รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การตรวจสอบหาลายพิมพ์ประจำพันธุ์ข้าวสาลี
DNA FINGERPRINTING IN WHEAT

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ : การทดสอบศักยภาพของข้าวสาลี
เพื่อขอรับรองเป็นพันธุ์พืชใหม่

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2545
จำนวน 218,700 บาท

หัวหน้าโครงการ นายพรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์
ผู้ร่วมโครงการ นายดำเกิง ป้องพาล
นายเรืองชัย จูวัฒนสำราญ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
วันที่ 30 กันยายน พ.ศ.2545

928/48

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนจาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยจัดสรรงบประมาณในปี พ.ศ.2545 สำหรับในการทำการวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณศูนย์กล้วยไม้และไม้ดอกไม้ประดับ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้ยืมใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการตรวจสอบหาลายพิมพ์ประจำพันธุ์ข้าวสาลีในห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
คำนำ	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
เวลา และสถานที่ทำการวิจัย	9
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ	9
ผลของการวิจัย	14
วิจารณ์ผลการวิจัยและเสนอแนะ	44
สรุปผลการวิจัย	46
เอกสารอ้างอิง	48

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	หมายเลขไพรเมอร์และลำดับเบสที่ใช้ในการทดลอง	12
2.	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของไพรเมอร์ 19 หมายเลขที่นำมาใช้จำแนก	16
3.	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลีซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 หมายเลข	24
4.	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลีซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 หมายเลข	30
5.	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลีซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 หมายเลข	35
6.	ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสาลี 12 พันธุ์ วิเคราะห์โดยใช้ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD	42
7.	ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตรวมทั้งลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญของข้าวสาลี 11 สายพันธุ์ ที่ปลูกทดสอบภายใต้ 6 แหล่งปลูกฤดูแล้ง 2543/44	43

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์(ก) OPF-01 (ข) OPF-02 และ (ค) OPF-03	17
2.	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-04 (ข) OPF-06 และ (ค) OPF-08	19
3.	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-10 (ข) OPF-12 และ (ค) OPF-13	20
4.	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-14 และ (ข) OPF-15	21
5.	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-16 และ (ข) OPF-19	22
6.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-01	25
7.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-02	25
8.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-03	26
9.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-04	27
10.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-06	28
11.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-08	29
12.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-10	31
13.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-12	32
14.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-13	33
15.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-14	34
16.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-15	36
17.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-16	37
18.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-19	38
19.	การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-08, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, CPF-16 และ OPF-19	39

การตรวจสอบหาลายพิมพ์ประจำพันธุ์ข้าวสาลี
DNA FINGERPRINTING IN WHEAT

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์[1] ดำเกิง ป้องพาล[1]
PORNPHUN POOPROMPUN[1] DUMKERNG PONGPAN[1]
เรืองชัย จูวัฒนสำราญ[2] RUANGCHAI JUWATTANASOMRAN[2]

[1] ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[2] ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การตรวจสอบหาลายพิมพ์ประจำพันธุ์ข้าวสาลี ของโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสาลี ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 8 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่ทางราชการส่งเสริม 4 พันธุ์ โดยการใช้โมเลกุลเค่รื่องหมายแบบ RAPD พบว่า มีไพรเมอร์เพียง 13 หมายเลข ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ โดยไพรเมอร์หมายเลข OPF-16 แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 11 แถบ แต่มีแถบหลักเพียง 9 แถบที่สามารถแยกความแตกต่างได้ดีในช่วง 0.5-2.0 Kbp เมื่อนำผลการเกิดแถบดีเอ็นเอ(คะแนน=1) และการไม่ปรากฏแถบ(คะแนน =0) ไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้จัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 พบว่า สายพันธุ์ MJUWS 1 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS 3 และสายพันธุ์ MJUWS 6 เนื่องจากมีฐานพันธุกรรมแคบ ส่วนกลุ่มที่ 2 พบว่า สายพันธุ์ MJUWS 4 ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์ SMERNG 2 FANG 60 และพันธุ์ INSEE 1 เพราะในกลุ่มนี้มีฐานพันธุกรรมกว้าง ซึ่งผลจากการทดลองในครั้งนี้ สามารถนำไปใช้ตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ประจำสายพันธุ์ข้าวสาลี เพื่อขอรับรองเป็นพันธุ์พืชใหม่ได้

