2540) นอกจากนี้ยังมีชื่อพ้องคือ *Euphoria longana* Lam. (สมศักดิ์, 2527; เกศิณี, 2528) *Nephelium longana* Cambess. (สมศักดิ์, 2527; พิชัย, 2531) และ *Dimocarpus longana* Lour. (Subhadrabandhu, 1990) มีชื่อสามัญเป็นภาษาอังกฤษว่า longan, longyen หรือ lonkeng

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลำไย

ลำไยเป็นไม้ผลยืนต้นที่มีลักษณะใกล้เคียงกับลิ้นจี่ และเงาะ โดยมีลักษณะทั่วๆ ไป (Subhadrabandhu, 1990) ดังมีรายงานดังนี้

ลำต้น : มีขนาดปานกลางถึงใหญ่ ถ้าเป็นลำต้นที่เกิดจากเมล็ดจะมีลำต้นขึ้นตรง เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ มีทรงพุ่มสูงประมาณ 10-12 เมตร และถ้าเป็นลำต้นที่เกิดจากกิ่งตอน และไม่ได้รับการตกแต่งในขณะที่ต้นยังเล็ก มักแตกลำต้นหลายต้น ซึ่งไม่ค่อยเหยียดตรง ลักษณะเปลือกลำต้นขรุขระ มีสีเทาหรือสีเทาปนน้ำตาลแตกเป็นสะเก็ด

กิ่งก้าน : จะแตกออกรอบๆ ต้น โดยต้นที่ปลูกจากเมล็ดจะแตกกิ่งล่างสูงสุดจากพื้นดินประมาณ 2-4 เมตร และต้นที่ได้จากกิ่งตอนจะแตกกิ่งล่างสุดต่ำกว่า คือ ประมาณ 1-2 เมตร

ใบ : เป็นใบประกอบ ก้านใบรวมยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร มีใบย่อย 2-5 คู่ อาจมีการเรียงตัวแบบสลับหรือตรงข้ามกัน ใบแต่ละใบกว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร รูปร่างของใบมีลักษณะต่างกันตั้งแต่ใบรูปรี รูปหอกปลายทู่ ปลายเรียวแหลม ด้านบนใบมีสีเขียวเข้มเป็นมัน ความกว้างและความยาวของใบขึ้นกับพันธุ์ลำไย

ช่อดอก : เกิดเป็นช่อ ตามปลายกิ่งด้านนอกของทรงพุ่ม ช่อดอกมีขนาดใหญ่ รูปทรงกรวย ดอกมีขนาดเล็ก สีขาวนวล ช่อหนึ่งๆ อาจประกอบด้วยดอกตัวผู้ ดอกตัวเมีย และดอกสมบูรณ์เพศ ซึ่งดอกตัวผู้จะอยู่ด้านโคนช่อ และจะบานก่อนดอกตัวเมีย

ดอกตัวผู้ : แต่ละดอกมีเกสรตัวผู้ 8 อัน หรือน้อยกว่า เรียงตัวแถวเดียวบนจานรองดอก เกสรตัวผู้ มีขนประกอบด้วยอับละอองที่มี 2 ช่อง

ดอกตัวเมีย : แต่ละดอกประกอบด้วย 2 รังไข่ บนจานรองดอก ผิวภายนอกของรังไข่ถูกปกคลุมด้วยขนสั้นๆ จะมีเพียง 1 รังไข่เท่านั้นที่จะเจริญไปเป็นผลส่วนอีกหนึ่งอันจะแห้งเหี่ยวไป

บางครั้งอาจจะพบว่ามีทั้ง 2 รังไข่ที่จะเจริญไปเป็นผล ซึ่งพบน้อยมาก ในดอกตัวเมียอาจพบเกสรตัวผู้ กรณีนี้เกสรตัวผู้จะลดรูป โดยก้านชูเกสรที่สั้นจำนวน 8 อัน จึงควรเรียกดอกชนิดนี้ว่า ดอกสมบูรณ์เพศ ดอกชนิดนี้ ละอองเกสรเป็นหมันและแห้งหลังจากดอกบาน ดอกที่มีละอองเกสรที่มีชีวิตเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้มีการบานคาบเกี่ยวกันกับดอกสมบูรณ์เพศบนต้น เนื่องจากช่อดอกทั้งหมดมีการพัฒนาในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งอาจใช้เวลา 4-6 สัปดาห์ ขึ้นกับพันธุ์ การถ่ายละอองเกสรเกิดเวลา 8.00-14.00 นาฬิกา อับละอองเกสรเริ่มแตกเวลา 12.00-17.00 นาฬิกา การติดผลเกิดในดอกตัวเมียที่บานเวลาเดียวกับดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียที่บานก่อนหรือหลังดอกตัวผู้ จะมีโอกาสติดผลน้อย

ผล : หลังจากดอกได้รับการผสมพันธุ์แล้ว จะเจริญไปเป็นผลใช้เวลา 5-7 เดือน ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพภูมิอากาศ ในต้นที่แข็งแรง ช่อดอกหนึ่งช่ออาจมีถึง 80 ผล ลักษณะของผลมีทั้งทรงกลม และเบี้ยว ขนาดของผลและเมล็ดแตกต่างกันตามพันธุ์ แต่ละผลมีน้ำหนักแตกต่างกันจาก 5-20 กรัม คุณภาพผลที่ดีจะอยู่ในช่วง 10-18 กรัม เปลือกสีน้ำตาลปนเหลือง หรือน้ำตาลปนแดง หรือเขียวปนน้ำตาล ทั้งนี้ขึ้นกับพันธุ์ลำไย เนื้อลำไยมีสีขาวลักษณะคล้ายวุ้น รสหวาน กลิ่นหอม มีน้ำหนัก 75% ของน้ำหนักผล เมล็ดเดี่ยวสีน้ำตาลดำเป็นมันเรียบ เมล็ดลำไยจึงถูกเรียกว่า dragon's eye ผลหนึ่งผลมีเพียงเมล็ด 1 เมล็ด

ลำไยในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ลำไยเครือ และลำไยต้น

1. ลำไยเครือ หรือลำไยเถา (semi – vine longan ; *Euphoria scandens* Winit Kerr) มีการเจริญเติบโตกึ่งเลื้อยคล้ายกับต้นเฟื่องฟ้า ผลมีขนาดเล็ก เมล็ดใหญ่ ปกติพบในภาคตะวันออกของประเทศไทย เช่น จังหวัดชลบุรี ส่วนใหญ่ใช้เป็นไม้ประดับ

2. ลำไยต้น (bush longan or longan tree) สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 ชนิด คือ

2.1 ลำไยดั้งเดิม (indigenous longan) พบในป่า ต้นมีขนาดใหญ่ ผลมีขนาดเล็ก เนื้อผลบาง อาจมีประโยชน์ด้านงานผสมพันธุ์

2.2 ลำไยพันธุ์พื้นเมือง (native longan or common longan) ในบางพื้นที่ของประเทศไทยเรียกว่า ลำไยกระดูก พบทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ เช่น เชียงใหม่ ลำพูน หนองคาย และอุบลราชธานี เป็นต้น กิ่งและลำต้นมีเปลือกไม้มาก ลำต้นชะลูดตั้งตรง สามารถเจริญเติบโตเป็นไม้ใหญ่ได้ ให้ผลผลิตมาก แต่ผลมีขนาดเล็ก เมล็ดใหญ่ และมีเนื้อผลน้อย คุณภาพผลต่ำ มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 13.75%

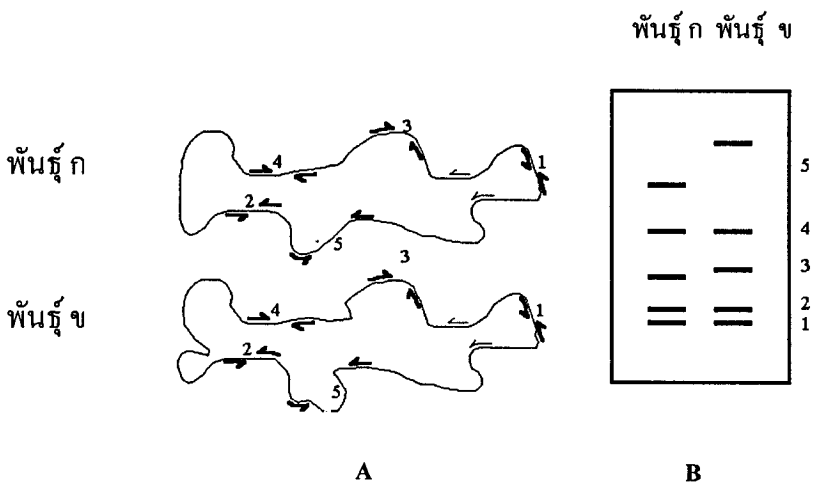
2.3 ลำไยกระโหลก (commercial longan) คือลำไยที่ปลูกเป็นการค้าซึ่งได้รับความนิยมมากที่สุดและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากผลมีขนาดใหญ่ เนื้อมาก เมล็ดเล็ก มีพันธุ์การค้าที่ปลูกมากมายในประเทศไทย

การจำแนกพันธุ์พืชโดย Molecular Markers

การศึกษาพันธุกรรมของพืชในระดับดีเอ็นเอมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากพันธุกรรมของพืชเป็นตัวกำหนดลักษณะสัณฐานวิทยาหรือลักษณะที่ปรากฏออกมาของพืช และลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันจึงอาจแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันได้ (Gottieb, 1977) หลายปีก่อนมีการศึกษาเทคนิควิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่จะนำมาใช้ประโยชน์กับงานด้านจำแนกพันธุ์พืช วิธีการทางชีวเคมีที่เรียกว่าอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยสกัดและศึกษาชนิดของเอนไซม์ในพืชที่เรียกว่าไอโซไซม์ (Pasteur *et al.*, 1988 ; จริงแท้, 2531 ; ปนัดดา, 2541) อีกวิธีการหนึ่งคือเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ โดยศึกษาจำนวน ลักษณะ และพฤติกรรมของโครโมโซม (กฤษฎา, 2519) จากการจำแนกพันธุ์ลำไยโดยใช้วิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ พบว่าลำไยมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 30 (ปนัดดา, 2541) และได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อนำมาใช้ศึกษาในพืชมากยิ่งขึ้น คือการนำ molecular markers มาตรวจสอบดูได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ซึ่งมีความหลากหลายสูงมากในพืช สามารถจำแนกความแตกต่างลักษณะสัณฐานวิทยาและชนิดได้โดยให้ผลที่ถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ การตรวจสอบโดยใช้ DNA fingerprinting มีหลายวิธีการ ตัวอย่างเช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980) มีการศึกษาโดยเทคนิค RFLP กันอย่างกว้างขวางกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด การทำแผนที่ทางพันธุกรรมของข้าว (Nagamura *et al.*, 1997) การทำ DNA fingerprinting ในข้าวโพด (Bernado, 1994) ข้าวฟ่าง (Xu *et al.*, 1994) แต่ในทางปฏิบัติยุ่งยากซับซ้อน ใช้เวลานาน ดีเอ็นเอที่ใช้มีปริมาณมากและคุณภาพดีมีความเข้มข้นสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดขั้นตอน ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายลง จึงมีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาปรับใช้เป็นเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Saiki *et al.*, 1988) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเพื่อลดระยะเวลาในการทำงาน ภาณี (2536) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อแยกความแตกต่างของพืชตระกูลกะหล่ำ ตรวจดูความสัมพันธ์ของลูกผสมระหว่างชนิด และตรวจแยกความแตกต่างของลูกผสมกับสายพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่ พบว่า สามารถนำวิธีการ RAPD ไปประยุกต์ใช้เพื่อลดระยะเวลาการทำงานในการปรับปรุงพันธุ์ได้

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chian Reaction (PCR) โดยอาศัยการสุ่มจับของไพรเมอร์ (random primer หรือ arbitrary primer) เพื่อเพิ่มปริมาณ deoxyribonucleic acid (DNA) และใช้หลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) ได้แก่ adenosine (A), thymine (T), guanine (G), และ cytosine (C) ที่มีการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอ มาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับขบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ (วัชรี และมนตรี, 2536) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis) และนำแผ่น gel มาตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสต่างกันย่อมมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันมากจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน ซึ่งในเทคนิค RAPD โดยทั่วๆ ไป จะใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ประมาณ 35-42°C แต่ใน HAT-RAPD จะมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 46-62°C เทคนิคนี้ให้ high resolution, reproducibility, และ polymorphism (Anuntalabhochai, 2000)



ภาพ 1 แสดงหลักการปฏิกิริยา HAT-RAPD

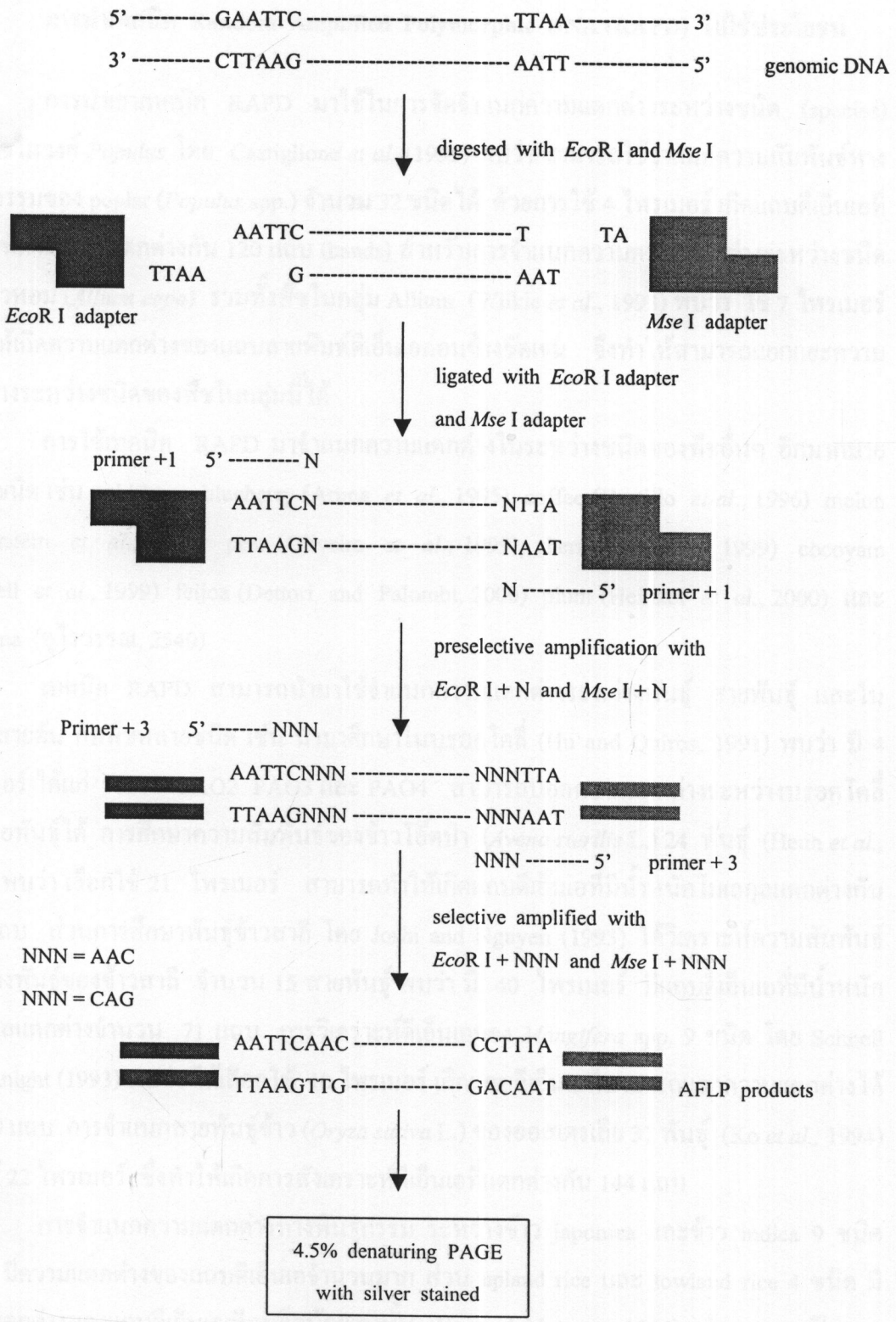
A : ภาพสมมติการเกิดการเกาะของไพรเมอร์กับตำแหน่งต่างๆ

= primer ที่เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA)

B : รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายหลังวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 1, 2, 3, 4 และ 5 = แถบ (band) ที่สังเคราะห์ได้แต่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน

เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้การตัดด้วยเอนไซม์ (enzyme) เหมือนกับหลักการของเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) แล้วนำชิ้นส่วนที่ถูกตัดมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้ลำดับเบสเจาะจงกับชิ้นส่วนที่ถูกต่อเชื่อมกับ adapter ที่อยู่เฉพาะด้านของแต่ละเอนไซม์ โดยเทคนิค AFLP มีหลักการของปฏิกิริยาอยู่ 3 ขั้นตอน ตามลำดับดังนี้ ขั้นแรกคือการตัด genomic DNA ด้วย 2 เอนไซม์ คือ *EcoR*I (มีตำแหน่งที่ตัดจำเพาะ 6 เบส ; G^AATTC) และ *Mse*I (มีตำแหน่งที่ตัดจำเพาะเจาะจง 4 เบส ; T^TAA) ชิ้นส่วนที่ถูกตัดแล้วจะมีตำแหน่งลำดับเบสที่ตัดของเอนไซม์มาต่อเชื่อมกับ adapter และทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง โดยมีลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง (specific primer) กับตำแหน่งของเอนไซม์และ adapter โดยการเพิ่มจำนวนลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อให้มีการคัดเลือกยิ่งขึ้นในขั้นตอนของการทำ PCR ครั้งที่ 2 การทำปฏิกิริยา PCR ครั้งแรกเป็นการคัดเลือกโดยลำดับเบสที่ใช้มีจำนวน 1 ตำแหน่งเพื่อลดจำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต้องการลง (การทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนนี้เรียกว่า preamplified selective PCR หรือ PCRI) โดยลำดับเบสหนึ่งตำแหน่งนี้จะเป็นตัวกำหนดการเพิ่มลำดับเบสตำแหน่งต่อไปในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ซึ่งในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาครั้งแรกนี้จะยังไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีการ polyacrylamide gel electrophoresis เนื่องจากมีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวนมากเกิดขึ้นเกินที่จะวิเคราะห์ผลได้ละเอียด การทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 จึงมีการเพิ่มจำนวนเบสอีก 2-4 ตำแหน่งเพื่อเพิ่มการคัดเลือกให้มากยิ่งขึ้นและแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นก็จะลดจำนวนลงเพื่อสะดวกและง่าย ที่จะสามารถตรวจสอบวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการ polyacrylamide gel electrophoresis (การทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 นี้เรียกว่า Amplified selective PCR หรือ PCRII)



ภาพ 2 แสดงหลักการของปฏิกิริยา AFLP (Krutto, 1998)

การนำเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ไปใช้ประโยชน์

การนำเอาเทคนิค RAPD มาใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิด (species) ของพืชในวงศ์ *Populus* โดย Castiglione *et al.* (1993) พบว่า สามารถใช้จำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ poplar (*Populus* spp.) จำนวน 32 ชนิดได้ ด้วยการใช้ 4 ไพรเมอร์ เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 120 แถบ (bands) สำหรับการจำแนกความความแตกต่างระหว่างชนิดของหัวหอม (*Allium cepa*) รวมทั้งพืชในกลุ่ม Allium (Wilkie *et al.*, 1993) พบว่า ใช้ 7 ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอค่อนข้างชัดเจน จึงทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชในกลุ่มนี้ได้

การใช้เทคนิค RAPD มาจำแนกความแตกต่างในระหว่างชนิดของพืชอื่นๆ อีกมากมายหลายชนิด เช่น rabbiteye blueberry (Aruna *et al.*, 1995) coffee (Castillo *et al.*, 1996) melon (Silberstein *et al.*, 1999) pear (Oliveira *et al.*, 1999), cherry (Hormaza, 1999) cocoyam (Schnell *et al.*, 1999) feijoa (Dettori and Palombi, 2000) plum (Heinkel *et al.*, 2000) และ curcuma (อุไรวรรณ, 2540)

เทคนิค RAPD สามารถนำมาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ สายพันธุ์ และในระดับสายต้น กับพืชหลายชนิด เช่น นำมาศึกษาในบรอคโคลี่ (Hu and Quiros, 1991) พบว่า มี 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ PAO1 PAO2 PAO3 และ PAO4 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างบรอคโคลี่ 14 สายพันธุ์ได้ การศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวโอ๊ตป่า (*Avena sterilis* L.) 24 พันธุ์ (Heun *et al.*, 1994) พบว่า เลือกใช้ 21 ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 115 แถบ ส่วนการศึกษาพันธุ์ข้าวสาลี โดย Joshi and Nguyen (1993) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ของข้าวสาลี จำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่า มี 40 ไพรเมอร์ มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างจำนวน 71 แถบ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ *Mangifera* spp. 9 ชนิด โดย Schnell and Knight (1993) พบว่า ได้เลือกใช้ 10 ไพรเมอร์ เกิดแถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างได้ถึง 109 แถบ การจำแนกสายพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ของออสเตรเลีย 37 พันธุ์ (Ko *et al.*, 1994) โดยใช้ 22 ไพรเมอร์ ซึ่งทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 144 แถบ

การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างข้าว japonica และข้าว indica 9 ชนิด พบว่า มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ส่วน upland rice และ lowland rice 4 ชนิด มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Yu and Nguyen, 1994) ในรายงานปีต่อมา Cho *et al.* (1995) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวแดงเกาหลี (Koream red rice) จำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่า มี 20 ไพรเมอร์ สามารถจัดจำแนกความแตกต่างได้ 2 กลุ่มหลัก คือ