ABSTRACT

DNA fingerprinting in wheat from the wheat breeding project of Department of Agronomy, Meajo University were compared eight breeding lines with four standard cultivars. There were screening by RAPD Technique. Thirteen primers generated polymorphism and shared among the cultivars, especially primer OPF-16 showed that highest difference band total 11 bands but only 9 major bands can separate the polymorphic in during 0.5-2.0 Kbp. By the presence and absence of these markers, all of cultivars were conductec to study the genetic diversity by cluster analysis method. The result showed that they can separate two groups such as Group1. The breeding line MJUWS 1 was genetically closely MJUWS 3 and MJUWS 6 because they had narrow genetic base, Group 2. The breeding line MJUWS 4 was genetically closely related to standard cultivars SMERNG 2 FANG 60 and INSEE 1 because they had board genetic base. According to this experiment using to detect and proove different of wheat lines for evidance before release a wheat variety.

คำนำ

ข้าวสาลีเป็นธัญพืชเมืองหนาวที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งและใช้เป็นอาหารของประชากรมากที่สุดในโลก สำหรับประเทศไทยข้าวสาลีเป็นธัญพืชเมืองหนาวที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทย เพราะมีการนำเข้ามากถึงปีละ 713,716 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,577 ล้านบาทต่อปี (ไพบูลย์ และคณะ, 2540) เนื่องจากมีรายงานว่า ข้าวสาลีสามารถปรับตัวได้กว้างมากกับทุกสภาพภูมิอากาศ ทั้งในเขตชุ่มชื้น และกึ่งชุ่มชื้น แต่ปลูกได้ดีในแถบที่มีอากาศหนาวเย็น และยังปลูกได้ทุกสภาพดิน สามารถปลูกได้ตั้งแต่ดินเหนียวจนถึงดินร่วนปนทราย ในอดีตส่วนใหญ่มักจะนำพันธุ์ข้าวสาลีจากต่างประเทศเข้ามาส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก แต่ปัจจุบันข้าวสาลีได้มีการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้สามารถปลูกได้ในประเทศไทย ซึ่งเป็นเขตร้อนชื้น โดยมีเป้าหมายเพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีความสามารถในการปรับตัวได้กว้าง จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ข้าวสาลีฤดูหนาวกับฤดูใบไม้ผลิ จึงทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกลุ่มข้าวสาลี จนสามารถ

ปลูกในเขตร้อนได้มากขึ้น และสามารถดำรงอยู่ได้ในสภาพแปรปรวนสูง (งามชื่น, 2542) ข้าวสาลีมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งแต่ละพันธุ์จะมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันมาก จึงทำให้การจัดจำแนกสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมออกจากกันได้ยาก ดังนั้นต้องมีการนำเทคนิคทางชีวเคมีเข้ามาช่วยในการจำแนก และวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับโมเลกุลของข้าวสาลี

ปัจจุบันการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์พืช โดยอาศัยเทคนิค พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) มีความสำคัญมากในงานด้านอณูชีวโมเลกุล ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ และการเกษตรสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อ และโรคจากพันธุกรรม การศึกษาความผันแปร หรือกลายพันธุ์ของยีน การทำแผนที่ยีน และศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ในการปรับปรุงพันธุ์พืช งานทางด้านพีซีอาร์ (PCR) มีบทบาทมาก ในการตรวจสอบสายพันธุ์พืช การตรวจสอบพันธุ์พืชต้านทานโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรค รวมทั้งศึกษายีน อื่น ๆ ของพืชและเชื้อโรค และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้

ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ข้าวสาลีในครั้งนี้ จึงมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถใช้เป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ข้าวสาลี และทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวสาลี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ข้าวสาลี โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของข้าวสาลี
2. เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวสาลีและจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวสาลี

การตรวจเอกสาร

ข้าวสาลีเป็นธัญพืชอยู่ใน Family Gramineae อยู่ใน Genus Triticum ซึ่งพัฒนามาจากข้าวสาลี 3 สายพันธุ์ (race) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีโครโมโซม 3 แบบ (พัทธกุล, 2525) ได้แก่ พวกที่มีโครโมโซมจำนวน 7 คู่ (2n = 14) เรียกว่า diploid หรือ Einkorn ได้แก่ *T. monococum* พวกที่มีโครโมโซมจำนวน 14 คู่ (2n = 28) เรียกว่า tetraploid หรือ Emmer ได้แก่ *T. dicocoides*, *T. dicoccum* และ *T. durum* และพวกที่มีโครโมโซมจำนวน 21 คู่ (2n = 42) เรียกว่า hexaploid หรือ Vulgare ได้แก่ *T. aestivum*, *T. spelta* และ *T. compactum* (Kent, 1983) ซึ่งพันธุ์ข้าวสาลีที่ปลูกในประเทศไทยเป็นชนิด *T. aestivum* โดยนำมาจากประเทศออสเตรเลีย ประเทศอินเดีย ประเทศญี่ปุ่น ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศเม็กซิโก แต่ข้าวสาลีที่ปลูกทั่วไปในที่ต่าง ๆ ทั่วโลกที่สำคัญมี 3 ชนิด (อรอนงค์, 2540) ได้แก่

1. *T. asetivum* หรือ *T. vulgare* ซึ่งเป็นข้าวสาลีที่ปลูกทั่วไปประมาณ 92% ของผลผลิตทั้งหมด ซึ่งใช้ทำขนมปังเป็นส่วนใหญ่

2. *T. durum* เป็นข้าวสาลีที่มีเนื้อในเมล็ด (endosperm) สีเหลือง เมล็ดแข็ง ใช้ทำมักกะโรนี และสปาเก็ตตี

3. *T. compactum* เป็นข้าวสาลีที่มีเนื้อในเมล็ดสีขาว อ่อนนุ่ม ใช้ทำคุกกี้ เค้ก บิสกิต

ข้าวสาลี ที่ปลูกทั่วไปเป็นพวก *Triticum asetivum* (2n=6x) มีขนาดจีโนม เท่ากับ 16,000 Mb ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าของข้าว(415 Mb) ถึง 16 เท่าประมาณ โดยจีโนมของข้าว มีขนาดเพียง 415 Mb แสดงให้เห็นว่า ข้าวสาลีมีจีโนมขนาดใหญ่มาก ในการจำแนกจะทำได้ยากกว่าพืชชนิดอื่นที่เป็น diploid (2n=2x)

เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจำแนกพันธุ์พืช

การจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืช ส่วนใหญ่จะใช้ลักษณะภายนอกที่ปรากฏออกมาให้เห็น (phenotype) เช่น ลักษณะสีดอก สีเมล็ด ลักษณะและขนาดใบ ลักษณะการเจริญเติบโต เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีอณูชีวโมเลกุลมาใช้ประโยชน์กับงานด้านการจำแนกพันธุ์พืชมากขึ้น ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีภายในต้นจะแสดงวิวัฒนาการของพืชได้ดีที่สุด พืชต่างพันธุ์อาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันได้ แต่ในทางชีวเคมี และชีวโมเลกุลพืชจะ

มีความแตกต่างกัน (Abbott, 1986. Larser, 1969 และ Gottlied, 1977 อ้างโดย นวลพรรณ, 2542)

ในการจำแนกพันธุ์พืชมีการใช้เอ็นไซม์ โปรตีน หรือดีเอ็นเอ เข้ามาช่วย แต่ทั้งโปรตีนและเอ็นไซม์เป็นผลผลิตของยีน ซึ่งสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ย่อมมีผลต่อการแสดงออกไม่มากก็น้อย จึงได้มีการพัฒนา เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) มาช่วยในการศึกษาพันธุกรรมในระดับของดีเอ็นเอ โดยการใช้ไพรเมอร์ที่เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นชนิดสายเดี่ยวมีเบส 10 ตัว เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งต้องอาศัยเทคนิคทางด้าน Polymerase Chain Reaction (PCR) เข้าช่วย จึงจะใช้จำแนกความแตกต่างในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดได้ (จิรพร, 2542)