กลุ่มข้าวแดงที่มีเมล็ดสั้นเป็นข้าวสายพันธุ์ japonica และกลุ่มข้าวแดงที่มีเมล็ดยาว ประกอบด้วยสายพันธุ์ indica และสายพันธุ์ Tongil-type ได้เป็นอย่างดี นิตย์ศรี และคณะ (2537) ทดสอบใช้ 14 ไพรเมอร์ สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 158 แถบ สามารถจัดจำแนกความแตกต่างด้านพันธุกรรมของหญ้าแฝก 10 สายพันธุ์ ส่วน จันทร์จีรา (2541) ได้ทดสอบใช้ 69 ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ คือ PAK10 PAQ12 PAS10 PB18 และ PC09 ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้นที่แตกต่างจำนวน 60 แถบ บอกความแตกต่างของลิ้นจี่ 20 สายพันธุ์ได้

การใช้เทคนิค RAPD แยกความแตกต่างหรือจำแนกในระดับสายต้น ของพืช *Populus* (Lin *et al.*, 1994) โดยใช้ในการจำแนกความแตกต่าง ของ poplar และ willow clones ด้วยการใช้ไพรเมอร์ (Deca-11 Chl-1 Chl-4 และ Chl-10) ในการจำแนก poplar โดยใช้ไพรเมอร์ M13 Universal ในการจำแนก willow clones พบว่าสามารถจำแนกได้ถูกต้องและประหยัด

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการ Marson *et al.* (1993) ได้ทำการทดลองในข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า ด้วยการใช้ 10 ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ซึ่งใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ B73 กับ A7 และสายพันธุ์ลูกผสมได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Shimada *et al.* (1993) นำวิธีการ RAPD มาใช้เป็น genetic marker ในการจำแนกความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่กับพันธุ์ลูกผสม (F1 hybrid) ของ Mume (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) การนำไปใช้ในการช่วยคัดเลือกพันธุ์ของ American elm (*Ulmus americana* L.) โดยการทดลองของ Kamaley and Carey (1995) พบว่า ผลการศึกษาที่ได้เป็นไปตามกฎของเมนเดลในการถ่ายทอดยีนไปสู่ลูก ดังเช่นการทดลองของ Elisiário *et al.* (1999) ที่ตรวจสอบลูกผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การทดลองผสมข้ามของ avocado (Kobayashi *et al.*, 2000) ข้าวลูกผสม และวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* ในการทดลองของ Wang *et al.* (1994) นำเทคนิค RAPD ใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ข้าวลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ได้ สมศักดิ์ และคณะ (2538) ใช้เทคนิค RAPD มาตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* 5 ชนิด จำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยการใช้ 7 ไพรเมอร์ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 68 แถบ พบว่า สามารถแบ่งข้าวที่ศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะสอดคล้องกับองค์ประกอบของ genome ในแต่ละชนิด ตามที่มีการศึกษามาก่อนแล้ว

การนำเทคนิค RAPD มาใช้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช โดยการทดลองของ Munthali *et al.* (1996) ตรวจสอบการเกิด somaclonal variation ของต้นกล้า sugar beet ที่ได้รับการชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถึงรุ่นที่ 3 พบว่า มีความถี่ของการเกิด 0.05%

การใช้เทคนิค RAPD มาจำแนกความแตกต่างของพืชชนิดเดียวกัน พันธุ์เดียวกัน แต่ปลูกในสถานที่แตกต่างกัน โดยการทดลองของ Adam *et al.* (1993) ได้นำมาศึกษา terpenoid จากต้น juniper จากเมือง Abha ของประเทศซาอุดิอาระเบีย กับ *Juniperus excelsa* จากประเทศกรีก และ *J. procera* จากเมือง Addis Ababa ประเทศเอธิโอเปีย พบว่า จำแนกความแตกต่างของ juniper จากแต่ละแหล่งได้อย่างชัดเจน ในการทดลองของ Benito *et al.* (1993) ได้จำแนกความแตกต่างของพืชจาก endosperm ของเมล็ดหรือจากชิ้นส่วนเล็กๆ ของใบ ทั้งในพืชชนิดเดียวกันหรือระหว่างชนิดกัน และในกรณีเดียวกัน Valenzuela *et al.* (1997) ศึกษามะม่วง 15 พันธุ์จากแต่ละแหล่ง และชนิดของ embryo พบว่า ด้วยการใช้ 13 ไพรเมอร์ เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 109 แถบ ทำให้การจำแนกพันธุ์เป็นไปตามพันธุ์ประวัติจากแหล่งดั้งเดิม และการจำแนกชนิดของ embryo มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมที่มีมาตั้งแต่ดั้งเดิม เทคนิค RAPD สามารถนำมาจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ และเป็นประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร (Hofstra *et al.*, 1994) จำแนกวิธีการวิเคราะห์ออกเป็น RFLP RAPD และ DNA fingerprinting สามารถใช้หาแหล่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารได้อย่างรวดเร็ว และการใช้เทคนิค RAPD มาการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ เช่นเชื้อรา เพื่อนำมาใช้เป็นประโยชน์กับทางด้านโรคพืชได้ โดยการทดลองของ Heidenreich *et al.* (1995) จำแนกสายพันธุ์ *Trichoderma viride* และ *Trichoderma* spp. 11 สายพันธุ์ *Trichioderma* spp. 9 สายพันธุ์ และ *Trichoderma viride* 2 สายพันธุ์

การใช้เทคนิค RAPD ที่มีการใช้ annealing ที่อุณหภูมิต่ำๆ อาจเกิดปัญหาซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยอื่นๆ หลายปัจจัย ดังในการทดลองของ Golenberg *et al.* (1996) ตรวจสอบว่ามีปัจจัยอะไรที่มีผลต่อกระทบต่อผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR products) เช่น 1) ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ซึ่งพบว่า การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่คุณภาพไม่ดี (template DNA degradation) จะทำให้ PCR products เกิดชิ้นส่วนจำนวนมากขึ้น และสามารถเกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (reproducibility) ได้เหมือนเดิมสูง 2) การจับกันเองของดีเอ็นเอต้นแบบ (reconstruction of fragment) การจับกันเองของไพรเมอร์ (primer-dimer) และ 3) dNTP ที่มีปริมาณมากเกินไปจะมีผลทำให้เกิดการแข่งขันกันจับกับ $MgCl_2$ เป็นต้น มีการทดลองศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อผลผลิตของปฏิกิริยา PCR เพิ่มมากขึ้น โดยการทดลองของ Chen *et al.* (1997) กับเนื้อเยื่อจากใบและรากของถั่วเหลือง ได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) การเปรียบเทียบการเติมและไม่ได้เติมของสาร DMSO (dimethyl sulphoxide) และ TMAC (tetramethyl-ammonium chloride) ในปฏิกิริยา PCR การตรวจสอบ oligo-primers ที่มีแหล่งผลิตของการสังเคราะห์แตกต่างกัน การเปรียบเทียบความแตกต่างของเครื่อง PCR ที่ใช้ พบว่า มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากใบและราก ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นเป็นบางครั้ง

ล่าสุดได้มีการดัดแปลงเทคนิค RAPD ซึ่งเดิมได้ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 35-42°C เพิ่มขึ้นมาเป็น 46-62°C และมีชื่อเรียกว่า HAT-RAPD (High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA) โดยเทคนิคนี้ให้ high resolution, reproducibility, และ polymorphism (Anuntalabhochai *et al.*, 2000)

การนำเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ไปใช้ประโยชน์

ได้มีการนำเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำเอาหลักการจากเทคนิค RFLP มาใช้ร่วมกับการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการบอกความแตกต่างของชนิด พันธุ์พืช เช่น ในพืชหญ้าแฝก (เจนจิรา และอภิชาติ, 2540) จำแนกความแตกต่างของหญ้าแฝก 24 สายพันธุ์ ด้วยการใช้ 4 คู่ไพรเมอร์

ศึกษาเพื่อดูความหลากหลายในพันธุ์ทางการค้ากับพันธุ์ดั้งเดิมของพืชถั่วเหลือง Maughan *et al.* (1996) ได้นำไปใช้ตรวจดูความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม และนำมาใช้เป็น genetic markers ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่นด้วยกับการทดลองของ Hongtrakul *et al.* (1997) ศึกษาในเมล็ดทานตะวันในกลุ่มสายพันธุ์ใกล้ชิดที่เมล็ดมีการสะสมน้ำมัน โดย Roa *et al.* (1997) จำแนกชนิดของพันธุ์มันสำปะหลังของพันธุ์ที่ปลูกเพื่อเป็นการค้าและพันธุ์ดั้งเดิมออกได้ตามลักษณะสัณฐานวิทยาหรือตามภูมิศาสตร์นิเวศวิทยา

ชาเป็นพืชเศรษฐกิจที่ถูกนำมาศึกษาทางพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิค AFLP โดยการทดลองของ Paul *et al.* (1997) ตรวจสอบความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของชาที่มีถิ่นกำเนิดต่างสถานที่ ในทำนองเดียวกับ Schut *et al.* (1997) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวบาร์เลย์ ซึ่งก็เปรียบเทียบกับทั้งข้อมูลทางประวัติพันธุ์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในกรณีการทดลองของ Chen *et al.* (1999) ศึกษาในกล้วยไม้ Vanda โดยได้ตรวจสอบความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากต่างเนื้อเยื่อคือ ใบ ดอก และดอกที่เก็บในเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น อีกส่วนของการทดลองคือศึกษาความหลากหลายในกลุ่มพันธุ์ สำหรับตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมังคุดซึ่งเป็นพืชในสกุล *Garcinia* และพืชสกุลใกล้เคียง รวม 24 ตัวอย่าง (สุรินทร์ และคณะ, 2542) พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มมังคุดมีความคล้ายคลึงกันมาก ส่วนต่างชนิดและสกุลใกล้เคียงมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในทำนองเดียวกับการทดลองของ เฉลิมพล และจุลภาค (2543) ซึ่งศึกษาพันธุกรรมของมะม่วงมหาชนกและมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ที่สวนประพัฒน์ สิทธิสังข์

การใช้เทคนิค AFLP ใช้ศึกษาแผนที่พันธุกรรมเพื่อนำไปใช้ศึกษาวิวัฒนาการ โครงสร้างของ genome จำแนกลักษณะเอกลักษณ์จำเพาะ การถ่ายทอดลักษณะพืช เช่น มะนาว (Wang *et al.*,

1997) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากเมล็ดพันธุ์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อพื้นที่แห้งแล้ง ตรวจสอบการเกิด DNA methylation ในข้าวสาลี ซึ่งการเกิด DNA methylation จะทำให้เกิดความแปรปรวนเกิดขึ้นในพืชทุกชนิด (Barrett *et al.*, 1998) ในปีต่อๆมามีการทดลองของ Hayes and Maroof (2000) ใช้เทคนิค AFLP มาใช้พัฒนาเป็น genetic markers เพื่อใช้ในแผนที่ยีนต้านทานโรคไวรัสของถั่วเหลือง

การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง *Setaria italica* และ *S. viridis* (Ennequin *et al.*, 2000) โดยศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรม และภูมิศาสตร์ที่มีอิทธิพลต่อการเกิดความแปรปรวนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Schmidt and Jensen (2000) พบว่า การสืบทอดทางพันธุกรรมของ *Pedicularis palustris* มีความสัมพันธ์ขึ้นกับอิทธิพลของขนาดประชากร ความแปรปรวนทางพันธุกรรม การจัดการคุณภาพถิ่นที่อยู่อาศัยที่มีการถ่ายทอดสืบต่อกันมา เพิ่มขึ้นมาอีกด้วย การนำเอาเทคนิค AFLP ใช้ตรวจสอบกับการขยายพันธุ์ทางเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วย (Echeverria *et al.*, 2001) พบกว่า มีการกลายพันธุ์ (somaclonal variation) ได้ในอัตราที่สูง

การนำเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellites ไปใช้ประโยชน์

โดยเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการนำเอาเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellites (Tautz, 1989) ที่นิยมมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ สิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ สัตว์ คน พืช (Weising *et al.*, 1995) นำมาใช้เกี่ยวกับพืชส่วนใหญ่จะถูกปรับใช้ตรวจสอบพันธุกรรมความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช แผนที่ยีน และศึกษาความแปรปรวนทางด้านพันธุกรรมของพืช เช่น ในข้าวฟ่าง ที่ถูกปลูกต่างสภาพแวดล้อมทางด้านภูมิศาสตร์ (Taramino *et al.*, 1997) ในข้าวสาลี โดยการทดลองของ Bebeli *et al.* (1997) ได้ศึกษาใน hexaploid (AABBDD) และ tetraploid (AABB) ในข้าว Uozu *et al.* (1997) ศึกษาความแปรปรวนของขนาดของ gemome (genome size) และสัณฐานวิทยาของโครโมโซม (chromosome morphology) ในมะม่วง โดยการทดลองของ Eiadthong *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในมะม่วง 22 สายพันธุ์ และในพืชอ้อย (sugarcane) Cordeiro *et al.* (2000) ได้ศึกษาดูความหลากหลายในระหว่างลูกผสมที่มีความซับซ้อน *S. spontaneum* (2n=40-128) และ *S. officinarum* (2n=60 หรือ 80) ซึ่งเทคนิคนี้นำมาช่วยประโยชน์มาก ในระดับเมล็ดพันธุ์เพื่อการตรวจพันธุกรรม การจำแนกพันธุ์ และการปรับปรุงพ่อแม่พันธุ์

การเปรียบเทียบแต่ละ Molecular Markers

ทุกเทคนิคที่กล่าวมาเป็นบางส่วนใน molecular markers ที่นำไปใช้เป็นวิธีการเพื่อจำแนกและบอกความแตกต่างของพันธุ์พืช แต่มีการทดลองอีกมากมายที่นำเอาหลายๆ เทคนิคมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อการยืนยันและแสดงความสอดคล้องของผลการทดลองไป เช่น การทดลองของ Sharma *et al.* (1996) ได้นำเทคนิค 2 ชนิด คือ AFLP และ RAPD มาศึกษาวิวัฒนาการความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของถั่วแขก (Lenus) 6 กลุ่มประชากร พบว่า ทั้ง 2 วิธีการสามารถนำมาใช้เป็น genetic markers ที่จะมาวิเคราะห์โครงสร้างเพื่อทำแผนที่ทางพันธุกรรม และนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ต่อไปในกลุ่มของถั่วแขกต่อไปได้

การใช้เทคนิคทั้ง AFLP RAPD และ microsatellite (SSR) เป็น genetic markers เพื่อนำไปใช้ในโครงสร้างแผนที่ยีนของข้าวด้วยการทดลองของ Mackill *et al.* (1996) ต่อมา Maheswaran *et al.* (1997) ได้นำเทคนิค RAPD และ AFLP มาศึกษาในข้าวพันธุ์ IR64 (2n) เพื่อตรวจสอบการกระจายของ markers ในแผนที่ยีนทั้ง 12 โครโมโซม การตรวจสอบความแตกต่างที่เกิดในเชื้อพันธุ์พืช (germplasm evaluation) โดย Russell *et al.* (1997) ใช้เทคนิค RFLP RAPD AFLP และ SSR ตรวจสอบทาง genetic relationships ในกลุ่มข้าวบาร์เลย์ 18 พันธุ์ เทียบกับประวัติพันธุ์พืช การทำแผนที่ยีนของพืช Brassica เพื่อใช้ในการบ่งบอกตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานการเกิด clubroot ที่เกิดจากเชื้อ *Plalmodiphora brassicae* ในประชากรของ *Brassica oleracea* ที่เป็น doubled haploid โดยใช้เทคนิค RFLP และ AFLP มาใช้โดย Voorrips *et al.* (1997)

การปรับปรุงพันธุ์พืชยูคาลิปตัส โดย Gaiotto *et al.* (1997) ใช้เทคนิค RAPD และ AFLP มาประเมินการอัตราการเกิดผสมข้ามที่มีลักษณะเด่นก่อนผสมและหลังการผสม ส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในตระกูลของยูคาลิปตัส การทดลองของ Krutto (1998) ใช้เทคนิค SSR RAPD และ AFLP มาเป็นประโยชน์กับการพัฒนาการควบคุมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในข้าวสาลี Martin *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค RFLP, AFLP และ SSR มาศึกษา genetic similarity เพื่อนำไปใช้ตรวจความแปรปรวนในรุ่นลูก โดยการทดลองของ Arcade *et al.* (2000) ใช้เทคนิค RAPD AFLP และ ISSR ศึกษาดู genetic mapping ในพืช European และ Japanese larch เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์และเป็นข้อมูลในการปรับปรุงป่าไม้

ศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมของ maritime pine เพื่อดูการกระจายของ markers ในรุ่นลูกด้วยการใช้เทคนิค protein RAPD และ AFLP โดยการทดลองของ Costa *et al.* (2000) การศึกษาเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP และ SSR พบว่ามีความสอดคล้องกัน มีความสัมพันธ์ทาง phenotic และการกระจายของประชากร

ที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลทาง RFLP ที่มีการรายงานมาก่อนแล้ว ข้อมูลทั้งหมดที่ได้นำไปศึกษา genetic-diversity เพื่อนำไปแก้ไขการเก็บรวบรวมพันธุ์ โดยการทดลองของ Teulat *et al.* (2000)

พืชไม้ยืนต้นตระกูลมะเดื่อ (fig) โดย Cabrita *et al.* (2001) ศึกษาความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมและความสัมพันธ์ในระดับสายต้น (clone) ด้วยเทคนิค isozyme RAPD และ AFLP

การนำเอา molecular markers มาใช้ได้ให้ประโยชน์อย่างมากมาย เช่น การตรวจดูความหลากหลาย ความสัมพันธ์ใกล้ชิดวิวัฒนาการในแต่ละชนิด พันธุ์ การจำแนกและบอกความแตกต่างสายพันธุ์พืช หรือสายต้น (clone) การตรวจสอบความแปรปรวนในรุ่นลูก การทำเครื่องหมายในแผนที่ยีน การหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรค การควบคุมคุณภาพ การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น และที่สำคัญการใช้ Molecular Markers เหล่านี้จะช่วยสนับสนุนงานอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐาน และใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกหลายๆ ชนิดที่มีประโยชน์ต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ตัวอย่างพืช

- การเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์ลำไย เลือกเก็บใบอ่อนของพันธุ์ลำไย 20 พันธุ์

ตาราง 1 รายชื่อพันธุ์ลำไย

หมายเลข	พันธุ์	แหล่งที่เก็บ
1.	ดอ	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
2.	สีชมพู	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
3.	เบี้ยวเขียว	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
4.	พวงทอง	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
5.	ดอเชียงราย 13	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
6.	นราภิรมย์	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
7.	ดอน่าน	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
8.	ลิ้นจี่	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
9.	กะทิ	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
10.	พวงทอง 05	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
11.	แห้ว	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
12.	เพชรสาคร	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
13.	ดอห้างฉัตร 46	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
14.	ดอลำพูน 01	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
15.	ดอนครพนม	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
16.	ดอหลวง	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
17.	ปิงปอง	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย
18.	ฮกเกี้ยน	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย
19.	สุขุม	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย
20.	เวียดนาม	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 เครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400)

1.2.2 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)

1.2.3 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

1.2.4 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

1.2.5 ตู้ดูดไอพิษ (toxicap)

1.2.6 ชุดโกร่งบดตัวอย่าง (mortar และ pestle)

1.2.7 ตู้บ่ม (incubator)

1.2.8 เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)

1.2.9 เครื่องทำน้ำแข็ง (ice machine)

1.2.10 เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ ตู้เย็น ตู้แช่ -20°C และตู้แช่ 4°C

1.2.11 เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)

1.2.12 เครื่องกวนสารละลายด้วยความร้อน (hot plate)

1.2.13 เครื่องเขย่า (shaker)

1.2.14 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

1.2.15 เครื่องกวนผสมด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

1.2.16 เครื่องผสม (vortex mixer)

1.2.17 เครื่องดูดอากาศ (suction stirrer)

1.2.18 เครื่องชั่งแบบละเอียด (scales)

1.2.19 เตาไมโครเวฟ (microwave)

1.2.20 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวนอน (BIO-RAD, U.S.A.) และชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวตั้ง (Sequi-Gen® GT, Sequencing cell ; BIO-RAD, U.S.A.)

1.2.21 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply ; BIO-RAD, U.S.A.)

1.2.22 Adjustable automatic pipettes และ yellow tip ขนาดต่าง ๆ

1.2.23 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml. และ Multi Ultra PCR Tube (Sorenson™ BioScience, Inc., U.S.A.) ขนาด 0.5 ml. และ 0.2 ml.