หลักการของพีซีอาร์

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In Vitro* enzymatic gene Amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาไม่นาน โดยการใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase ช่วยในสร้างดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น เริ่มจากดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 โมเลกุล เมื่อนำมาสังเคราะห์ในพีซีอาร์ประมาณ 30-40 รอบ จะเพิ่มโมเลกุลขึ้นเป็นจำนวนล้านในเวลาเพียง 3-4 ชั่วโมงเท่านั้น ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด, oligonucleotide primer 1 คู่ และบัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม (สุรินทร์, 2536, วีระพงศ์, 2539) ซึ่งในการทำงานของพีซีอาร์ มีขั้นตอนที่สำคัญ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) คลายเกลียวแยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยวอยู่เป็นอิสระ และทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ
2. Annealing ไพรเมอร์ที่มีเบส 10 ตัว จะเข้าไปจับกับเบสที่เป็นคู่สมของแต่ละตัวบนดีเอ็นเอต้นแบบเกิดขึ้นที่อุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส
3. Extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ต่อเนื่องจากจุดที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมีเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวทำให้มีการต่อเชื่อมไพรเมอร์ด้วย dNTPs (พรพันธ์, 2538)

สารพันธุกรรมจะมีการเรียงตัวของลำดับเบส A, G, C, T ต่างกัน และใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ เข้ามาช่วยขยายปริมาณของดีเอ็นเอ โดยการจับของไพรเมอร์แบบสุ่ม (Random primer) ซึ่งจะสุ่มเอาบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณ เช่นเดียวกับขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Replication DNA) ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (วัชรี และมนตรี, 2536)

วสันต์ และคณะ (2539) กล่าวถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงาน PCR และต้องปรับให้มีความเหมาะสมดังนี้คือ

1. ไพรเมอร์ (Primers) ขนาดความยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย guanine กับ cytosine มีลำดับของนิวคลีโอไทด์คู่สมกับทางปลาย 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และค่า Tm (temperature melting) ของแต่ละไพรเมอร์ อยู่ในช่วง 55 – 80 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.1-0.5 µM

2. ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ควรอยู่ในช่วง 1.0-2.5 units ต่อ 100 µl ถ้าใช้เอ็นไซม์ปริมาณสูงเกินไปจะก่อให้เกิด PCR products ที่ไม่จำเพาะขึ้น

3. ความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg^{2+}) โดยทั่วไปมีการใช้ dNTPs ความเข้มข้น 200 µM ซึ่งความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 0.5-2.5 mM แต่ถ้ามีการใช้ในปริมาณที่สูงกว่านี้ต้องมีการปรับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ให้สูงขึ้นด้วย เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับ Mg^{2+} ดังนั้นถ้ามีปริมาณ dNTPs มากเกินไปมันจะไปจับกับ Mg^{2+} ในปริมาณที่มากจนทำให้เหลือ Mg^{2+} ในรูปอิสระมีไม่เพียงพอสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR

4. deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ต้องมี pH เท่ากับ 7.0 ความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 µM

5. buffer สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่นิยมใช้คือ 10-50 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8 และมี KCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 mM รวมอยู่ด้วย KCl ทำหน้าที่ในการเร่งการเกิด primer annealing ถ้าความเข้มข้นของ KCl มากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

6. Primer annealing การเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ ในขั้นนี้จะขึ้นกับลำดับเบส ความยาว และความเข้มข้น ของ primer ที่ใช้ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 50-55 องศาเซลเซียส สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการ annealing ใช้ระยะเวลาไม่กี่วินาทีเท่านั้น

7. Primer extension คือเวลาที่ใช้ในการสร้างสาย DNA ในขั้นนี้จะขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น ลำดับเบสของ DNA โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 72 องศาเซลเซียส และเวลา 1 นาที

8. Denaturation การตั้งอุณหภูมิที่ต่ำ หรือเวลาที่สั้นเกินไปทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายแยกสายได้ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ PCR products ลดลง แต่ถ้าให้อุณหภูมิสูง หรือใช้เวลานานเกินไป จะทำให้เอ็นไซม์สูญเสียสภาพเร็วเกินไปโดยเปล่าประโยชน์ โดยทั่วไปนิยมให้อุณหภูมิในช่วง 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

9. ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลกระทบต่อการทดลอง เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้ว และภาชนะต่าง ๆ ที่ใช้งาน PCR ควรล้างให้สะอาดปราศจากสารซักฟอก (detergent) น้ำที่ใช้ในงานควรมีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากเอ็นไซม์ nucleases ต่าง ๆ

การจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืช

นิตย์ศรี และคณะ (2537) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหญ้าแฝก 10 พันธุ์ โดยอาศัยแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าแฝกแต่ละพันธุ์ไปเปรียบเทียบความเหมือน และความแตกต่างทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างและความสัมพันธ์ของหญ้าแฝกแต่ละพันธุ์ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ได้มีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี แยกความแตกต่างของกวาวเครือ 5 ชนิด จากการใช้ไพรเมอร์ 30 ชนิด พบว่ามีเพียง 4 ชนิด (PK14, PW14, PA05 และ PAH17) ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถนำมาแยกความแตกต่างของกวาวเครือทั้ง 5 ชนิดได้ และแต่ละตัวอย่างของพืชทดลอง จะใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเฉพาะในแต่ละไพรเมอร์ด้วย (นวลน้อย, 2539)

การจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งในอดีตการขอรับรองและออกมาเป็นพันธุ์ใหม่เป็นเรื่องยุ่งยากและซับซ้อน แต่เมื่อใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องหมาย หรือเทคนิคอาร์เอพีดีแล้ว สามารถจำแนกสายพันธุ์ถั่วเหลืองจากเมล็ดแห้งได้ โดยใช้ไพรเมอร์ 30 หมายเลข เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของถั่วเหลือง พบว่า มีไพรเมอร์ 2 เลขหมายแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน 9 สายพันธุ์ จากจำนวนทั้งหมด 18 สายพันธุ์ กล่าวได้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีช่วยให้การจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองสะดวกขึ้น (Jianhua *et al.*, 1996)

เทคนิคอาร์เอพีดี นอกจากจะใช้ในการจำแนกความแตกต่างในพืชแล้ว ยังเป็นเทคนิคที่เหมาะสม และสะดวกในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์พ่อแม่กับลูกผสม F1

ได้ดี โดยใช้ศึกษาในข้าว (*Oryza sativa* L.) พบว่าลูกผสมกับ F1 จะมีแถบดีเอ็นเอที่ได้รับมาจากพ่อ และแม่ (Wang et al., 1994) ต่อมา Buso et al. (1998) ได้ทำการศึกษาชนิดของข้าวป่า (*Oryaza* sp.) ที่อาศัยในอเมริกาใต้ โดยใช้ isozyme และ RAPD maker เป็นตัวประเมินระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวป่าอเมริกาใต้ 4 ประชากร (*Oryaza glumaepatula*) ที่เก็บในป่าอะเมซอน และแม่น้ำบราซิลตะวันออก พบว่ามีความแปรปรวนระหว่างประชากรมากกว่า ความแปรปรวนภายในประชากรเดียวกันยืนยันด้วยการวิเคราะห์ AMOVA ซึ่งแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรม ส่วนมากเนื่องมาจากความแตกต่างในหมู่ประชากร