1.2.24 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Beck man รุ่น DU–7500)

1.2.25 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ โดยแสงยูวี (UV transilluminator, Bio–RAD Mini–Transilluminator)

1.2.26 กล้อง polaroid (Polaroid GelCam, U.K.) และฟิล์ม (Instant black & white film FP-3000B super speedy, FUJIFILM, Japan)

1.2.27 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

1.2.28 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บิกเกอร์ขนาดต่างๆ (beakers) ปิเปต (pipettes) กระบอกตวง (cylinder) ขวดรูปชมพู่ (flasks) แท่งแก้วคนสาร ฯลฯ

1.2.29 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ถุงมือ ปากคีบ ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร ถุงพลาสติก พลาสติกใสอย่างบาง ถาดพลาสติก กล่องโฟม กระบอกฉีดสาร กระดาษทิชชู่ กระดาษเทปใส กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipes EX-L, Kimberly-Clark, Canada) aluminium foil กระดาษติดฉลาก กรรไกร ไม้บรรทัด มีดคัตเตอร์ ฯลฯ

1.3 สารเคมี

1.3.1 Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)

1.3.2 Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)

1.3.3 Sodium chloride (NaCl)

1.3.4 Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

1.3.5 Tris [hydroxymerhyl] aminomethane (Tris)

1.3.6 2 – mercaptoethanol

1.3.7 Chloroform

1.3.8 Isoamyl alcohol

1.3.9 Isopropanol

1.3.10 Ethyl alcohol (EtOH)

1.3.11 Liquid nitrogen

1.3.12 RNase ONE^{TM} ribonuclease (Promege, U.S.A.)

1.3.13 Phenol

1.3.14 8 – hydroxy quinolone

1.3.15 Hydrochloric acid (HCl)

1.3.16 Sodium hydroxide (NaOH)

1.3.17 Sodium acetate (NH_4OAc)

1.3.18 Glacial acetic acid

1.3.19 Ethidium bromide

1.3.20 Bromophenol blue

1.3.21 Xylene cyanol FF

1.3.22 Sucrose

1.3.23 DNeasy™ Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)

1.3.24 AFLP™ Core Reagent Kit (GIBCO BRL™ LIFE TECHNOLOGIES, U.S.A.)

1.3.25 Reaction buffer (Promega, U.S.A.)

1.3.26 Magnesium chloride ($MgCl_2$) (Promega, U.S.A.)

1.3.27 Deoxyribonucleotide triphosphate ($dNTP_s$) (Promega, U.S.A.)

1.3.28 Primer (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)

1.3.29 *Taq* DNA polymerase (Promega, U.S.A.)

1.3.30 Mineral oil หรือ parafin

1.3.31 Acrylamind

1.3.32 N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)

1.3.33 Urea

1.3.34 Boric acid

1.3.35 N,N,N', N'-Tetramethylethylethylendiamine (TEMED)

1.3.36 Bind Silane

1.3.37 น้ำยาเคลือบกระจก (Clear view, Dietham Trading Co., Ltd, Thailand)

1.3.38 Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3 \bullet 5H_2O$)

1.3.39 Sodium carbonate (Na_2CO_3)

1.3.40 Silver nitrate ($AgNO_3$)

1.3.41 Ammonium persulfate (APS)

1.3.42 37% Formaldehyde (HCOH)

1.3.43 98% Formamide

1.3.44 Agarose (Promega, U.S.A.)

1.3.45 Agar

2. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

2.1 การศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วน ได้แก่ ใบ เปลือกผล เนื้อ และเมล็ด โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้

2.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

2.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ดของลำไยมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่ง จากนั้นห่อด้วย aluminium foil แล้วนำไปเก็บในตู้แช่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2.1.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของลำไย ได้แก่ ใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ดของลำไยพันธุ์ดอเชียงราย 13 โดยใช้ DNeasy™ Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังต่อไปนี้

- นำ buffer AP1 ไปอุ่นที่ 65°C ก่อนนำไปใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml.) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (µl.) เติม RNase ONE™ ribonuclease จำนวน 5 units/หลอด ใส่ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.1 กรัม (g.) ผสมอย่างแรงโดยใช้ vortex แล้วนำไปอุ่น (incubate) ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที พลิกหลอดกลับไปกลับมา (inversion) เบาๆ ทุกๆ 2-3 นาที
- เติม AP2 ปริมาตร 130 µl. พลิกหลอดกลับไปกลับมา แล้วนำไป incubate ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว (centrifuge) 12,000 rpm ใช้เวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่ลงในหลอด QIAshredder spin column นำไป centrifuge 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายที่ได้ใส่หลอด eppendorf ใหม่
- เติม AP3/E ปริมาตร 675 µl แล้ว inverse จนแน่ใจว่าสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ดึงมาปริมาตร 650 µl ใส่ลงใน DNeasy mini spin column ไป centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เติม buffer AW ปริมาตร 500 µl นำไป centrifuge 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

- เติม buffer AE (incubate 65°C ก่อนนำมาใช้) ปริมาตร 20 µl incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เปลี่ยนหลอดที่ใช้เก็บสารละลายใหม่ก่อนนำไป centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อความแน่ใจว่าเก็บสารละลายได้หมด ให้เติม buffer AE แล้วทำซ้ำอีกรอบ แต่ incubate ที่อุณหภูมิห้องใช้เวลานานขึ้นเป็น 10 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บอุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.1.1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (อาภัสสรา, 2537) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร (nm.) แล้วคำนวณหาความเข้มข้น และปรับให้เจือจางได้ปริมาณความเข้มข้นที่พอเหมาะกับการทำการทดลองขั้นต่อไป

2.1.2 ปฏิกิริยา HAT-RAPD

2.1.2.1 การเลือกใช้ไพรเมอร์

สุ่มใช้ arbitary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จาก Operon Technology, Alamada, U.S.A. จำนวน 3 ไพรเมอร์

ตาราง 2 แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT–RAPD กับเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของลำไย

รายชื่อ primers	Sequence 5' - 3'
1. OPAT 05	ACA CCT GCC A
2. OPG 13	CTC TCC GCC A
3. OPH 13	GAC GCC ACA C

2.1.2.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

ใส่สารละลายปริมาตร 20 µl. ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml. ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris–HCI pH 8.8, 50 mM KCI, 0.1% TritonX-100), 2 mM $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) อย่างละ 200 µM, ไพรเมอร์ 50-100 ng. *Tag* DNA polymerase 0.5 unit/reaction และดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) 10-25 ng หลังจากนั้นนำ Multi Ultra PCR Tube ที่บรรจุสารละลายใส่ในเครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400)

2.1.2.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition)

ปฏิกิริยา PCR ดัดแปลงตามวิธีการของ Newton and Graham (1994) ตามสภาวะเงื่อนไขดังต่อไปนี้

94°C	2 min	
94°C	30 sec	┐
46°C	30 sec	├── 30 รอบ
72°C	45 sec	┘
72°C	5 min	
4°C	α	

2.1.3 agarose gel electrophoresis

2.1.3.1 การเตรียมแผ่น agarose gel

- เตรียม agarose ให้มีความเข้มข้น 2% โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1xTAE buffer ต้มจน agarose ละลาย

- ทำความสะอาด gel ขนาด 15x20 cm. และหวีเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70% ethyl alcohol แล้วใช้เทปพลาสติกใสปิดขอบถาดทั้ง 2 ด้าน

- วางหวีเสียบลงที่ปลายข้างหนึ่งของถาด gel เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) และเมื่อ agarose แข็งตัว จะมีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลงไป

- เท agarose ที่หลอมละลายแล้วลงในถาด gel ที่เตรียมไว้ โดยให้แผ่น agarose gel มีความหนาประมาณ 3-5 mm. ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

- เมื่อ agarose gel แข็งตัวแล้ว ดึงหวีเสียบออก จากนั้นนำ TAE buffer มาเททับให้ agarose gel เปียกไว้ (soak gel) เพื่อป้องกันให้ไม่ให้แห้งเกินไปและสะดวกในการดึงหวีเสียบออกได้ง่าย

2.1.3.2 การวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis

- นำแผ่น agarose gel ที่เตรียมไว้วางลงในอ่าง (tank) อิเล็กโทรโฟรีซีสโดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ

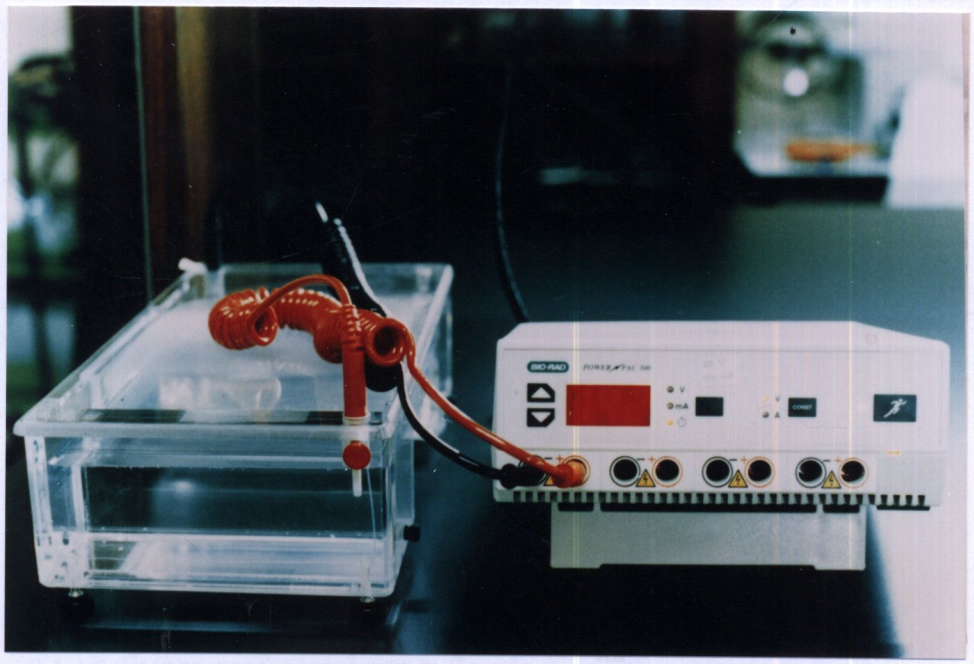
- เท 1x TAE buffer ที่ผสม ethidium bromide จำนวน 1 μg /ml ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel (แผ่น agarose gel อยู่ใต้ TAE buffer ประมาณ 1-3 mm.) เพื่อให้สามารถมองเห็น

แถบดีเอ็นเอที่ติดสีของ ethidium bromide เมื่อนำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

- ผสม loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องของ agarose gel ที่เตรียมไว้ก่อนแล้ว

- ปิดฝาอ่าง (lid) และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 60 v กระแสไฟฟ้า 150 mA ใช้เวลาปล่อยกระแสไฟฟ้า 3-4 ชั่วโมง หรือเมื่อสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose gel จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

- นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพไว้



ภาพ 3 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวนอน

2.1.4 ปฏิกิริยา AFLP

2.1.4.1 การเลือกใช้ไพรเมอร์

สุ่มเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ ความยาว 19-21 nucleotide จากชุด AFLP™ Core Reagent Kit (GIBCO BRL™ LIFE TECHNOLOGIES, U.S.A.) จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์

ตาราง 3 แสดงลำดับเบสของ adapter และคู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR I และ PCR II ของเทคนิค AFLP กับเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของลำไย

	Sequence
Digestion/Ligation	
*Eco*R I adapter	5'- CTCGTAGACTGCGTACC – 3'
	3'– CATCTGACGCATGGTTAA – 5'
Mse I – adapter	5'– GACGATGAGTCCTGAG – 3'
	3' – TACTCAGGACTCAT – 5'
Selective primers (+1) และ Amplified primers (+3)	
*Eco*R I primer	CORE ENZ EXT
*Eco*R I + 1	5'- GACTGCGTACC AATTC A – 3'
*Eco*R I + 3	E + AAG
	E + ACT
	E + AGG
Mse I primer	CORE ENZ EXT
Mse I + 1	5'- GATGAGTCCTGAG TAA C – 3'
Mse I + 3	M + CAG
	M + CTA
	M + CTT

2.1.4.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ AFLP ดัดแปลงตามวิธีการของ Vos *et al.* (1995)

2.1.4.2.1 Digestion/Ligation genomic DNA

- การตัด genomic DNA ด้วย 2 restriction enzymes (AFLP Core Reagent Kit)

ใช้ genomic DNA ที่มีความเข้มข้น 60-100 ng. ปริมาตร 3 µl ตัดด้วย restriction enzymes คือ *Eco*RI/*Mse*I (ที่มีความเข้มข้นของแต่ละ restriction enzymes ใช้ 1.25 units/µl. ซึ่ง

ผสมอยู่ใน 10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM Nacl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 50%(v/v) glycerol, 0.1% Triton® X-100) ปริมาตร 0.5 µl, 5x reaction buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM Mg-acetate, 250mM K-acetate) ปริมาตร 1.25 µl, และ distilled water ปริมาตร 1.5 µl incubate ที่ 37°C ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะตัดได้สมบูรณ์ นำมาตรวจสอบด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis แล้วหยุดการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที

- การต่อเชื่อมด้วย adaptor

นำชิ้นส่วนที่ถูกตัดได้สมบูรณ์แล้วมาต่อเชื่อมกับ adapter ตามปฏิกิริยา โดยมีส่วนประกอบคือ adapter/ligase solution (*Eco*RI/*Mse*I adapters, 0.4mM ATP, 10mM Tric-HCl pH 7.5, 10mM Mg-acetate, 50mM K-acetate) ปริมาตร 6 µl, T_4 DNA ligase (1 unit/µl ซึ่งอยู่ในสารละลายที่มี 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, 50mM KCl, 50% glycerol (v/v)) ปริมาตร 0.5 µl, และสารละลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดสมบูรณ์ทั้งหมด 6.25 µl นำไป incubate ที่ 20°C ± 2 เป็นเวลานาน 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้สารละลายเจือจาง 10 เท่า (v/v)

2.1.4.2.2 preselective amplified PCR หรือ PCR I

การเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีจำนวนเบสจำเพาะเจาะจงเพียงตำแหน่งเดียวในแต่ละปลายของ fragment (ซึ่งถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และมี adapter มาต่อเชื่อมแล้ว) โดยมีองค์ประกอบ คือ สารละลายของชิ้นส่วนที่ถูกตัดและต่อเชื่อมกับ adapter ทำให้เจือจางแล้วมาใช้ปริมาตร 2 µl, pre-amp primer mix 6 µl, 10x reaction buffer plus Mg (200mM Tris-HCl pH 8.4, 15mM $MgCl_2$, 500mM KCl) ปริมาตร 1 µl, distilled water 10.9 µl, และ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.1 µl (5 units/µl), หยอด mineral oil ปิดทับสารละลายป้องกันการระเหย หลังจากนั้นนำ Multi Ultra PCR Tube ที่บรรจุสารละลายใส่ในเครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400) หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว สารละลายที่ได้ทำให้เจือจาง 50 เท่า ก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR II

2.1.4.2.3 selective amplified PCR หรือ PCR II

จาก preselective amplified PCR หรือ PCR I ต้องนำมาทำปฏิกิริยาอีกครั้งโดยสุ่มเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีเบสจำเพาะเจาะจงเพิ่มขึ้นเป็น 3 ตำแหน่ง โดยมีองค์ประกอบ คือ สารละลายจาก PCR I ที่เจือจางแล้วปริมาตร 2 µl, *Eco*RI primer (27.8 ng/µl) ปริมาตร 0.5 µl, *Mse*I primer (6.7 ng/µl, dNTPs) ปริมาตร 2.25 µl, 10x reaction buffer (200mM Tris-HCl pH 8.4, 15mM $MgCl_2$, 500mM KCl) ปริมาตร 1 µl, distilled water 4.5 µl, และ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.05 µl (5 units/µl) หยอด mineral oil ปิดทับสารละลายป้องกันการระเหย จากนั้นนำ Multi Ultra PCR Tube ที่บรรจุสารละลายใส่ในเครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR

system 2400) หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วก็นำมาผสมกับ DNA sequencing stop solution (98% formamide, 0.001% bromophenol blue, 0.001% xylene cyanol FF, 10mM EDTA pH 8.0) แล้วไปวิเคราะห์ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 4.5% ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 1200-1500 v กระแสไฟฟ้า 300 mA ใช้เวลาปล่อยกระแสไฟฟ้าประมาณ 1-2 ชั่วโมง หรือเมื่อสีของ DNA sequencing stop solution (formamide dye) เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น polyacrylamide gel จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

2.1.4.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition)

ปฏิกิริยา selective PCR หรือ PCR I ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้

94°C	30 sec	
56°C	60 sec	30 รอบ
72°C	60 sec	
4°C	α	

ปฏิกิริยา amplified PCR หรือ PCR II ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้

94°C	30 sec	
65°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
64°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
63°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
62°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	

94°C	30 sec	
61°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
59°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
58°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
57°C	30 sec	2 รอบ
72°C	60 sec	
94°C	30 sec	
56°C	30 sec	25 รอบ
72°C	60 sec	
4°C	α	

2.1.5 polyacrylamide gel electrophoresis

2.1.5.1 การเตรียม polyacrylamide gel

- เตรียม polyacrylamide เข้มข้น 4.5% (ภาคผนวก) เตรียมกระจกทั้ง 2 ด้านล้างให้สะอาดและเช็ดให้แห้งโดยใช้กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipes EX-L) แล้วเช็ดด้วย 70% ethanol alcohol อีกครั้ง ปล่อยให้แห้ง

- เช็ดกระจกด้าน IPC (Integral Plate/Chamber) ด้วยน้ำกลั่นเช็ดให้แห้ง หยดน้ำยาเคลือบกระจก (clear view) แล้วเช็ดให้ทั่ว ใช้สารเคลือบป้องกันไม่ให้เนื้อ gel มาติดกับกระจกด้านนี้ เก็บกระจกส่วนนี้ไว้ก่อนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนกับสารละลายที่จะใช้กับกระจกอีกด้านหนึ่ง

- นำกระจกด้านที่จะให้ polyacrylamide gel ติดแน่น มาเช็ดด้วย 70% ethanol alcohol รอให้แห้ง จึงผสม bind silane ปริมาตร 1.5 µl. กับ 95% ethanol alcohol ปริมาตร 1 ml เช็ดบนกระจกให้ทั่วๆ เช็ดซ้ำด้วย 70% ethanol alcohol อีก 2-3 รอบจนแน่ใจว่าทั่วทั้งแผ่นกระจก

- ประกบตัวกระจกทั้งสองโดยวาง spacers ไว้ตรงกลางระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่นที่ขอบทั้ง 2 ด้านของกระจก ประกอบกระจกให้แน่นด้วยที่ยึด เพื่อไม่ให้กระจกไม่เขยื้อนเวลาจับ

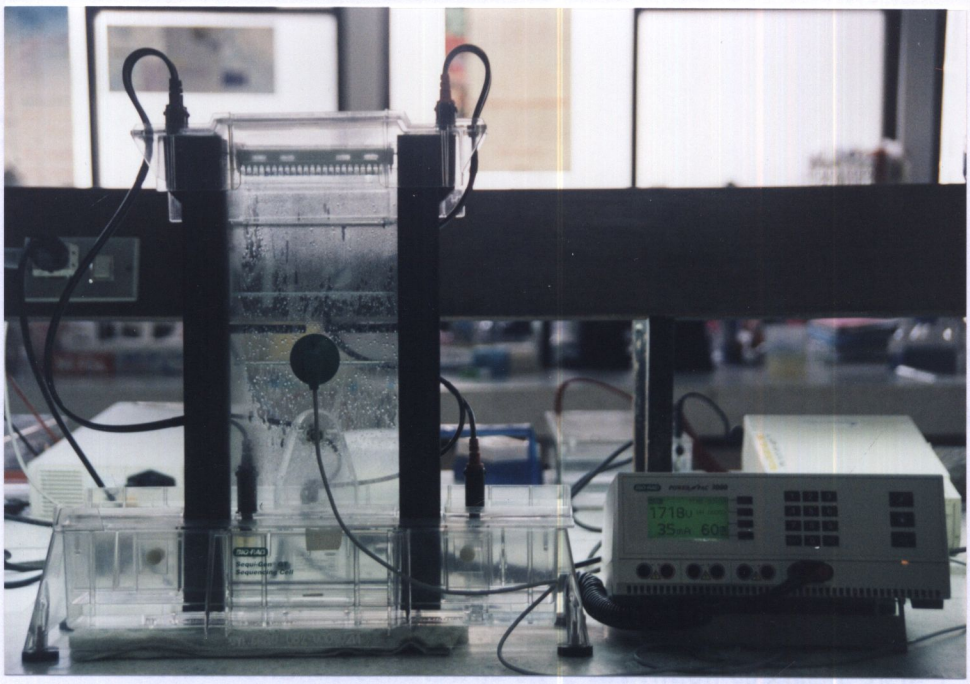
- นำ 4.5% polyacrylamide ปริมาตร 50 ml มาผสมกับ TEMED ปริมาตร 50 µl. และเติม 10% APS ปริมาตร 300 µl. ผสมให้เข้ากันแล้วเทในแนวระนาบ หรือใช้กระบอกฉีดสาร(syringe) ฉีดเข้าไปช้าๆ สอด comb ด้านเรียบเข้าไปในเนื้อ gel เพื่อให้เป็นช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใช้

2.1.5.2 การ pre-run gel และการวิเคราะห์โดย gel electrophoresis

- นำชุดกระจกที่มี polyacrylamide gel แข็งตัวเรียบร้อยมาประกอบกับตัวเครื่องอุปกรณ์ gel electrophoresis ชนิดแนวตั้ง เท 1xTBE buffer ลงใน Chamber ให้ท่วมระดับขอบกระจกที่ประกบกัน ทิ้งไว้สักครู่ให้ buffer ซึมลงในเนื้อ gel แล้วถอด comb ออก ล้างเอาเศษชิ้นส่วนของ gel ออกจากช่องทำให้หยอดตัวอย่างได้ง่ายขึ้น

- ต่อขั้วสายไฟและปรับอุณหภูมิเป็น 50°C โดยใช้กระแสไฟ 50 watt นานประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้น denaturation ดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที เตรียมเพื่อหยอดตัวอย่าง

- หยอดตัวอย่างลงในช่อง เมื่อหยอดจนครบทุกตัวอย่างแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปใน polyacrylamide gel จนสีแรกเคลื่อนไปจนสุดความยาวกระจก จึงปิดเครื่องส่งกระแสไฟฟ้า (power supply)



ภาพ 4 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวตั้ง

2.1.6 การย้อมด้วย silver nitrate

- หลังจากปิดเครื่องส่งกระแสไฟฟ้าเสร็จแกะกระจกที่ประกบออกจากกัน อย่าให้เนื้อ gel ฉีดออกจากกัน แล้วนำแผ่นกระจกที่มี gel ติดอยู่ มาใส่ใน fixer solution (ภาคผนวก) พร้อมเขย่าเบาๆ ประมาณ 20 นาที ต่อจากนั้นล้าง DNA sequencing stop solution และตะกอนของ urea ออก ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที เพื่อล้าง acetic acid ออกให้หมด

- นำกระจกที่มี gel ติดอยู่มาลงแช่ใน silver staining solution นาน 30 นาที แล้วนำไปล้างผ่านน้ำไม่เกิน 10 วินาที จากนั้นนำไปแช่ใน developer solution เขย่าจนแถบดีเอ็นเอปรากฏให้เห็นชัดเจน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเทผสม fixer solution กับ developer solution ที่เขย่าอยู่ก่อนแช่นาน 2-5 นาที เทออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้ทั่วถึงใช้เวลาอย่างน้อย 5 นาที

- ปล่อยให้ gel แห้ง บันทึกภาพไว้

2.1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจดูความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบระหว่างแต่ละเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ด ทั้งเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP

2.2 การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลำไย 9 พันธุ์ ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลำไย 9 พันธุ์ โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้

2.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

2.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำใบอ่อนของลำไยทั้ง 9 พันธุ์มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่ง จากนั้นห่อด้วย aluminium foil แล้วนำไปเก็บในตู้แช่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนใบอ่อนของลำไย 9 พันธุ์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) มีวิธีการดังต่อไปนี้

- นำตัวอย่างใบลำไยที่บดละเอียดประมาณ 0.1 g ใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml. เติม extraction buffer [4% (w/v) CTAB, 1% (w/v) PVPP, 100mM Tris–HCI pH8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCI, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol] ปริมาตร 400 µl. ผสมกันโดยใช้ vortex แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 60 นาที
- นำไป centrifuge 12,000 rpm. ใช้เวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่หลอด eppendorf ใหม่
- สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) เพื่อให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้นโดยเติม chlorlform : isoamyl alcohol 1 เท่า (v/v) ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ แล้วนำไป centrifuge 12,000 rpm. ใช้เวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supermatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol อีกรอบจนได้สารละลายใส
- ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 1 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70°C ใช้เวลา 2 ชั่วโมง หรือ -20°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน
- นำไป centrifuge 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethyl alcohol แล้วนำมาผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องโดยคว่ำหลอด eppendorf วางบนกระดาษทิชชู่
- ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 µl. เขย่าเบาๆ ให้ตะกอนละลายหมดแล้วเติม RNase ONE™ ribonuclease จำนวน 5 units/หลอด นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

- สกัดด้วย phenol เพื่อให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้น โดยเติม phenol 1 เท่า (v/v) ลงในหลอดที่มีสารละลายดีเอ็นเออยู่ ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ แล้วนำไป centrifuge 12,000 rpm. ใช้เวลา 5 นาที ดูดเอา supermatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย phenol จนได้สารละลายใส
- สกัด phenol ออกด้วย chloroform โดยเติม chloroform 1 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ แล้วนำไป centrifuge 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอา supernatant ออกมาใส่หลอดใหม่
- ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 1 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70°C ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง หรือ -20°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน
- นำไป centrifuge 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethyl alcohol จากนั้นผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 µl. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2.1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (อาภัสสรา, 2537) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร (nm.) *คำนวณหาความเข้มข้นและปรับเจือจางให้ได้ปริมาณความเข้มข้น* ที่พอเหมาะกับการทำการทดลองขั้นต่อไป

2.2.2 ปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค HAT-RAPD มีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับ ข้อ 2.1.2 โดยในข้อ 2.1.2.1 มีการเลือกใช้ 6 ไพรเมอร์ (ตางราง 3) นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลำไย 9 พันธุ์

ตาราง 4 แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT – RAPD กับลำไย 9 พันธุ์

รายชื่อ primers	Sequence 5' - 3'
1. OPAK 10	CAA GCG TCA C
2. OPAK 14	CTG TCA TGC C
3. OPAS 10	CCC GTC TAC C
4. OPD 20	ACC CGG TCA C
5. OPG 13	CTC TCC GCC A
6. OPH 13	GAC GCC ACA C

ปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค AFLP มีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับข้อ 2.1.4 โดยมีข้อย่อย 2.1.4.1 ของการเลือกใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ (ตาราง 4) นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลำไย 9 พันธุ์

ตาราง 5 แสดงลำดับเบสของ adapter และคู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR I และ PCR II ของเทคนิค AFLP

	Sequence
Digestion/Ligation	
*Eco*R I adapter	5'- CTCGTAGACTGCGTACC – 3'
	3'– CATCTGACGCATGGTTAA – 5'
Mse I – adapter	5'– GACGATGAGTCCTGAG – 3'
	3' – TACTCAGGACTCAT – 5'
Selective primers (+1) และ Amplified primers (+3)	
*Eco*R I primer	CORE ENZ EXT
*Eco*R I + 1	5'- GACTGCGTACC AATTC A – 3'
*Eco*R I + 3	E + ACT
Mse I primer	CORE ENZ EXT
Mse I + 1	5'- GATGAGTCCTGAG TAA C – 3'
Mse I + 3	M + CAT

ปฏิกิริยา PCR ของทั้ง 2 เทคนิค หลังจากเลือกใช้ไพรเมอร์ และปฏิบัติตามขั้นตอนของข้อ 2.1.2 ถึงข้อ 2.1.6

2.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.2.3.1 เปรียบเทียบแต่ละแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และในแต่ละพันธุ์ของลำไย โดยนำมาเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานของ marker

2.2.3.2 ตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏแถบดีเอ็นเอ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไยแต่ละพันธุ์ ซึ่งการบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือการปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ในแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างลำไยแต่ละพันธุ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS โดยวิเคราะห์ด้วย cluster analysis และแสดงความสัมพันธ์ลำไยด้วยวิธี UPGMA เพื่อเสนอเป็น dendrogram

2.3 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับข้อ 2.2 โดยปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค HAT-RAPD มีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับ ข้อ 2.1.2 โดยในข้อ 2.1.2.1 มีการเลือกใช้ 10 ไพรเมอร์ (ตางราง 6) บันทึกภาพเก็บไว้ และการวิเคราะห์ข้อมูลเหมือนกับข้อ 2.2.3

ตาราง 6 แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT–RAPD กับลำไย 20 พันธุ์

รายชื่อ primers	**Sequence 5' - 3'**
1. OPA 13	CAG CAC CCA C
2. OPAK 10	CAA GCG TCA C
3. OPB 18	CCA CAG CAG T
4. OPG 13	CTC TCC GCC A
5. OPT 15	GGA TGC CAC T
6. OPW 06	CTG GGC ACG A
7. OPW 09	CAG ACA AGC C
8. OPX 01	CTG GGC ACG A
9. OPX 15	CAG ACA AGC C
10. OPZ 01	TCT GTG CCA C

3. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการอนูชีวโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

4. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

มีนาคม 2542 - สิงหาคม 2544

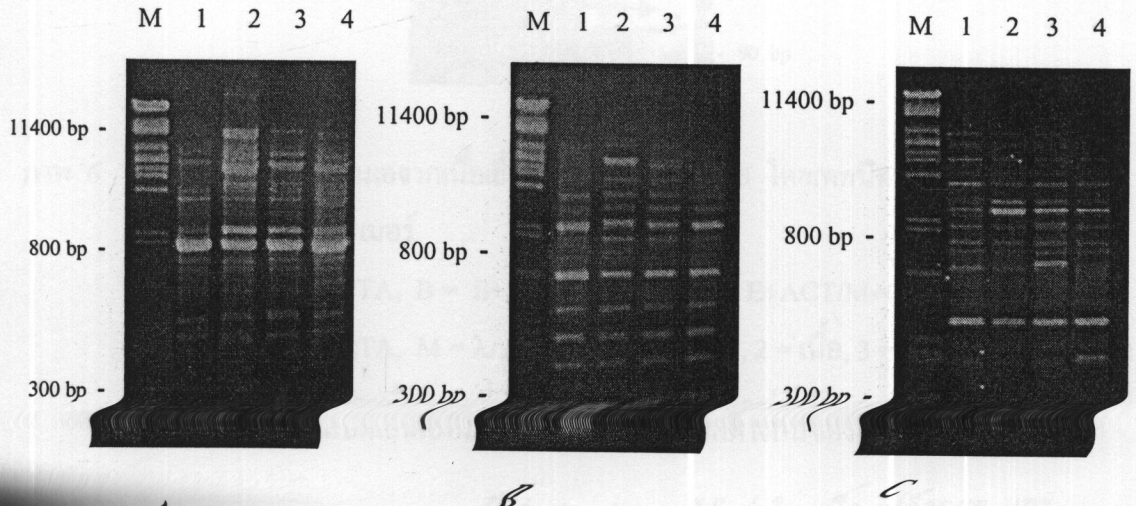
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย

การศึกษานี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในแต่ละเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของลำไย เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างเนื้อเยื่อจากส่วนใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ด และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

จากการทดลอง โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ OPAT05 OPG13 และ OPH13 (ภาพ 5) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ คือ ใบอ่อน เนื้อ เปลือกผล และเมล็ด โดยที่ไพรเมอร์ OPAT05 เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ ไพรเมอร์ OPG13 เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ และไพรเมอร์ OPH13 เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ ไม่พบว่ามีความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิด ด้วยการใช้ทั้ง 3 ไพรเมอร์ แต่จะมีความคมชัด (intensity) และความหนาแน่น (density) ของแถบดีเอ็นเอ ในแต่ละชนิดของเนื้อเยื่อมีไม่เท่ากัน



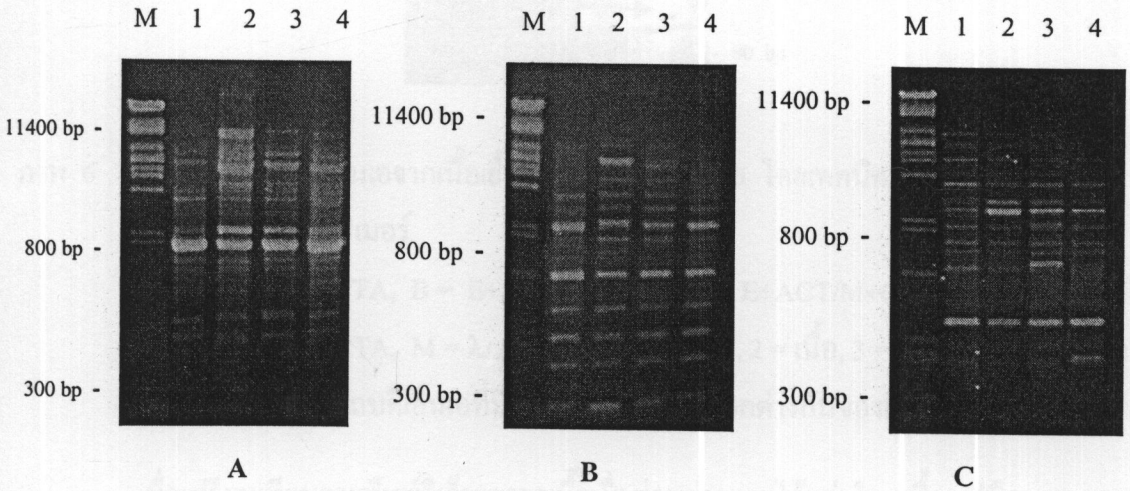
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย

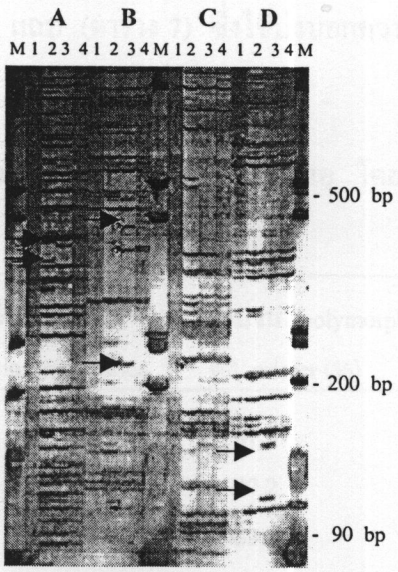
การศึกษานี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในแต่ละเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของลำไย เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างเนื้อเยื่อจากส่วนใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ด และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

จากการทดลอง โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ OPAT05 OPG13 และ OPH13 (ภาพ 5) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ คือ ใบอ่อน เนื้อ เปลือกผล และเมล็ด โดยที่ไพรเมอร์ OPAT05 เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ ไพรเมอร์ OPG13 เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ และไพรเมอร์ OPH13 เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ ไม่พบว่ามีความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิด ด้วยการใช้ทั้ง 3 ไพรเมอร์ แต่จะมีความคมชัด (intensity) และความหนาแน่น (density) ของแถบดีเอ็นเอ ในแต่ละชนิดของเนื้อเยื่อมีไม่เท่ากัน



ภาพ 5 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย โดยเทคนิค HAT-RAPD
A = ไพรเมอร์ OPAT05, B = ไพรเมอร์ OPG13, C = ไพรเมอร์ OPH13
M = λ/*Pst* I marker , 1 = ใบอ่อน, 2 = เนื้อ, 3 = เมล็ด, 4 = เปลือกผล

จากการทดลอง โดยเทคนิค AFLP โดยการใช้ 4 คู่ไพรเมอร์ คือ E+AAG/M+CTA E+ACT/M+CAG E+AGG/M+CTA และ E+AGG/M+CTT (ภาพ 6) พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ คือ ใบอ่อน เนื้อ เปลือกผล และเมล็ด โดยที่ไพรเมอร์ E+AAG/M+CTA เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมากกว่า 100 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 7 แถบ ไพรเมอร์ E+ACT/M+CAG เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมากกว่า 100 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 5 แถบ ไพเมอร์ E+AGG/M+CTA เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมากกว่า 100 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 3 แถบ ไพรเมอร์ E+AGG/M+CTT เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมากกว่า 100 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลที่มีความแตกต่างกัน 6 แถบ



ภาพ 6 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย โดยเทคนิค AFLP ด้วยการใช้ 4 คู่ไพรเมอร์

A = E+AAG/M+CTA, B = E+AGG/M+CTT, C = E+ACT/M+CAG,

D = E+AGG/M+CTA, M = λ/ *Pst* I marker, 1 = ใบ, 2 = เนื้อ, 3 = เปลือกผล, 4 = เมล็ด

→ ยกตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันของเนื้อเยื่อต่างชนิด

เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ เนื้อ เปลือกผล และเมล็ด ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และเทคนิค AFLP พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 3 ไพรเมอร์ ไม่พบความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิด แต่จากเทคนิค AFLP โดยการใช้ 4 คู่ไพรเมอร์ พบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิด มีจำนวนทั้งหมด 21 แถบ

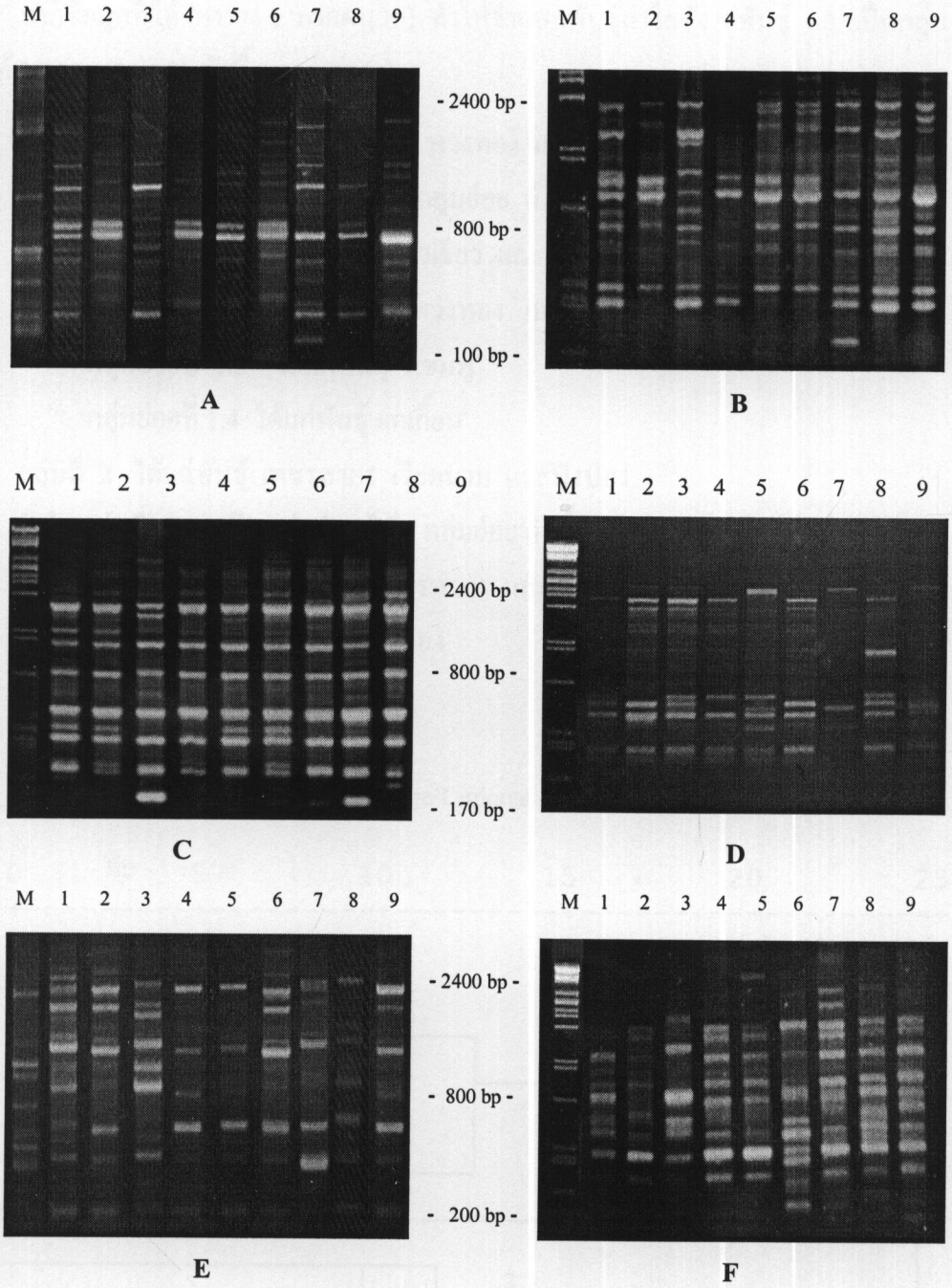
2. การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลำไย 9 พันธุ์ ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP

การศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลำไย 9 พันธุ์ ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP นี้มีจุดประสงค์ เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างของผลจากการวิเคราะห์ ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP เป็นข้อมูลเบื้องต้น ที่จะได้ไปสนับสนุนการจำแนกพันธุ์ลำไยของนักอนุกรมวิธาน และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค HAT-RAPD โดยการใช้ 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPAK10 OPAK14 OPAS10 OPD20 OPG13 และ OPH13 (ภาพ 7) พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 172 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 150-2,700 คู่เบส และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 123 แถบ (ตาราง 7) ซึ่งใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของลำไยทั้ง 9 พันธุ์ได้

ตาราง 7 แสดงรายชื่อของไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 9 พันธุ์

รายชื่อ primers	bands ทั้งหมด	การเก็บข้อมูล polymorphic bands	จำนวน polymorphic ต่อ primer (%)	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล ของ bands ที่เกิด (bp)
1. OPAK 10	24	21	87.5	250 – 2,300
2. OPAK 14	36	17	47.2	150 – 2,700
3. OPAS 10	33	23	69.7	200 – 2,700
4. OPD 20	21	14	76.2	170 – 2,200
5. OPG 13	28	23	82.1	200 – 2,400
6. OPH 13	30	23	76.7	300 – 2,500
Total	172	123		



ภาพ 7 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 9 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 6 ไพรเมอร์

A = ไพรเมอร์ OPAK10, B = ไพรเมอร์ OPAK14 , C = ไพรเมอร์ OPAS10, D = ไพรเมอร์ OPD20, E = ไพรเมอร์ OPG13 และ F = ไพรเมอร์ OPH13

M = ladder marker, 1 = เพชรสาคร, 2 = พวงทอง , 3 = ปิงปอง, 4 = เบี้ยวเขียว, 5 = แห้ว, 6 = สีชมพู, 7 = ฮกเกี้ยน , 8 = เวียดนาม และ 9 = ลิ้นจี่

จากข้อมูลที่ได้ (ตาราง 1 ภาคผนวก) ทำให้จำแนกพันธุ์ลำไยทั้ง 9 พันธุ์ ออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม (ภาพ 8) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่พันธุ์เบี้ยวเขียว ลิ้นจี่ พวงทอง แห้ว สีชมพู และฮกเกี้ยน

ในกลุ่มที่ 1 แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้ 4 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่พันธุ์เบี้ยวเขียว และพันธุ์ลิ้นจี่