อำภร (2542) ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ปอสา (Paper mulberry) ใน Family Moraceaeได้แก่ ปอสา *Broussonetia papyrifera* ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดเลย จังหวัดหนองคาย จังหวัดเพชรบูรณ์ ประเทศลาว และ *Broussonetia kurzil* ได้แก่พันธุ์สะแล ส่วน Family Thymelaeaceae ได้แก่ ปอสาพันธุ์ Mitsumata (*Edgeworthia papyeifera*) จากประเทศญี่ปุ่นโดยใช้เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 15 หมายเลข เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าไพรเมอร์ OPF-02, OPF-03, OPF-09, OPF-10, OPF-13 และ OPF-14 แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยวิธี average group พบว่าสามารถจัดกลุ่มปอสาได้ 2 กลุ่ม ใหญ่ ๆ คือ กลุ่มแรกได้แก่ ปอสาที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดหนองคาย กลุ่มที่สองได้แก่ ปอสาที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดกาญจนบุรี ประเทศลาว จังหวัดเลย และจังหวัดเพชรบูรณ์ ส่วนปอสาญี่ปุ่น และสะแลสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมออกจากปอสาอื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน

เวลา และสถานที่

เวลา	ดำเนินการ	เดือนกุมภาพันธ์ 2545
	ดำเนินการเสร็จสิ้น	เดือนมิถุนายน 2545
สถานที่	ห้องปฏิบัติการการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ อาคารศูนย์กล้วยไม้และไม้ดอกไม้ประดับ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่	

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

ข้าวสาลีสายพันธุ์ปรับปรุงก้าวหน้า (advanced breeding line) จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสาลี ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 8 สายพันธุ์ และพันธุ์มาตรฐาน (standard or check variety)ที่ใช้เปรียบเทียบ ดังนี้

1. MJUWS 1
2. MJUWS 2
3. MJUWS 3
4. MJUWS 4
5. MJUWS 5
6. MJUWS 6
7. MJUWS 7
8. MJUWS 8
9. SMG 1 (check)
10. SMG 2 (check)
11. FANG 60 (check)
12. INSEE 1 (check)

อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
3. เครื่อง Electrophoresis gel system
4. เครื่องเขย่า (vortex)
5. เครื่องดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้รังสีอุลตร้าไวโอเลต (UV transilluminator)
6. หน้ากากป้องกันรังสีอุลตร้าไวโอเลต
7. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
8. ตู้ทำความเย็น
9. เครื่องชั่งอย่างละเอียด
10. Hot plate stirrer
11. กล้องถ่ายภาพดิจิตอล
12. โกร่งบด และแท่งบด
13. หลอดทดลองขนาด 0.2, 1.5 ml ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และที่วางหลอดทดลอง
14. ขวดรูปชมพู่ (flask)
15. บีกเกอร์ (beaker)
16. กระบอกตวง ขนาด 100, 250 และ 1,000 ml
17. micropipette ขนาด P20, P100 และ P1,000 พร้อมด้วย tip ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
18. เทอร์โมมิเตอร์
19. ขวดน้ำกลั่น
20. ถุงมือ
21. ปากคีบ
22. กระดาษทิชชู
23. นาฬิกาจับเวลา
24. ปากกาเขียนหลอดทดลอง (marker)
25. สมุดบันทึกผลการทดลอง

สารเคมี

1. CTAB (Hexadecyltrimethy ammonium bromide)
2. TAE buffer
3. 0.5 M EDTA (Ethylene diaminetetra acetic acid disodium salt, $CHN_2O_3Na.\ 2H_2O$)
4. 2-mercaptoethanol
5. Chlorofrom – isoamyl alcohol
6. Isopropanal
7. 75% ethanol + 10 mM ammonium acetrate
8. 75% ethanol
9. ethidium bromide
10. agarose gel
11. 10 x PCR buffer
12. 1 mM dNTPs
13. 2 μM Primer
14. 1.0 *Taq* DNA polymerase
15. Loading dye
16. TE – dye
17. RNase
18. น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
19. alcohol 70%
20. Primer จำนวน 19 หมายเลข ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หมายเลขไพรเมอร์และลำดับเบสที่ใช้ในการทดลอง