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และแห้ว

กลุ่มย่อยที่ 1.3 ได้แก่พันธุ์ สีชมพู

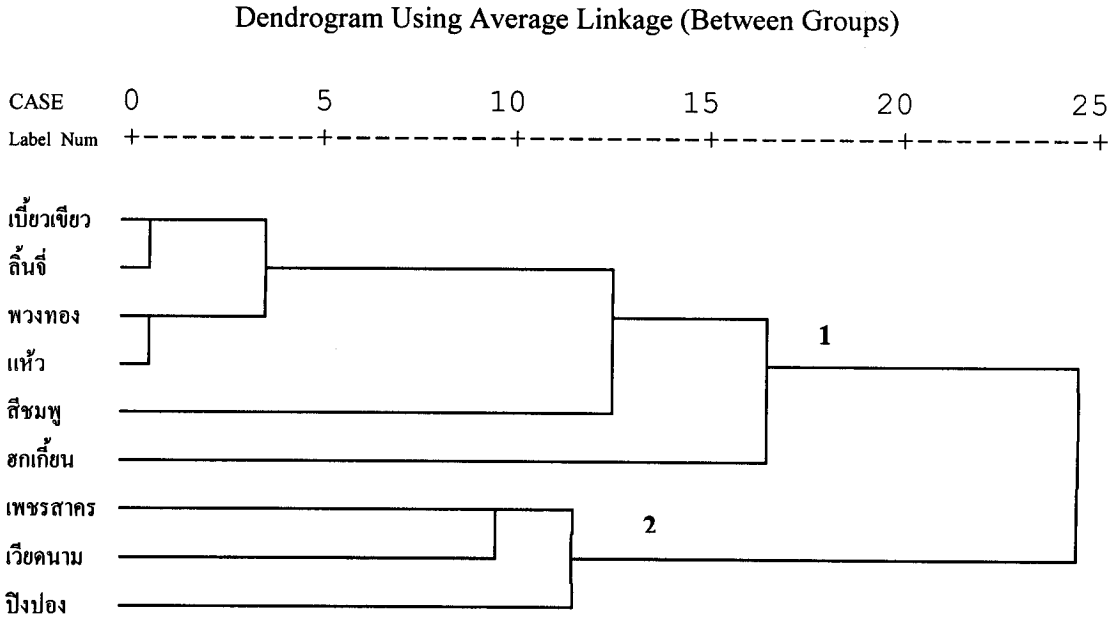
กลุ่มย่อยที่ 1.4 ได้แก่พันธุ์ ฮกเกี้ยน

กลุ่มที่ 2 ได้แก่พันธุ์ เพชรสาคร เวียดนาม และปิงปอง

ซึ่งในกลุ่มที่ 2 แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้ 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

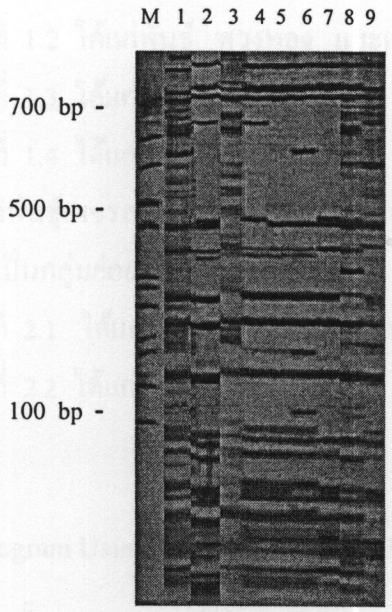
กลุ่มย่อยที่ 2.1 ได้แก่พันธุ์เพชรสาคร และพันธุ์เวียดนาม

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ได้แก่พันธุ์ปิงปอง



ภาพ 8 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 9 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 6 ไพรเมอร์

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมากกว่า 200 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50-800 คู่เบส และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 51 แถบ (ตาราง 5) ซึ่งใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลำไยทั้ง 9 พันธุ์ได้



ภาพ 9 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 9 พันธุ์ โดยเทคนิค AFLP
ด้วยการใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ คือ E+ACT/M+CAT
M = ladder marker, 1 = เพชรสาคร, 2 = พวงทอง , 3 = ปิงปอง, 4 = เบี้ยวเขียว,
5 = แห้ว, 6 = สีชมพู, 7 = ฮกเกี้ยน , 8 = เวียดนาม และ 9 = ลิ้นจี่

ตาราง 8 แสดงลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค AFLP กับลำไย 9 พันธุ์

primers combinations	sequence 5' - 3'	bands ทั้งหมด	polymorphic	ช่วงน้ำหนักโมเลกุลของ bands ที่เกิด (bp.)
E+ACT/ M+CAT				
5'- GACTGCGTACC AATTC ACT – 3'				
5'- GATGAGTCCTGAG TAA CAT – 3'		> 200	51	50 - 800

จากข้อมูลที่ได้ (ตาราง 2 ภาคผนวก) ทำให้จำแนกพันธุ์ลำไยทั้ง 9 พันธุ์ ออกเป็นกลุ่ม ได้ 2 กลุ่ม (ภาพ 10) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่พันธุ์ แห้ว สีชมพู พวงทอง เบี้ยวเขียว ฮกเกี้ยน และลิ้นจี่

ในกลุ่มที่ 1 แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้ 4 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่พันธุ์ แห้ว และสีชมพู

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และเบี้ยวเขียว

กลุ่มย่อยที่ 1.3 ได้แก่พันธุ์ ฮกเกี้ยน

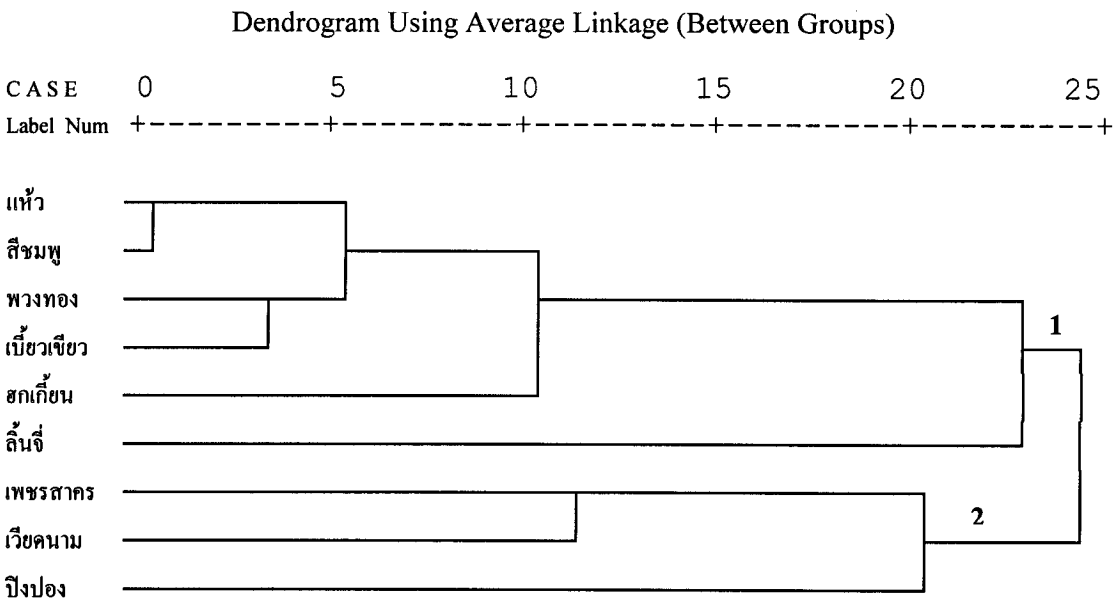
กลุ่มย่อยที่ 1.4 ได้แก่พันธุ์ ลิ้นจี่

กลุ่มที่ 2 ได้แก่พันธุ์เพชรสาคร พันธุ์เวียดนาม และพันธุ์ปิงปอง

ในกลุ่มที่ 2 ยังเป็นกลุ่มย่อย ได้ 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ได้แก่พันธุ์เพชรสาคร และพันธุ์เวียดนาม

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ได้แก่พันธุ์ปิงปอง

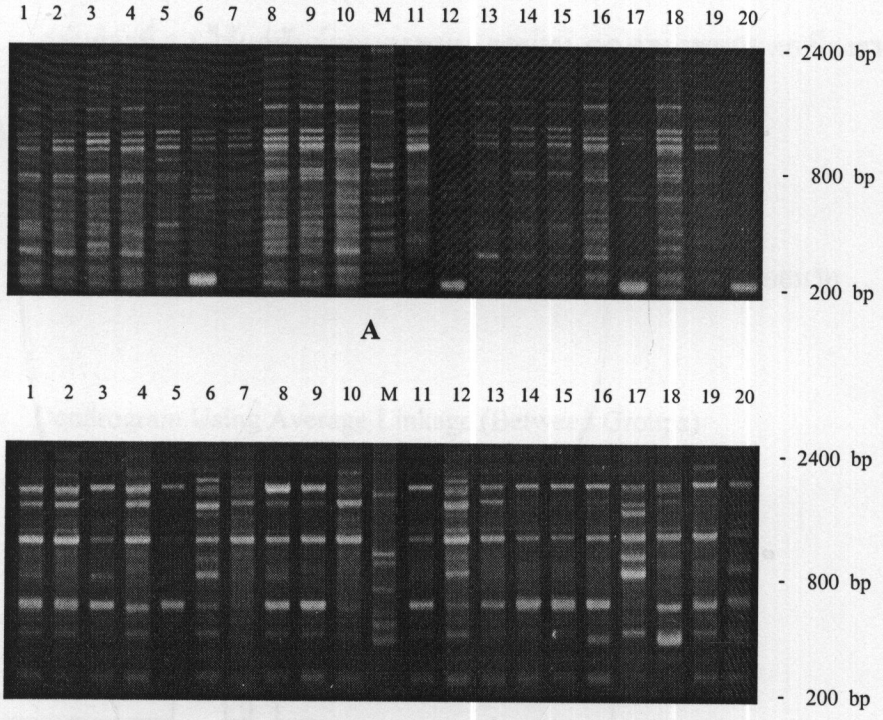


ภาพ 10 แสดงความสัมพันธ์ของลำไยทั้ง 9 พันธุ์ โดยเทคนิค AFLP ด้วยการใช้ 1 คู่ ไพรเมอร์ คือ E+ACT/M+CAT

3. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ นี้มีจุดประสงค์ เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในแต่ละพันธ์ และสายพันธุ์ของลำไยทั้งหมดที่ทำการทดลอง เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อสนับสนุนการจัดจำแนกพันธุ์ลำไยของนักอนุกรมวิธาน และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

การวิเคราะห์พันธุกรรมของพันธุ์ลำไย ด้วยการใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยเตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อนของลำไย 20 พันธุ์ พบว่า การวิเคราะห์แยกแต่ละไพรเมอร์ ทำให้จำแนกพันธุ์ลำไยทั้ง 20 พันธุ์ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดได้ดังนี้



ภาพ 11 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPA13(A) และ OPG13(B)

M = ladder marker, 1 = ดอ, 2 = สีชมพู, 3 = เบี้ยวเขียว, 4 = พวงทอง, 5 = ดอเชียงราย 13, 6 = นราภิรมย์, 7 = ดอน่าน, 8 = ลิ้นจี่, 9 = กะทิ, 10 = พวงทอง 05, 11 = แห้ว, 12 = เพชรสาคร, 13 = ดอห้างฉัตร 46, 14 = ดอลำพูน 01, 15 = ดอนครพนม, 16 = ดอหลวง, 17 = ปิงปอง, 18 = ฮกเกี้ยน, 19 = สุขุม และ 20 = เวียดนาม

จากภาพ 11(A) แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการใช้ HAT-RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPA13 ซึ่งเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 35 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-2,400 คู่เบส เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 24 แถบ ทำให้จำแนกความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพ 12) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่พันธุ์ เพชรสาคร เวียดนาม นราภิรมย์ และปิงปอง

กลุ่มที่ 2 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง พวงทอง05 ดอห้างฉัตร46 ดอหลวง เบี้ยวเขียว กะทิ และฮกเกี้ยน

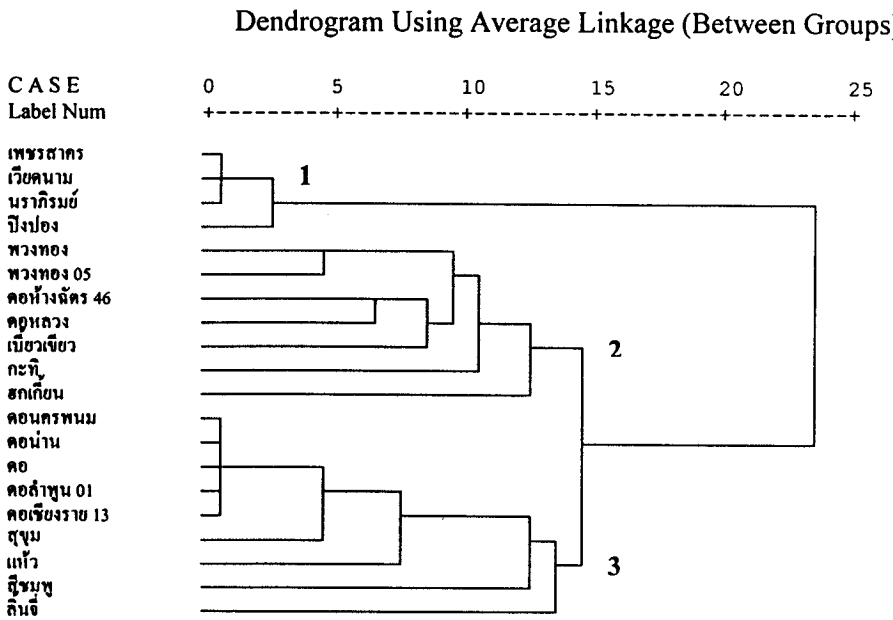
กลุ่มที่ 3 ได้แก่พันธุ์ ดอนครพนม ดอน่าน ดอ ดอลำพูน01 ดอเชียงราย13 สุขุม และแบ่งกลุ่มย่อย ได้ 4 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 3.1 ได้แก่พันธุ์ดอนครพนม ดอน่าน ดอ ดอลำพูน01 ดอเชียงราย13 และสุขุม

กลุ่มย่อยที่ 3.2 ได้แก่พันธุ์แห้ว

กลุ่มย่อยที่ 3.3 ได้แก่พันธุ์สีชมพู

กลุ่มย่อยที่ 3.4 ได้แก่พันธุ์ลิ้นจี่ ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยมาก



ภาพ 12 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPA13

จากภาพ 11(B) แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการใช้ HAT-RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPG13 ซึ่งทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 30 แถบ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200-2,400 คู่เบส เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 18 แถบ จำแนกความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ ออกเป็นกลุ่ม (ภาพ 13) ดังนี้

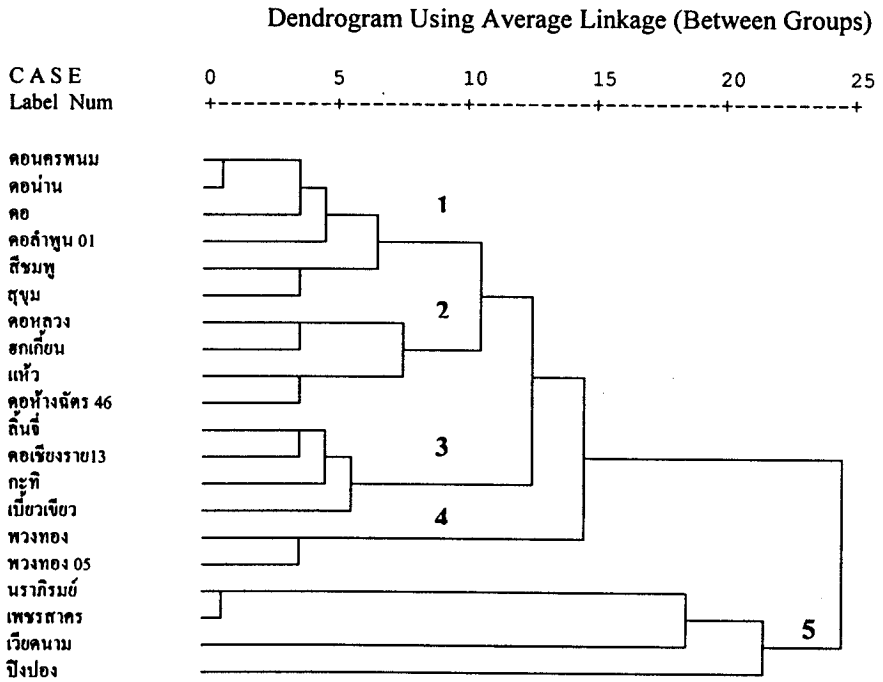
กลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่พันธุ์ ดอนครพนม ดอน่าน ดอ ดอลำพูน 01, สีชมพู และสุขุม

กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่พันธุ์ ดอหลวง ฮกเกี๋ยน แห้ว และดอห้างฉัตร 46

กลุ่มย่อยที่ 3 ได้แก่พันธุ์ ลิ้นจี่ ดอเชียงราย 13 กะทิ และเบี้ยวเขียว

กลุ่มย่อยที่ 4 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และพวงทอง05

กลุ่มย่อยที่ 5 ได้แก่พันธุ์ นราภิรมย์ เพชรสาคร เวียดนาม และปิงปอง



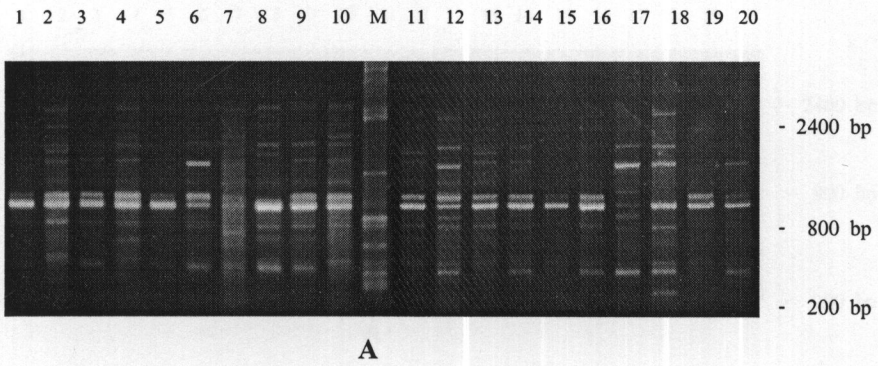
ภาพ 13 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPG13

จากภาพ dendrogram (ภาพ 12 และภาพ 13) พบว่า จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ในแต่ละไพรเมอร์ เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอจำนวนน้อย คือ ในไพรเมอร์ OPA13 มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันเพียง 24 แถบ และไพรเมอร์ OPG13 มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันเพียง 18 แถบ ทำให้การจำแนกกลุ่มของพันธุ์ลำไยไม่สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ จึงเพิ่มปริมาณไพรเมอร์ เพื่อจะได้มีปริมาณของแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันมากขึ้น การวิเคราะห์ก็จะสามารถสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับประวัติพันธุ์ ดังผลการทดลอง ดังนี้

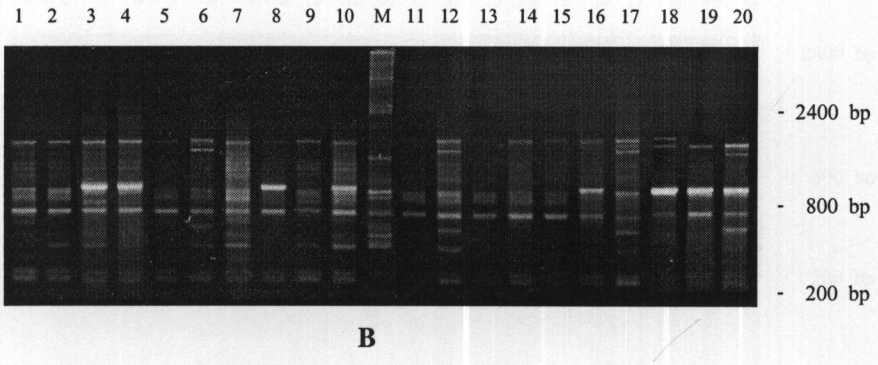
การวิเคราะห์พันธุกรรมของพันธุ์ลำไย ด้วยการใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยมีการเตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อนของลำไย 20 พันธุ์ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส จากการทดลองทั้ง 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA13 OPAK10 OPB18 OPG13 OPT15 OPW06 OPW09 OPX01 OPX15 และ OPZ01 (ภาพ 14-16) พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 305 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-2,500 คู่เบส เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 163 แถบ ซึ่งใช้จำแนกความแตกต่างและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ลำไยทั้ง 20 พันธุ์ได้

ตาราง 9 แสดงรายชื่อของไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 20 พันธุ์

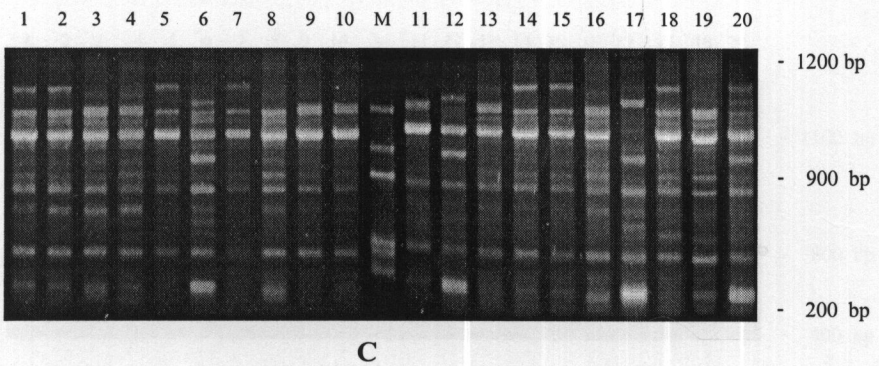
รายชื่อ primers	bands ทั้งหมด	การให้คะแนนของ polymorphic bands	จำนวน polymorphic ต่อ primer (%)	ช่วงน้ำหนักโมเลกุล ของ bands ที่เกิด (bp)
1. OPA 13	35	24	68.6	100 – 2,400
2. OPAK 10	35	14	40	250 – 2,300
3. OPB 18	30	12	40	200 – 1,200
4. OPG 13	30	18	60	200 – 2,400
5. OPT 15	29	18	62.0	300 – 1,400
6. OPW 06	34	23	67.7	200 – 2,400
7. OPW 09	36	20	55.6	300 – 2,200
8. OPX 01	10	9	90	600 – 1,100
9. OPX 15	42	15	35.7	170 – 2,500
10. OPZ 01	24	10	41.7	200 – 2,500
Total	305	163		



A

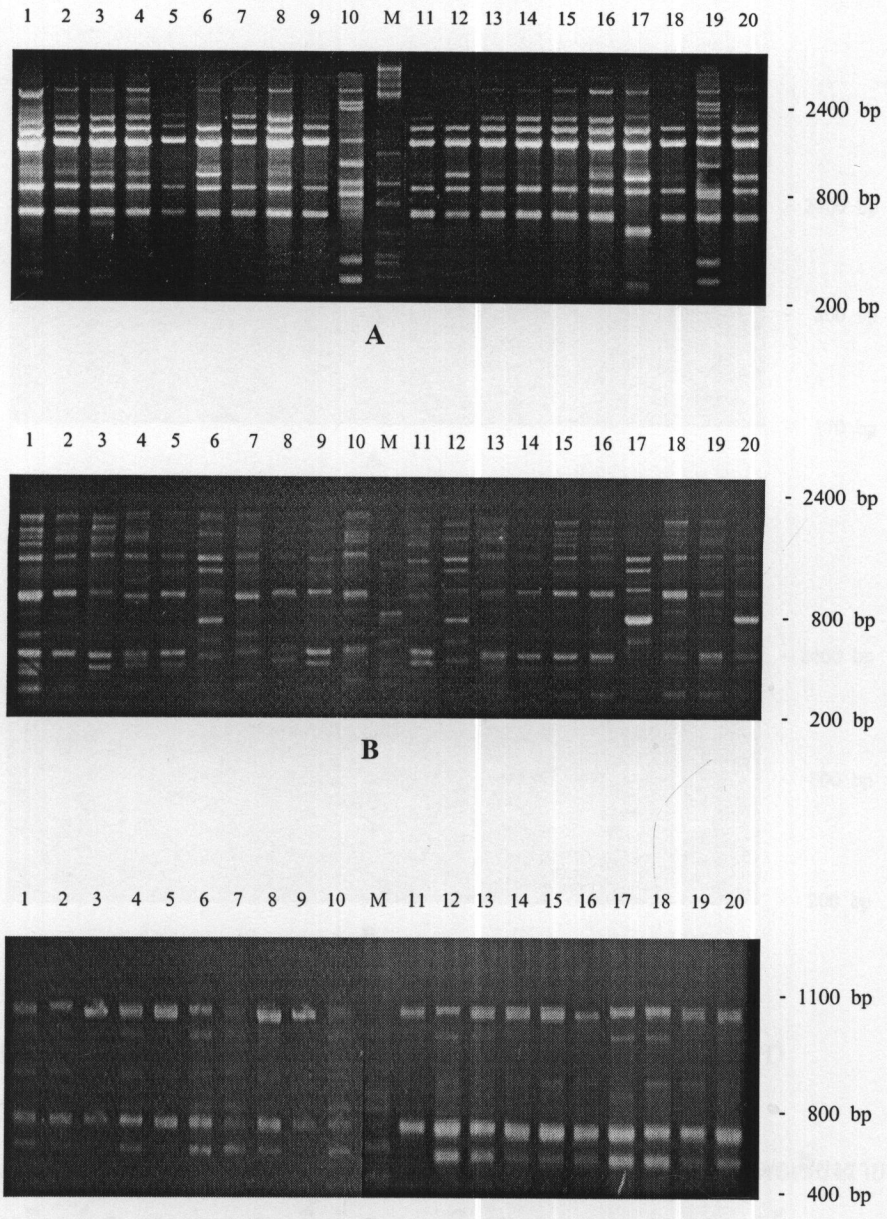


B



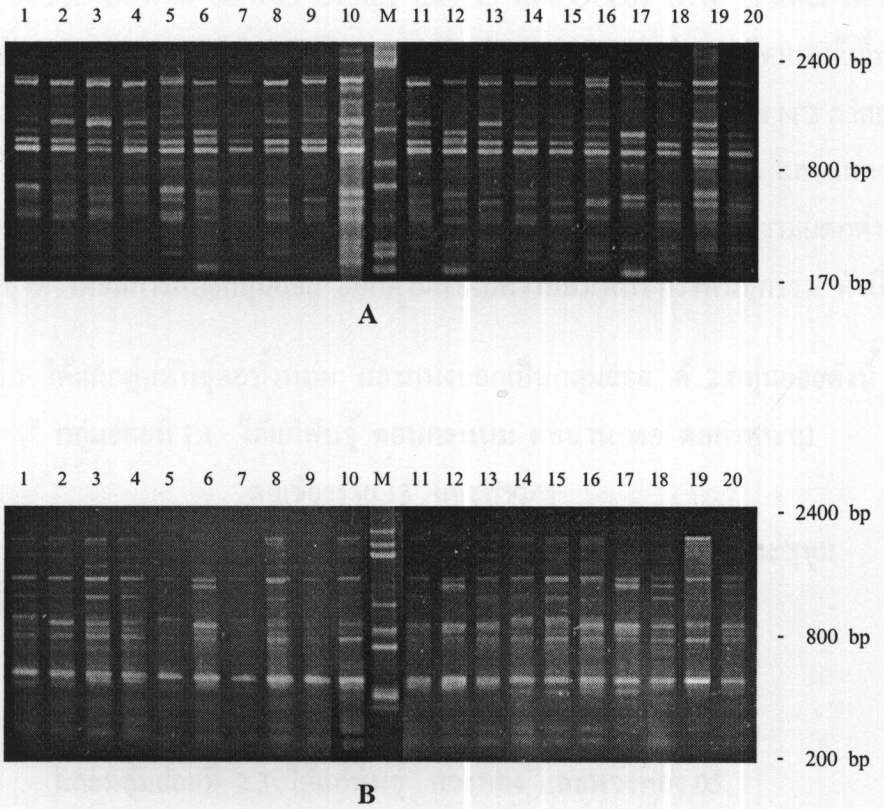
C

ภาพ 14 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPAK10(A) OPB18(B) และ OPT15(C)
M = ladder marker, 1 = ดอ, 2 = สีชมพู, 3 = เบี้ยวเขียว, 4 = พวงทอง, 5 = ดอเชียงราย 13, 6 = นราภิรมย์, 7 = ดอน่าน, 8 = ลิ้นจี่, 9 = กะทิ, 10 = พวงทอง 05, 11 = แห้ว, 12 = เพชรสาคร, 13 = ดอห้างฉัตร 46, 14 = ดอลำพูน 01, 15 = ดอนครพนม, 16 = ดอหลวง, 17 = ปิงปอง, 18 = ฮกเกี้ยน, 19 = สุขุม และ 20 = เวียดนาม



ภาพ 15 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPW06(A) OPW09(B) และ OPX01(C)

M = ladder marker, 1 = ดอ, 2 = สีชมพู, 3 = เบี้ยวเขียว, 4 = พวงทอง, 5 = ดอเชียงราย 13, 6 = นราภิรมย์, 7 = ดอน่าน, 8 = ลิ้นจี่, 9 = กะทิ, 10 = พวงทอง 05, 11 = แห้ว, 12 = เพชรสาคร, 13 = ดอห้างฉัตร 46, 14 = ดอลำพูน 01, 15 = ดอนครพนม, 16 = ดอหลวง, 17 = ปิงปอง, 18 = ฮกเกี้ยน, 19 = สุขุม และ 20 = เวียดนาม



ภาพ 16 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไย 20 พันธุ์ โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPX15(A) และ OPZ01(B)

M = ladder marker, 1 = ดอ, 2 = สีชมพู, 3 = เบี้ยวเขียว, 4 = พวงทอง, 5 = ดอเชียงราย 13, 6 = นราภิรมย์, 7 = ดอน่าน, 8 = ลิ้นจี่, 9 = กะทิ, 10 = พวงทอง 05, 11 = แห้ว, 12 = เพชรสาคร, 13 = ดอห้างฉัตร 46, 14 = ดอลำพูน 01, 15 = ดอนครพนม, 16 = ดอหลวง, 17 = ปิงปอง, 18 = ฮกเกี้ยน, 19 = สุขุม และ 20 = เวียดนาม

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดการใช้ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ OPA13 OPAK10 OPB18 OPG13 OPT15 OPW06 OPW09 OPX01 OPX15 และ OPZ01 (ภาพ 11 และภาพ 14-16) เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 305 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-2,500 คู่เบส เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 163 แถบ (ตาราง 9) และเมื่อนำข้อมูลที่ได้ (ตาราง 3 ภาคผนวก) ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS วิเคราะห์ด้วย cluster analysis และแสดงความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA เพื่อเสนอเป็น dendrogram (ภาพ 17) สามารถจำแนกความแตกต่างพันธุ์ลำไยทั้ง 20 พันธุ์ได้ โดยมีการแบ่งกลุ่มย่อย ออกตามลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่กลุ่มพันธุ์ดอทั้งหมด และแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ได้ 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่พันธุ์ ดอนครพนม ดอน่าน ดอ ดอลำพูน 01 ดอเชียงราย 13 และสีชมพู

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่พันธุ์ แห้ว ดอห้างฉัตร 46 ดอหลวง และสุขุม

กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยๆ ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ได้แก่พันธุ์ ฮกเกี้ยน

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ได้แก่พันธุ์ ลิ้นจี่ กะทิ และพันธุ์เบี้ยวเขียว

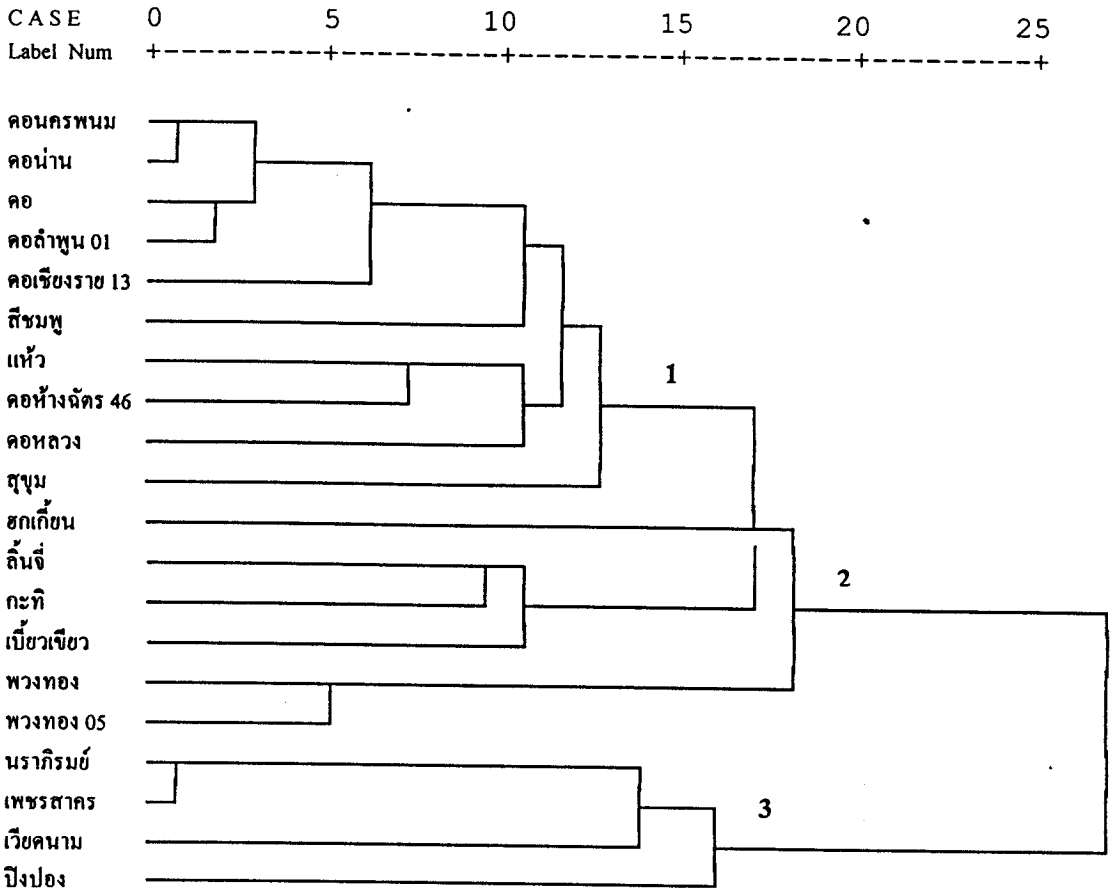
และกลุ่มย่อยที่ 2.3 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และพวงทอง 05

และกลุ่มสุดท้าย คือ กลุ่มที่ 3 แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 3.1 ได้แก่พันธุ์นราภิรมย์ และพันธุ์เพชรสาคร

กลุ่มย่อยที่ 3.2 ได้แก่พันธุ์ เวียดนาม และปิงปอง

Dendrogram Using Average Linkage (Between Groups)



ภาพ 17 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของลำไย 20 พันธุ์ โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 10 ไพรเมอร์

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ลำไยด้วยการใช้ molecular markers ซึ่งเทคนิคที่เลือก ได้แก่ HAT-RAPD และ AFLP เนื่องมาจากเทคนิคทั้ง 2 นี้มีพื้นฐานของการใช้ปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีปริมาณมาก โดยที่เทคนิค HAT-RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้เพียงปฏิกิริยา PCR ที่อาศัยการสุ่มจับของ primer กับดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) แล้วนำผลผลิตจากปฏิกิริยา (PCR products) มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส ซึ่งเป็นการทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวกในตัวกลางคือ agarose gel พบว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของ gel ได้ช้า จึงปรากฏแถบดีเอ็นเออยู่ตอนบนของ gel ส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของ gel ได้เร็วกว่า จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอบริเวณตอนล่างของ gel แต่ถ้าดีเอ็นเอมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันก็จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน (อาภัสรา, 2537 ; วาสนา, 2539) ในเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้การตัดด้วย restriction enzymes และวิธีการของปฏิกิริยา PCR รวมเข้าไปใช้ในการตรวจสอบ โดยมี 3 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ขั้นตอนแรกเป็นการใช้ 2 เอนไซม์ ตัด genomic DNA แล้วต่อเชื่อมกับ adapter ขั้นตอนที่ 2 เป็นการใช้คู่ไพรเมอร์สุ่มจับกับ fragment ที่เกิดจากขั้นตอนแรก โดยการทำปฏิกิริยา PCR และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการทำปฏิกิริยา PCR อีกครั้ง เพื่อคัดเลือก fragment ให้มีจำนวนน้อยลงเพื่อง่ายต่อการวิเคราะห์ แล้วนำ PCR product จากขั้นตอนสุดท้ายมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวกผ่านตัวกลางคือ polyacrylamide gel ซึ่งดีเอ็นเอขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของ gel ได้ช้า จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอ อยู่ตอนบนของ gel ส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของ gel ได้เร็วกว่า จึงปรากฏแถบดีเอ็นเอบริเวณตอนล่างของ gel แต่ถ้าดีเอ็นเอมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันก็จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองแรก การศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย เป็นการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไยพันธุ์ดอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ เนื้อ เปลือกผล และเมล็ด จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยการใช้ 3 ไพรเมอร์ พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพ 5) แต่มี intensity หรือ density ของลายพิมพ์

ดีเอ็นเอในแต่ละเนื้อเยื่อนั้นมีความแตกต่างกัน การเกิดซ้ำของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความเหมือนเดิมทุกครั้ง และมี resolution สูง

การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ มีการทดลองของ Cheng *et al.* (1997) ได้ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอกับเนื้อเยื่อจากหลายๆ ส่วนในพืชพวก woody species และการทดลองของ Lin and Walker, (1997) ได้สกัดดีเอ็นเอจาก cambium ของ grape rootstocks พบว่าคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้มีเท่าๆ กันกับการใช้ใบ ซึ่งใช้ได้ในบางกรณีที่ต้องการเก็บรักษาต้นตอพันธุ์ และไม่สามารถใช้ใบที่กำลังอยู่ในระยะพักตัว (dormancy) ของพืช มาใช้วิเคราะห์ทาง molecular หรือประโยชน์ทางด้านอื่นๆ ได้ เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ที่ได้ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน

การทดลองเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ จะมีประโยชน์เป็นอย่างมากเนื่องจากลำไยจะเกิดติดผลจนได้ผลผลิตคือปีละครั้งตามฤดูกาล และใช้เวลาหลายเดือนกว่าผลจะโตเต็มที่ ในกรณีของใบอ่อนก็เช่นเดียวกันกัน ซึ่งในแต่ละพันธุ์ของลำไยจะมีการติดผลและแตกใบอ่อนไม่พร้อมกัน ทำให้ในการจะจัดเก็บเอาเนื้อเยื่อจากส่วนใดส่วนหนึ่งที่ต้องการเฉพาะมาทำการทดลองไม่สะดวก ในทางปฏิบัติจริงของการทดลองต้องมีการเก็บตัวอย่างต้องมีการทำผลซ้ำ (repeat) เพื่อความแน่ใจและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น เพื่อจะได้ใช้เนื้อเยื่อต่างชนิดทดแทนกันได้เมื่อมีการขาดแคลน

จากการทดลองของ Chen *et al.* (1997) ได้ใช้เทคนิค RAPD กับถั่วเหลืองเพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากใบและราก พบว่า จากการใช้ 40 ไพรเมอร์ มีเพียง 10 ไพรเมอร์ ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน โดยให้เหตุผลว่าอาจจะไปเกี่ยวข้องกับลักษณะพัฒนาการที่เกิดเฉพาะเนื้อเยื่อแต่ละส่วนและได้ให้ข้อคิดว่าการเลือกเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนมาวิเคราะห์ต้องมีการคัดเลือกเอาจากแหล่งที่เป็น physiologically uniform tissue เดียวกันจริงๆ เพื่อผลการทดลองที่ได้จะสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันเนื่องจากใช้จำนวนไพรเมอร์น้อยกว่ามาก

จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไยพันธุ์ดอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบเนื้อ เปลือกผล และเมล็ด ด้วยการใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อส่วนแต่ละส่วน มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และเมื่อได้ตรวจสอบการเกิดซ้ำของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีเหมือนเดิมทุกครั้ง ซึ่งมีผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Donini *et al.* (1997) ได้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนใบ และเมล็ดของข้าวสาลี พบว่าแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีการเกิดซ้ำเหมือนเดิมทุกครั้ง และมีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน โดยได้ให้เหตุผลว่าแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจจะได้มาจากการ

ปนเปื้อนของเชื้อโรค และการเกิด DNA methylation ที่จะส่งผลให้เกิดความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเฉพาะในแต่ละเนื้อเยื่อ

จากผลการทดลองของทั้ง 2 เทคนิค ให้ข้อเสนอแนะว่า หากจะใช้ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อส่วนใดของพืช เลือกเฉพาะเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันมาวิเคราะห์ทางพันธุกรรม เพราะหากเลือกจากต่างเนื้อเยื่อกันแล้วอาจทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้ โดยไม่จำเป็นว่าเลือกใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคหรือวิธีการใดก็ตาม

การทดลองที่สอง การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลำไย 9 พันธุ์ ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 6 ไพรเมอร์ ซึ่งได้แก่ OPAK10 OPAK14 OPAS10 OPD20 OPG13 และ OPH13 (ภาพ 7) และนำข้อมูลที่ได้ (ตาราง 1 ภาคผนวก) เพื่อเสนอเป็น dendrogram (ภาพ 8) จำแนกพันธุ์ลำไยออก 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่พันธุ์ เบี้ยวเขียว ลิ้นจี่ พวงทอง แห้ว สีชมพู และฮกเกี้ยน

ในกลุ่มที่ 1 ออกแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่พันธุ์เบี้ยวเขียว และพันธุ์ลิ้นจี่

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และแห้ว

กลุ่มย่อยที่ 1.3 ได้แก่พันธุ์ สีชมพู

กลุ่มย่อยที่ 1.4 ได้แก่พันธุ์ ฮกเกี้ยน

กลุ่มที่ 2 ได้แก่พันธุ์ เพชรสาคร เวียดนาม และปิงปอง

ในกลุ่มที่ 2 ยังแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ได้แก่พันธุ์เพชรสาคร และพันธุ์เวียดนาม

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ได้แก่พันธุ์ปิงปอง

จากผลการศึกษาโดยเทคนิค AFLP ด้วยการใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ E+ACT/M+CAT (ภาพ 9) และนำข้อมูลที่ได้ (ตาราง 2 ภาคผนวก) เพื่อเสนอเป็น dendrogram (ภาพ 10) จำแนกพันธุ์ลำไยออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่พันธุ์ แห้ว สีชมพู พวงทอง เบี้ยวเขียว ฮกเกี้ยน และลิ้นจี่

ในกลุ่มที่ 1 แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่พันธุ์ แห้ว และสีชมพู

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และเบี้ยวเขียว

กลุ่มย่อยที่ 1.3 ได้แก่พันธุ์ ฮกเกี้ยน

กลุ่มย่อยที่ 1.4 ได้แก่พันธุ์ ลิ้นจี่

กลุ่มที่ 2 ได้แก่พันธุ์ เพชรสาคร เวียดนาม และปิงปอง

ในกลุ่มที่ 2 แบ่งออก 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ได้แก่พันธุ์เพชรสาคร และพันธุ์เวียดนาม

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ได้แก่พันธุ์ ปิงปอง

จาก dendrogram (ภาพ 8 และภาพ 10) พบว่า ทั้ง 2 เทคนิคแสดงความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมของลำไยทั้ง 9 พันธุ์ โดยจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน แต่แตกต่างกันในการจัดกลุ่มย่อยภายในกลุ่มที่ 1 เช่น สายพันธุ์ลิ้นจี่ โดยตามประวัติเป็นสายพันธุ์ที่เกิดด้วยการเพาะจากเมล็ดของพันธุ์เบี้ยวเขียว ซึ่งผลจากการวิเคราะห์มีการจัดกลุ่มแตกต่างกันระหว่างทั้ง 2 เทคนิค ไปคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Sharma *et al.* (1995 ; 1996) ทดลองเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างทั้ง 2 เทคนิคในถั่วแขก การศึกษาของ Gaiotto *et al.* (1997) ทดลองเปรียบเทียบทั้ง 2 เทคนิคกับยูคาลิปตัส การศึกษาของ Russell *et al.* (1997) ทดลองเปรียบเทียบกับหลายๆ เทคนิคในข้าวบาร์เลย์ การศึกษาของ Costa *et al.* (2000) ทดลองเปรียบเทียบทั้ง 2 เทคนิคพร้อมกับเทคนิค protein marker ในสนทะเล และการศึกษาของ Cabrita *et al.* (2001) ทดลองเปรียบเทียบระหว่างทั้ง 2 เทคนิค ในการจำแนกสายต้นของมะเดื่อ จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค RAPD และ AFLP ของกลุ่มผู้ทดลองหลายๆ กลุ่ม พบว่า เทคนิคที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนมาก (high polymorphic bands) จะสามารถจัดกลุ่มได้รายละเอียดชัดเจน ถูกต้องและสอดคล้องกับประวัติพันธุ์

จากการทดลองนี้ได้เลือกใช้เทคนิค HAT-RAPD ซึ่งเป็นเทคนิคที่ปรับปรุงมาจากเทคนิค RAPD โดยทั่วๆ ไป ที่มีการใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 35-42°C เพิ่มขึ้นมาเป็น 46-62°C โดยเทคนิคนี้ให้ high resolution, reproducibility, และ polymorphism (Anuntalabhochai *et al.*, 2000) ดังนั้นจึงเลือกใช้ HAT-RAPD มาใช้ในการศึกษาในการทดลองที่ 3 เพราะมีความสะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย

การทดลองที่สาม การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยการใช้ 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA13 OPAK10 OPB18 OPG13 OPT15 OPW06 OPW09 OPX01 OPX15 และ OPZ01 (ภาพ 11 และภาพ 14-16) และเมื่อนำข้อมูล (ตาราง 3 ภาคผนวก) ด้วยการวิเคราะห์ cluster analysis และแสดงความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA เสนอเป็น dendrogram (ภาพ 17) พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างลำไยทั้ง 20 พันธุ์ได้ โดยมีการแบ่งกลุ่มออกตามลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่กลุ่มพันธุ์ดอทั้งหมด มีจำนวน 10 พันธุ์

แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่พันธุ์ ดอนครพนม ดอน่าน ดอ ดอลำพูน 01 ดอเชียงราย 13 และสีชมพู

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่พันธุ์ แห้ว ดอห้างฉัตร 46 ดอหลวง และสุขุม

กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ได้แก่พันธุ์ ฮกเกี้ยน

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ได้แก่พันธุ์ ลิ้นจี่ กะทิ และเบี้ยวเขียว

กลุ่มย่อยที่ 2.3 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และพวงทอง 05

กลุ่มสุดท้าย คือ กลุ่มที่ 3 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 3.1 ได้แก่พันธุ์นราภิรมย์ และพันธุ์เพชรสาคร

กลุ่มย่อยที่ 3.2 ได้แก่พันธุ์ เวียดนาม และปิงปอง

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ กลุ่มพันธุ์ดอทั้งหมด เนื่องจากพันธุ์ดอในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้มีการนำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งปลูกเดียวกันคือจากจังหวัดลำพูน และมีการคัดเลือกเพื่อส่งเสริมการปลูกจากการประกวดในงานเกษตรประจำปี และได้กระจายไปเก็บรักษาพันธุ์เพาะปลูกตามศูนย์วิจัยพืชสวนหรือสถานีทดลองพืชสวนในจังหวัดต่างๆ ต้นลำไยอาจมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ปลูก รวมทั้งได้มีการคัดเลือกพันธุ์ของคนในท้องถิ่น จึงมีการตั้งชื่อแยกเป็นพันธุ์ต่างๆ ในภายหลัง เช่น พันธุ์ดอนครพนมและดอน่าน ซึ่งปลูกที่สถานีทดลองพืชสวนจังหวัดนครพนม และจังหวัดน่าน ดังนั้นจึงมีการแสดงความใกล้ชิดในระดับพันธุกรรมเป็นอย่างมาก ส่วนพันธุ์แห้ว ซึ่งไม่สามารถจำแนกออกจากพันธุ์ดอต่างๆ ได้อย่างชัดเจน โดยได้ตรวจสอบประวัติพันธุ์กับนักวิชาการ พบว่าต้นที่เก็บตัวอย่างมามีลักษณะของใบเหมือนกับใบของพันธุ์ดอยอดแดงที่เกษตรกรส่วนใหญ่ไม่นิยมปลูกกันแล้ว จึงมีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับพันธุ์ดอยอดแดง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าอาจมีความผิดพลาดในการระบุชื่อพันธุ์หรืออาจมีการปะปนมาจากแหล่งปลูก หรือมีการสับสนในการจัดการจากแหล่งปลูก เช่นเดียวกับพันธุ์สีชมพู ซึ่งมีลักษณะบางประการคล้ายคลึงกับพันธุ์ดอยอดแดง และมีข้อสันนิษฐานอีกข้อหนึ่งว่าพันธุ์สีชมพู และพันธุ์แห้วอาจมาจากแหล่งเดียวกัน เข้ามาในประเทศไทยพร้อมกัน (บุญแถม และมนตรี, การติดต่อส่วนตัว)

กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ 3 กลุ่ม

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ได้แก่พันธุ์ ฮกเกี้ยน เป็นพันธุ์การค้าที่มีต้นกำเนิดมาจากเมืองฮกเกี้ยน ประเทศจีน และนักวิชาการได้นำกิ่งพันธุ์มาปลูกเพื่อเก็บรวบรวมเพื่อศึกษาลักษณะต่างๆ ทางด้าน

สัณฐานวิทยา ลักษณะทางพันธุกรรม เพื่อเปรียบเทียบกับลักษณะสายพันธุ์ลำไยของไทย (บุญแถม และมนตรี, การติดต่อส่วนตัว)

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ได้แก่สายพันธุ์ ลิ้นจี่ กะทิ และพันธุ์เบี้ยวเขียว เนื่องจากสายพันธุ์ลิ้นจี่ และสายพันธุ์กะทิ เป็นสายพันธุ์ที่เกิดมาด้วยการเพาะจากเมล็ดของพันธุ์เบี้ยวเขียว แต่มีลักษณะพิเศษเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป สายพันธุ์กะทินั้นมีลักษณะของเนื้อเหมือนมะพร้าว ส่วนสายพันธุ์ลิ้นจี่ (ซึ่งปัจจุบันมีอีกชื่อ คือ พันธุ์บ้านโฮ่ง 60) มีลักษณะผิวของผลขรุขระคล้ายผิวของผลลิ้นจี่และเวลาลอกเปลือกผลออกจะมีเยื่อเป็นแผ่นบางๆ คล้ายกับในผลของลิ้นจี่ จากลักษณะดังกล่าวจึงมีการตั้งชื่อใหม่ตามลักษณะที่พบเห็น (บุญแถม และมนตรี, การติดต่อส่วนตัว)

กลุ่มย่อยที่ 2.3 ได้แก่พันธุ์ พวงทอง และพวงทอง 05 โดยพวงทอง 05 เกิดจากพันธุ์พวงทองที่มีคัดเลือกพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด และได้คัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ดีไว้เป็นสายต้น และชนะการประกวดในงานเกษตรประจำปี จึงมีการตั้งรหัสหมายเลข 05

และกลุ่มสุดท้าย กลุ่มที่ 3 แบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ 2 กลุ่ม

กลุ่มย่อยที่ 3.1 ได้แก่ สายพันธุ์นราภิรมย์ และพันธุ์เพชรสาคร พบว่า ไม่มีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลความแตกต่างกัน อีกทั้งลักษณะภายนอก (morphology) เหมือนกันมาก คาดว่า น่าจะเป็นพันธุ์เดียวกัน แต่ได้ถูกนำไปปลูกต่างสถานที่ จึงมีการตั้งชื่อใหม่ ทั้งสายพันธุ์นราภิรมย์ และพันธุ์เพชรสาคร เป็นลำไยที่ปลูกมากที่จังหวัดสมุทรสาคร มีลักษณะรูปทรงและขนาดของใบเล็ก มีกลิ่นแรง แต่ขนาดของผลใหญ่กว่า เนื้อฉ่ำน้ำคล้ายลำไยเครือ (รวี, 2540) โดยมีสภาพพื้นที่ปลูกมีความสูงกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 100 เมตร สวนส่วนใหญ่ยกร่องแปลงปลูก สภาพดินปลูกเป็นดินเหนียวจัด ผลผลิตออกนอกฤดู สุกเร็วกว่าลำไยพันธุ์อื่นๆ มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับลำไยเวียดนาม คือ มีน้ำมาก เนื้อแฉะ มีกลิ่นแรงกว่าลำไยปกติ และมีการควั่นกิ่งเพื่อเร่งการออกดอก (เปรมปรี, 2538 ; ประทีป, 2540 ; บุญแถม และมนตรี, การติดต่อส่วนตัว)

สำหรับพันธุ์ปิงปอง และพันธุ์เวียดนามนั้น เป็นพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดมาจากตอนใต้ของประเทศเวียดนาม โดยพันธุ์ปิงปองมีชื่อเดิมที่เกษตรกรและนักวิชาการรู้จัก คือ พันธุ์ซวงเกิมหว่าง (เปรมปรี, 2540 ; บุญแถม และมนตรี, การติดต่อส่วนตัว) จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ในแต่ละไพรเมอร์ พบว่า การมีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เช่น ไพรเมอร์ OPA13 มีเพียง 24 แถบ และไพรเมอร์ OPG13 มีเพียง 18 แถบ ทำให้การจำแนกกลุ่มของพันธุ์ลำไยไม่สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ จึงต้องเพิ่มปริมาณไพรเมอร์ เพื่อจะได้มีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันมากขึ้น การวิเคราะห์ก็จะสามารถสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับประวัติพันธุ์

จากข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ และแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำไยเป็น dendrogram ทำให้พบว่า ไม่ว่าจะสุ่มเลือกใช้ไพรเมอร์ OPA13 OPAK10 OPG13 OPB18 OPT15 OPW06 OPW09 OPX15 OPX15 หรือ OPZ01 ก็สามารถแยกความแตกต่างของลำไยทั้ง 20 พันธุ์ได้ และเมื่อนำข้อมูลจำนวนของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันถึง 163 แถบ ในแต่ละไพรเมอร์มาวิเคราะห์รวมกัน ได้ทำให้การจัดกลุ่มความสัมพันธ์สอดคล้องตามประวัติพันธุ์ และการเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน หมายถึง การเลือกเอาแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีปรากฏในทุกพันธุ์ 1 แถบดีเอ็นเอ ถือว่าเป็นการตัวแทน 1 ลักษณะ (character) ยิ่งมีจำนวนการมีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันมาก ยิ่งช่วยให้บ่งบอกหรือจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ลำไยได้ดีขึ้น ดังนั้นการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์มากขึ้น จึงทำให้ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมีมากขึ้นด้วย ช่วยให้การวิเคราะห์ผลก็จะมีความสอดคล้องกับประวัติพันธุ์ได้ชัดเจนและมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ molecular markers สามารถช่วยสนับสนุนการจำแนกสายพันธุ์พืชต่างๆ เช่น ลำไยได้ชัดเจน ดังนั้นวิธีการนี้สามารถนำมาใช้สนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธานของลำไย หรือพืชชนิดอื่นๆ ที่มีลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมากได้สะดวกขึ้น อย่างไรก็ตาม ไม่สมควรที่จะนำไปใช้ในการบ่งบอกหรือจัดจำแนกพันธุ์พืชที่มีความแตกต่างทางลักษณะภายนอกได้เด่นชัดแล้ว

ประโยชน์ที่ได้รับในการศึกษาครั้งนี้

1. สามารถบ่งบอกหรือจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลำไยที่นำมาศึกษาได้ในระดับอณูชีวโมเลกุล

2. รวบรวมลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไยแต่ละพันธุ์ที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนงานทางด้านอนุกรมวิธาน (Taxonomy) และสำหรับหน่วยงานต่างๆ ที่ต้องการข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3. กรณีงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ สายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันมากเมื่อนำมาผสมพันธุ์กันไม่เกิดลักษณะที่เป็นประโยชน์ สามารถนำมาตรวจสอบได้ก่อน เพื่อลดการระยะเวลา

ข้อเสนอแนะ เนื่องจากวิธีการที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการบอกความแตกต่างของลำไยต่างพันธุ์ การนำไปใช้ประโยชน์จะมากขึ้น จึงควรมีการทำงานต่อเนื่องต่อไป โดยการหาตัวบ่งชี้ หรือบ่งบอกเจาะจง (probe หรือ genetic markers) เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบเฉพาะพันธุ์ลำไยต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. การเปรียบเทียบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ เนื้อ เปลือกผล และเมล็ด โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 3 ไพรเมอร์ ไม่พบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน แต่ผลจากเทคนิค AFLP ด้วยการใช้ 4 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันในแต่ละชนิดของเนื้อเยื่อทั้ง 4
2. เปรียบเทียบผลจากการวิเคราะห์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP พบว่า ทั้ง 2 เทคนิคสามารถจัดกลุ่มลำไย 9 พันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ เหมือนกัน แต่ผลการวิเคราะห์จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD มีแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ใกล้ชิดของลำไยได้ชัดเจน มีรายละเอียดถูกต้อง ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ที่ใช้เพียง 1 คู่ไพรเมอร์ และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยกว่า จึงไม่สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ลำไย
3. เทคนิค HAT-RAPD เลือกใช้ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA13 OPAK10 OPB18 OPG13 OPT15 OPW06 OPW09 OPX01 OPX15 และ OPZ01 สามารถจำแนกลำไย 20 พันธุ์ได้ และสอดคล้องกับประวัติพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2545. (online). http://www.moc.go.th/thai/dbe, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (online) http://www.doae.go.th/plant/kdoae/total3/htm, กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (online) http://www.oae.go.th/statistic/yearbook/2000-01/, http://www.oae.go.th/statistic/yearbook/index.html. กรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์. 2545. (online). http://www.dit.go.th.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2519. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 418 น.

เกศินี ระมิงค์วงศ์. 2528. การจัดจำแนกไม้ผล. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2531. เอนไซม์และโปรตีนในพืช. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซีสในการจำแนกพันธุ์พืช สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม, 14-16.

จันทร์จีรา เชียงดา. 2541. การวิเคราะห์พันธุกรรมลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) Rondom Amplified Polymorphic DNA. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

เจนจิรา มาหา, อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2540. การจำแนกสายพันธุ์หญ้าแฝกโดยวิธีดีเอ็นเอ. *ใน* แบบรายงานความก้าวหน้าโครงการความร่วมมือในการวิจัยพัฒนาถ่ายทอดเทคโนโลยีและการตลาด ระหว่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กับบริษัทปราสาททองโอสถ จำกัด : การวิจัยและพัฒนาแฝกหอมเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร, สถาบันและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เฉลิมพล ภูมิไชย์, จุลภาค คุ้นวงศ์. 2543. การศึกษาเปรียบเทียบพันธุกรรมของมะม่วงมหาชนกและมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ที่สวนประพัฒน์ สิทธิสังข์. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 ระหว่างวันที่ 1-4 ก.พ. 2543, 1-10.

นิตย์ศรี แสดงเดือน, พัฒนา ศรีฟ้า, วินิตชาญ รื่นใจชน. 2537. การใช้ Random Amplified Polymorphic DNA technique ในการจัดจำแนกสายพันธุ์หญ้าแฝกในประเทศไทย. แบบรายงานความก้าวหน้าโครงการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝก อันเนื่องมาจากพระราชดำริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญแถม ถาคำฟู (ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่) และ มนตรี ทศานนท์ (นักวิชาการเกษตร 7, ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย). 2545. (การติดต่อส่วนตัว)

ปนัดดา กาญจนะ. 2541. การจำแนกพันธุ์ลำไยโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสและเซลล์พันธุศาสตร์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ประทีป กุณาศล. 2540. เยือนเวียดนาม ลำไยใหญ่ "พันธ์ซวงซวง". เคหการเกษตร ปีที่ 21 ฉบับที่ 12 ธันวาคม 2540, 69-74.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2538. ลำไยนั้นสำคัญไฉน. เคหการเกษตร ปีที่ 19 ฉบับ 12 ธันวาคม 2538, 46-51.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2543. เยี่ยมสวนลำไยเวียดนาม กันอีกครั้งเถอะ. เคหการเกษตร ปีที่ 24 ฉบับ 2 ภุมภาพันธ์ 2543, 83-88.

พิชัย สราญรมย์. 2531. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับลำไยเพื่อการศึกษาระดับปริญญา. โครงการพัฒนาตำราวิชาการ, วิทยาลัยรำไพพรรณี , จันทบุรี, 271 น.

ภาณี เตมีศักดิ์. 2536. เทคนิค RAPD สำหรับ DNA fingerprinting ในการตรวจแยกสายพันธุ์พืช. เอกสารประกอบคำบรรยายการสัมมนาทางวิชาการ เรื่องความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแนวใหม่. 13-14 พฤษภาคม 2536. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 57-66.

รวี เสรฐภักดี. 2540. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และพันธุ์ของลิ้นจี่และลำไย. เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตรเทคโนโลยียุคใหม่ในการผลิตลิ้นจี่และลำไย ระหว่างวันที่ 4-6 พฤศจิกายน 2540 ณ โรงแรมเชียงใหม่ออคิด, จังหวัดเชียงใหม่.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, มนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ, 208 น.

วาสนา ศิริรังษี. 2539. Gel electrophoresis. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 8.1-8.29.

วีระพงศ์ ลุติตานนท์. 2539. Nucleic acid amplification techniques. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 7.1-7.24.

สมศักดิ์ จัตวัฒนกุล. 2527. ผลของ CEPA และ SADH ต่อคุณภาพของดอกลำไยพันธุ์ดอ. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, สุมน มาสุธน, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2538. การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* โดยเทคนิค RAPD. วารสารการเกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 29 ฉบับที่ 4, 454-461.

สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2523. หลักไม้ผล. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, 122 น.

สายณรงค์ รสานนท์. 2540. เรียนรู้เรื่องลำไยจากอินเตอร์เนต. เคหการเกษตร ปีที่ 21 ฉบับ 12 ธันวาคม 2540, 104 – 108. (การติดต่อส่วนตัว).

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, ยุคลธร สถาปนศิริ, สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุมน มาสุธน. 2542. AFLP markers สำหรับการตรวจสอบชนิดของพืชสกุล *Garcinia* : พันธุศาสตร์ช่วยชาติแก้วิกฤติ. *ใน* รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 ระหว่างวันที่ 6-8 ตุลาคม 2542. ณ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2531. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 106 น.

อุไรวรรณ อรัญวาสน์. 2540. การวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชกลุ่มกระเจียวโดยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Adam R.P., Demeke T., Abulfatih H.A. 1993. RAPD DNA fingerprints and terpenoids : clues to post migrations of Juniperus in Arabia and east Africa. Theor. Appl. Genet., 87, 22-26.

Anuntalabhochai S., Chaingda J., Chundet R., Apavatjrut P. 2000. Genetic diversity with in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. Present in International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits, Nov 26th-Dec 1st. Canns, Australia., 45.

Arcade A., Anselin F., Rampant P.F., Lesage M.C., Pâques L.E., Prat D. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. Theor. Appl. Genet., 100, 299-307.

Aruna M., Austin M.E., Akins P.O. 1995. Randomly Amplified polymorphic DNA fingerprinting for identifying Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) Cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 120(5), 710-713.

Barrett B.A., Didwell K.K. 1998. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultvars from the pacific northwest. Crop. Sci., 38, 1261-1271.

Bebeli P.J., Zhou Z., Somers D.J., Gustafson J.P. 1997. PCR primed with minisatellite core sequences yields DNA fingerprinting probes in wheat. Theor. Appl. Genet., 95, 276-283.

Benito C., Figueiras A.M., Zaragoza C., Gallego F.J., Pena A.D.L. 1993. Rapid Identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase Chain reaction. Plant Molecular Biology, 21, 181-183.

Bernardo R. 1994. Prediction of maize single-cross performance using RFLP and information from related hybrids. Crop. Sci., 34, 20-25.

Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet., 32, 314-331.

Cabrita L.F., Aksoy U., Hepaksoy S., Leitão J.M. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. Scientia Horticulturae, 87, 261-273.

Castiglione S., Wang G., damiani G., Bandi C., Bisoffi S., Sala F. 1993. RAPD fingerprints for identification and taxonomic studies of Elite poplar (*Popplus* Spp.) clones. Theor. Appl. Genet., 87, 54-59.

Castillo C.O., Chalmers K.J., Powell W., Waugh R. 1996. RAPD and organelle specific RCR re-affirms taxonomic relationships with the genus coffee. Plant Cell Reports, 15, 337-341.

Chen L.F.O., Kuo H.Y., Chen M.H., Lai K.N., Chen S.C.G. 1997. Reproducibility of the differential amplification between leaf and root DNAs in soybean revealed by RAPD markers. Theor. Appl. Genet., 95, 1033-1043.

Chen X., Lim S.H., Wong S.M., Lee Y.H., Kuo J., Yam T.W., Lin J.J. 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of vandaceous orchids. Plant Science, 141, 183-189.

Cheng F.S., Brown S.K., Weeden N.F. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. Hortscience, 32(5), 921-922.

Cho Y.C., Chung T.Y., Park Y.H., Suh H.S. 1995. Genetic polymorphisms and phylogenetic relationships of Korean red rice (weedy rice in *Oryza sativa* L.) based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Korean Journal of Breeding, 27(1), 86-93.

Cordeiro G.M., Taylor G.O., Henry R.J. 2000. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. Plant Science, 155, 161-168.

Costa P., Pot D., Dubos C., Frigerio J.M., Pionneau C., Bodenes D., Bertocchi E., Cervera M.T., Remington D.L., Plomion C. 2000. Agenetic map of maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. Theor. Appl. Genet., 100, 39-48.

Dettori M.T., Palombi A.M. 2000. Identification of *Feijoa sellowiana* berg accession by RAPD markers. Scientia Horticulturae, 86, 279-290.

Donini P., Elias M.L., Bougourd S.M., Koebner R.M.D. 1997. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. Genome, 40 (4), 521-526.

Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull., 19, 11-15.

Echeverria S.P., Valencia V.A.H., Kay A.J. 2001. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). Plant Science, 161, 359-367.

Eiadthong W., Yonemori K., Sugiura A., Utsunomiya N., Subhadrabandhu S. 1999. Identification of mango cultivars of Thailand and evalution of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers. Scientia Hoticulturae, 82, 57-66.

Elisiário P.J., Justo E.M., Leitão J.M. 1999. Identification of mandarin hybrids by isozyme and RALD analysis. Scientia Horticulturae, 81, 287-299.

Ennequin M., Panaud O., Toupance B., Sarr A. 2000. Assessment of genetic relationships between *Setaria italica* and its wild relative *S. viridis* using AFLP markers. Theor. Appl. Genet., 100, 1061-1066.

Gaiotto F.A., Bramucci M., Grattapaglia D. 1997. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. Theor. Appl. Genet., 95, 842-849.

Golenberg E.M., Bickel A., Weihs P. 1996. Effect of highly fragmented DNA on PCR. Nucleic Acids Research, 24 (24), 5026-5033.

Gottieb L.D. 1977. Electrophoresis evidence and plant systemmatics. Ann. Mol. Bot. Gard., 64, 161-180.

Hayes A.J., Maroof M.A.S. 2000. Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. Theor. Appl. Genet., 100, 1279-1283.

Heidenreich E., Kubiecek C.P. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. Capable of chestnut blight biocontrol. Elsevier Science, 126(3), 249-255.

Heinkel R., Hartmann W., Stösser R. 2000. On the origin of the plum cultivars 'Cacaks Beauty', 'Cacaks Best', 'Cacaks Early' and 'Cacaks Fruitful' as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments. Scientia Horticulturae, 83, 149-155.

Heun M., Murphy J.P., Phillips T.D. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analysis for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. Theor. Appl. Genet., 87, 689-696.

Hofstra H., Vossen J.M., Plas J. 1994. Microbs in food processing technology. Elserier Science, 15(2/3), 175-183.

Hongtrakul V., Hoestis G.M., Knapp S.J. 1997. Amplified frangment length polymorphism as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm : genetic diversity among oilseed invred lines. Theor. Appl. Genet., 95, 400-407.

Hormaza J.I. 1999. Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. Scientia Horticulturae, 79, 121-126.

Hu J., Quiros C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Report , 10, 505-511.

Joshi C.P., Nguyen H.T. 1993. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science, 93, 95-103.

Kamaley J.C., Carey D.W. 1995. Application of RAPD PCR markers for identification and genetic analysis of American elm ((*Ulmus americana* L.) selection L). Journal of Enviromental Horticulture, 13 (4), 155-159.

Ko H.L., Cowan D.C., Henry R.J., Graham G.C., Blankeney A.B., Lewin L.G. 1994. random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieries. Euphyrica, 80, 179-189.

Kobayashi M., Lin J.Z., Davis J., Francis L., Clegg M.T. 2000. Quantitative analysis of avocado outcrossing and yield in California using RAPD markers. Scientia Horticulturae, 86, 135-149.

Krutto P. 1998. Estimation of inbred purity and hybrid percentage in F1 hybrid seed production in maize by using DNA methodologies. Master Thesis, Kasetart University, Bongkok, Thailand.

Lin D., Hubbes M., Zsuffa L. 1994. Differentiation of poplar and willow clones using RAPD fingerprints. Tree-physiol., 14(10), 1097-1105.

Lin H., Walker M.A. 1997. Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape roostocks. Hortscience, 32(7), 1264-1266.

Mackill D.J., Zhang Z., Redoña E.D., Colwit P.M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome, 39, 969-977.

Maheswaran M., Subudhi P.K., Nandi S., Xu J.C., Parco A., Yang D.C., Huang N. 1997. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. Theor. Appl. Genet., 94, 39-45.

Marson P. A., Egidy G., Monfredini G., Silvestro S.D., Motto M., Di S.S. 1993. RAPD markers in maize genetic analysis. Maydica., 38(4), 259-264.

Martin B., Friedrich H.U., Melchinger A.E. 1999. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs and SSRs and their use for predicting progeny variance. Crop Sci., 39, 228-237.

Maughan P.J., Maroof M.A.S., Buss G.R., Huestis G.M. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean : species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor. Appl. Genet., 93, 392-401.

Munthali M.T., Newbury H.J., Lloyd B.V.F. 1996. The detection of somaclonal Variants of beet using RAPD. Plant Cell Report, 15(7), 474-478.

Nagamura Y., Antonio B.A., Sasaki T. 1997. Rice mulecular gentic map using RFLPs and its applications. Plant Molecular Biology, 35, 79-87.

Newton C.R., Graham A. 1994. RCR : Introduction to biotechniques. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford , 161 pp.

Oliveira C.M., Mota M., Corvo L.M., Goulão L., Silva D.M. 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. Scientia Horticulturae, 79, 163-174.

Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Calalan J., Britton-Davidian J. 1988. Practical isozyme genetic. Ellis Horwood Ltd., London, 215 p.

Paul S., Wachira F.N., Powell W., Waugh R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze) Revealed by AFLP markers. Theor. Appl. Genet., 94, 255-263.

Ramingwong K., Chiewilp K. 1994. Genetic resource of longan in northern Thailand final report submitted to Chaingmai University, Chaingmai, 76 p.

Roa A.C., Maya M.M., Duque M.C., Tohme J., Allem A.C., Bonierbale M.W. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. Theor. Appl. Genet., 95, 741-750.

Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M., Hatz B.G., Jahoor A., Powell W., Waugh R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theor. Appl. Genet., 95, 714-722.

Saiki R.F., Scharf S., Faloona F., Mullis K.S., Harm G.T., Eriish H.A., Amheim N., 1988. Primed directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.

Schmidt K., Jensen K. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. American Journal of Botany, 87, 678-689.

Schnell R.J., Goenaga R., Olano C.T. 1999. Genetic similarities among cocoyam cultivars based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Scientia Horticulturae, 80, 267-276.

Schnell R.J., Kinght R.J. 1993. Genetic relationships among *Mangifera* spp. based on RAPD markers. Acta. Hort., 341, 86-93.

Schut J.W., Qi X., Stam P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers pedigree data and morphological traits in barley. Theor. Appl. Genet., 95, 1161-1168.

Sharma S.K., Dawson I.K., Waugh R. 1995. Relationship among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet., 91, 647-654.

Sharma S.K., Knox M.R., Ellis T.H.N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet., 93, 751-758.

Shimada T., Haji T., Hosake K. 1993. Classification and parent determinination by RAPD in Mume : Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees. FTRS, Japan, 77-80.

Silberstein L., Kovalski I., Huang R., Anagnostou K., Jahn M.M.K., Treves R.P. 1999. Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 79, 101-111.

Subhadrabandhu S. 1990. Lychee and Longan cultivation in Thailand. Faculty of Aqriculture, Kasetsart University, Bangkok, 20-36.

Taramino G., Tarchini R., Ferrario M.L., Pe M.E. 1997. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. Theor. Appl. Genet. 95, 66-72.

Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a gene source of polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res., 10, 6463-6471.

Teulat B., Aldam C., Trehin R., Lebrun P., Barker J.H.A., Arnold G.M., Karp A., Baudouin L., Rognon F. 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) Populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. Theor. Appl. Genet., 100, 764-771.

Uozu S., Ikehashi H., Ohmido N., Ohtsubo E., Ohtsubo E., Fukui K. 1997. Repetitive sequences : cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. Plant Molecular Biology, 35, 791-799.

Valenzuela J.A.L., Martínez O., López O.P. 1997. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. HortScience, 32 (6), 1105-1108.

Voorrips R.E., Jongerius M.C., Kanne H.J. 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plamodiophora brassicae*) in population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. Theor. Appl. Genet., 94, 75-82.

Vos P., Hogers R., Bleeder M., Riejans M., Lee T.V.D., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 23(2), 4407-4414.

Wang G., Castiglione S., Zhang J., Fu R., Ma J., Li W., Sun Y., Sala F. 1994. Hybrid rice (*Oryza sativa* L.) identification and parentage determination by RAPD fingerprint. Plant Cell Report , 14, 112-115.

Wang Y.H., Thomas C.E., Dean R.A. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theor. Appl. Genet., 95, 791-798.

Weising K., Atkinson R.G., Gardner R.C. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR : A critical evaluation. PCR Methods Applic., 249-255.

Willkie S.E., Lsaac P.G., Slater R.J. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) markers for genetic analysis in Allium. Theor. Appl. Genet., 86, 497-504.

Xu G.W., Magill C.W., Schertz K.F., Hart G.E. 1994. A RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Theor. Appl. Genet., 89, 139-145.

Yu L.X., Nguyen H.T. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 87 , 668-672.

ภาคผนวก

การเตรียม buffer และสารละลายเข้มข้น

1. Extraction buffer

1.1 4% (w/v) CTAB

1.2 1% (w/v) PVPP

1.3 100mM Tris-HCl pH 8.0

1.4 1.4M NaCl

1.5 20mM EDTA

1.6 dH_2O (น้ำกลั่นที่ผ่านการ autoclave เสร็จแล้ว)

1.7 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol

ผสมสาร 1.1-1.6 เข้าด้วยกันปั่นด้วย magnetic stirrer จนแน่ใจว่าสารละลายผสมกัน ก่อนนำไปใช้เติม 2-mercaptoethanol ลงไป เนื่องจากสารละลายนี้สามารถระเหยได้

2. 50X Tris acetate buffer (50X TAE buffer)

2.1 Tris base	242 g
2.2 glacial acetic acid	57.1 ml.
2.3 0.5M EDTA pH 8.0	100 ml.

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 5X Tris borate buffer (50X TBE buffer)

3.1 Tris base	54 g
3.2 boric acid	27.5 ml.
3.3 0.5mM EDTA pH 8.0	20 ml

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml. นำไป autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. Loading buffer

4.1 0.25% (w/v) bromophenol blue

4.2 0.25% (w/v) xylene cyanol FF

4.3 40% (w/v) sucrose

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ตามต้องการด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

5. DNA sequencing stop solution

5.1 98% (v/v) formamide

5.2 10mM EDTA

5.3 0.001% (w/v) bromophenol blue

5.4 0.001% (w/v) xylene cyanol FF

ผสมสารทั้งสี่ชนิดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ตามต้องการด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไป autoclave เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

6. 40% polyacrylamide (19:1)

6.1 acrylamide 38 g

6.2 bis-acrylamide 2 g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ autoclave แล้วให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml. ข้อควรระวังเวลาเตรียมสารละลาย polyacrylamide เป็นอันตรายต่อระบบประสาท (neurotoxin) ทั้งที่ยังเป็นผง และเมื่อเป็นสารละลาย ในการเตรียมทุกครั้งควรใช้ผ้าปิดจมูก และสวมถุงมือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

7. 4.5% polyacrylamide

7.1 40% polyacrylamide 11.25 ml.

7.2 7M urea 42 g.

7.3 5x TBE 20 ml.

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนเพื่อให้ urea ละลายได้ดี ใช้ dH_2O ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml. เมื่อละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำสารละลายมากรองก่อนปล่อยให้หายร้อนก่อน (สารละลายนี้โดนแสงแล้วทำปฏิกิริยาทำให้เสื่อมสภาพเร็ว) เก็บเข้าที่อุณหภูมิ 4°C (ควรสวมถุงมือทุกครั้งที่เตรียมสารละลาย)

8. 10% ammonium persulfate (APS)

8.1 APS 1 g.

8.2 ผสมกับน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ได้ปริมาตร 10 ml. ผสมให้เข้า เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

9. 0.5% acetic acid / 95% ethanol alcohol (EtOH)

9.1 acetic acid 0.250 ml.

9.2 ปรับปริมาตรด้วย 95% EtOH ให้เป็น 50 ml. เก็บในอุณหภูมิ 4°C

10. Fixer/Stop solution

10.1 acetic acid 50 ml.

10.2 น้ำกลั่น 450 ml.

11. Silver staining solution

11.1 silver nitrate 0.5 g

11.2 37% formaldehyde 0.75 ml.

11.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 ml. เก็บในที่มืดและควรเตรียมใหม่เสมอก่อนใช้

12. Developer solution

12.1 sodium carbonate 15 g.

12.2 37% formaldehyde 0.75 ml.

12.3 sodium thiosulfate 0.4 ml (จาก stock 10 mg/ml.)

ผสมให้เข้ากันเป็นสารละลาย เสร็จแล้วใส่แช่เย็นไว้ก่อนใช้ให้อุณหภูมิประมาณ 10°C และควรเตรียมใหม่เสมอก่อนใช้

ตาราง 1 แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 9 พันธุ์

รายชื่อพันธุ์ลำไย	การให้คะแนน polymorphic bands		
	OPAK10	OPAK14	OPAS10
เพชรสาคร	0 0 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 1	0 1 0 1 1 0 1 1 0 1 0 1 0 1 1 1 0	0 0 1 0 1 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0
พวงทอง	0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0	0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0
ปิงปอง	0 0 1 1 0 0 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1	0 1 0 1 0 0 1 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0	1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1
เบี้ยวเขียว	0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0
แห้ว	0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 1 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0
สีชมพู	1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 1 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0	0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 1 1 0 0 1 0
ฮกเกี้ยน	0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 1	0 0 1 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 0
เวียดนาม	0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 1	0 1 0 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0	1 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 0 1 1 0 1 1 1 0 1 0 1 0
ลิ้นจี่	0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 1 1	0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1	0 1 0 1 0 1 1 0 0 0 1 1 0 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 1 (ต่อ) แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 9 พันธุ์

รายชื่อพันธุ์ลำไย	การให้คะแนน polymorphic bands		
	OPD20	OPG13	OPH13
เพชรสาคร	1 1 0 1 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 1	0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 0 1 1 1 0
พวงทอง	1 0 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 1 0
ปีงปอง	0 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 1
เบี้ยวเขียว	1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1	0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0
แห้ว	1 1 0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0
สีชมพู	1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0	1 0 0 0 0 1 0 1 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0	0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0
ฮกเกี้ยน	1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 1 0	0 0 1 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0	1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 0
เวียดนาม	1 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 1 0 1	0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 1 1 0 1 0 0	1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 1 1 0 1 1 0
ลิ้นจี่	1 1 0 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1	0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 0

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 2 แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค AFLP กับลำไย 9 พันธุ์

รายชื่อพันธุลำไย	การให้คะแนน polymorphic bands
	E+ACT/M+CAT
เพชรสาคร	0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 1 1 0 0 0 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 1 1 0 1 1 0 1 0 1 1 0 0 1
พวงทอง	0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
ปิงปอง	0 0 1 1 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 1 1 0 1 0 1 1 1 0 0 1 1 1 1 0 1 1 0 0 1 0 1 0 0 1 1
เบี้ยวเขียว	0 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0
แห้ว	0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
สีชมพู	0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0
ฮกเกี้ยน	0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
เวียดนาม	0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 1 0 0 1
ลิ้นจี่	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1 1 1 0 0 0 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 0 0

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 3 แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 20 พันธุ์

รายชื่อพันธุ์ลำไย	การให้คะแนน polymorphic bands				
	OPA13	OPAK14	OPB18	OPG13	OPZ01
คอ	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0	1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 1 0 0 1 0 0 1 0
สีชมพู	1 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0 1	0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 0	1 0 1 0 0 1 1 0 1 0
เบี้ยวเขียว	1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0	0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 1 0 1 0	0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 1 0 1 1 0 1 1
พวงทอง	1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0 0 0	0 1 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 1 1	1 0 0 1 0 1 1 0 1 1
คอเชียงราย 13	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0	1 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 1 0 0 1 0 0	1 0 1 0 0 1 0 0 1 0
นราภิรมย์	0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0	0 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0	1 0 0 1 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 1 1	1 0 0 0 1 1 1 1 1 0
คอน่าน	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 1 0 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 1 0 0 1 0 0 1 0
ลิ้นจี่	1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 1 0 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0	0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 1 0 1 1 0 1 1
กะทิ	1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 1 0 1 1 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 1 0 0 1 1 0 1 1
พวงทอง 05	1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 0 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 1 1	1 0 0 1 0 1 1 0 1 1
แห้ว	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 1 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 1 0 1 1 0 0 1 0
เพชรสาคร	0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0	0 1 0 1 0 0 1 0 1 1 1 0	1 0 0 1 0 0 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 1 1	1 0 0 0 1 1 1 1 1 0
คอห้างฉัตร 46	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 1 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0	1 0 0 1 1 0 1 0 1 1
คอลำพูน 01	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 1 0 0 1 0 0 1 0
คอนครพนม	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 1 0 0 1 0 0 1 0
คอหลวง	1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 0	0 1 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 1 1 0 1 0 0 1 1
ปิงปอง	0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 1 0 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0	0 1 0 0 0 1 1 0 1 1 1 0	0 1 0 0 1 1 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 0	0 1 1 0 0 1 1 1 0 0
ยกเกี๊ยน	1 0 1 1 0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 1 0	1 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 1	1 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 1 0 1 1 1 1 0
ฤๅษี	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 1 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	1 0 1 1 0 1 1 0 0 0
เวียดนาม	0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 1 0 1 1 0 1 0 1 0 0 0 0	0 1 0 1 1 0 0 1 1 1 1 0	0 0 1 1 0 0 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0 0	1 0 1 1 0 1 1 1 1 0

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 3 (ต่อ) แสดงการให้คะแนน polymorphic bands โดยการใช้เทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 20 พันธุ์

รายชื่อพันธุ์ลำไย	การให้คะแนน polymorphic bands				
	OPW09	OPW06	OPX01	OPX15	OPT15
คอ	1011000100001011100	0001100001000100001100	11010111	11011100010110	10100010000011000
สีชมพู	1010000100001011100	0001100011000110001100	10010101	11011101000110	10100110000011000
เบี้ยวเขียว	0011100101000000101	0010100011000110001100	000000001	11011001001101	11000010000011101
พวงทอง	1010010110010011001	0001101001011110001101	11011111	01010110101111	10100101000011101
คอเชียงราย 13	1011100100001011100	0001100001000100001100	11010100	01000000010110	10100000000011000
นราภิรมย์	0010001000100110100	0001100001000110001000	11111101	00101001101001	00001101011110100
คอน่าน	0011100100001011100	0001010001000100001100	10010011	01011100010110	10100000000011000
กะทิ	0111100101000000101	0001100001010100001100	10011100	11011110100110	11000110000011001
ลิ้นจี่	0010100100000000101	0001000001000110001100	000000001	11011110000110	10000100000011100
พวงทอง05	1010010110010011001	0001010001111010011101	11011111	01010010101111	11100100000011100
แห้ว	0010100100000011000	0001000011000100001100	000000011	01011100011110	11100000000011100
เพชรสาคร	0110001000100110100	0001000001000110001000	11110101	00101000101001	00001101011101000
คอห้างฉัตร 46	0010110100001011000	0001100011000100001100	11110111	01011100011100	11100000100011100
คอลำพูน 01	1011100100001010100	0001100001000101001100	10010111	11011100010110	10100001000011000
คอนครพนม	0011100100001010100	0001100001000100001100	10010011	01011100010110	10100000000011000
คอหลวง	0010110100001011100	0001100001011100001100	10010010	01011100011110	10101000000011100
ปิงปอง	0100000000010010011	0110000010010001000101	11100101	01010001001011	00010101011100010
ยกเกี๊ยน	0010001000001111100	0000100011000100001000	11110101	01011001000110	10101100000011000
สุขุม	1010110100001011100	0001010001111100100001	10010011	11011110001110	10100010000011001
เวียดนาม	0110000100101111100	1010000000100111000110	10110111	00101001110110	10011100010111010

1 = สัญลักษณ์แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = สัญลักษณ์แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวเจนจิรา มาหา
วัน เดือน ปี	7 ตุลาคม พ.ศ. 2516
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนนารีนุกูล จ. อุบลราชธานี ปีการศึกษา 2531 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนลือคำหาญวารินชำราบ จ. อุบลราชธานี ปีการศึกษา 2534 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรมเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี ปีการศึกษา 2538
ประวัติการฝึกงาน	- การฝึกงานในระดับปริญญาตรี สถานีทดลองหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กิ่งอำเภอ สว่างวีระวงศ์ จ. อุบลราชธานี - สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กรป. กลาง อ. โพนยางคำ จ. สกลนคร
ประวัติในการทำงาน	- ตำแหน่งนักเกษตร กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ - ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย หน่วย DNA fingerprinting ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีทางการเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม
ทุนการศึกษา	โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากร ชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) 2542-2543
ที่อยู่	203 ถ.วารินฯ-พิบูลฯ ต. วารินชำราบ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190 โทร. (045) 321673