หมายเลขไพรเมอร์	ลำดับเบส
OPF-01	5′-ACGGATCCTG-3′
OPF-02	5′-GAGGATCCCT-3′
OPF-03	5′-CCTGATCACC-3′
OPF-04	5′-GGTGATCAGG-3′
OPF-06	5′-GGGAATTCGG-3′
OPF-07	5′-CCGATATCCC-3′
OPF-08	5′-GGGATATCGG-3′
OPF-09	5′-CCAAGCTTCC-3′
OPF-10	5′-GGAAGCTTGG-3′
OPF-11	5′-TTGGTACCCC-3′
OPF-12	5′-ACGGTACCAG-3′
OPF-13	5′-GGCTGCAGAA-3′
OPF-14	5′-TGCTGCAGGT-3′
OPF-15	5′-CCAGTACTCC-3′
OPF-16	5′-GGAGTACTGG-3′
OPF-17	5′-AACCCGGGAA-3′
OPF-18	5′-TTCCCGGGTT-3′
OPF-19	5′-CCTCTAGACC-3′
OPF-20	5′-GGTCTAGAGG-3′

วิธีการดำเนินการ

การเพาะต้นข้าวสาลีจากเมล็ดของแต่ละสายพันธุ์ และทำการดูแลรักษา จนกระทั่งข้าวสาลีมีการเจริญเติบโตในระยะแตกกอ จึงทำการเก็บใบไปสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนของข้าวสาลีทั้ง 12 สายพันธุ์ โดยการนำใบอ่อนข้าวสาลีจากแต่ละตัวอย่างประมาณ 500 mg มาใส่ในโกร่งที่แช่เย็นจัด จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวให้พอท่วมใบแล้วบดให้ละเอียดด้วยที่บด ตักใบที่บดแล้วใส่ในหลอดทดลองด้วยช้อนตักแล้วเติมด้วยสารละลาย CTAB ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) ส่วนหนึ่งเก็บไว้ในสภาพใต้จุดเยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งนำมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 5 ng/μl เพื่อทำปฏิกิริยา RAPD

การปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

การปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) ให้ได้ 5 ng/μl เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) ในหลอดทดลอง thin wall ปริมาตร 20 μl โดยการใช้ดีเอ็นเอของแม่พิมพ์ 20 ng, 1x PCR buffer, 100 μM dNTPs, 0.2 μM primer, 0.5 unit *Taq* DNA polymerase โดยให้สภาวะของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

95°C	5 min	1 cycle
95°C	1 min	
37°C	1 min	45 cycle
72°C	2 min	
72°C	7 min	1 cycle
4°C	α	

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprinting)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสาลีโดยเทคนิค RAPD ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการสุ่มจับดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีปริมาณมาก หลังจากนั้นจึงทำการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยอาศัยการแยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วยน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของตัวอย่างด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีส เมื่อทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ มาวิเคราะห์ผลโดยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีส บนอากาโรสเจล 1.6 เปอร์เซ็นต์ ใน TAE buffer กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์

การบันทึกข้อมูล และการวิเคราะห์

การบันทึกภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (banding pattern) ด้วยกล้องดิจิตอล ภายใต้รังสีอุลตร้าไวโอเลต(UV) หลังจากนั้นนำภาพลายพิมพ์มาพิจารณา เมื่อสังเกตเห็นความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลีแต่ละสายพันธุ์ โดยการให้คะแนนแบบ Binarym คือ เมื่อปรากฏแถบให้คะแนน เท่ากับ 1 และการไม่ปรากฏของแถบให้คะแนน เท่ากับ 0 หลังจากนั้นนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อจัดกลุ่มพันธุ์กรรมของสายพันธุ์ข้าวสาลี ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป STATISTICA

ผลการทดลอง

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวสาลี 12 สายพันธุ์ ด้วยสารละลาย CTAB ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) แล้ว นำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในปฏิกิริยาพีซีอาร์(Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด RAPD จำนวน 19 หมายเลข ซึ่งมีลำดับเบสแตกต่างกัน(ตารางที่ 1) ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถสุ่มจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ของตัวอย่างข้าวสาลี จนทำให้แสดงความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ข้าวสาลีได้ จากวิเคราะห์ มีจำนวน 13 หมายเลขได้แก่ OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-08, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, OPF-16 และ

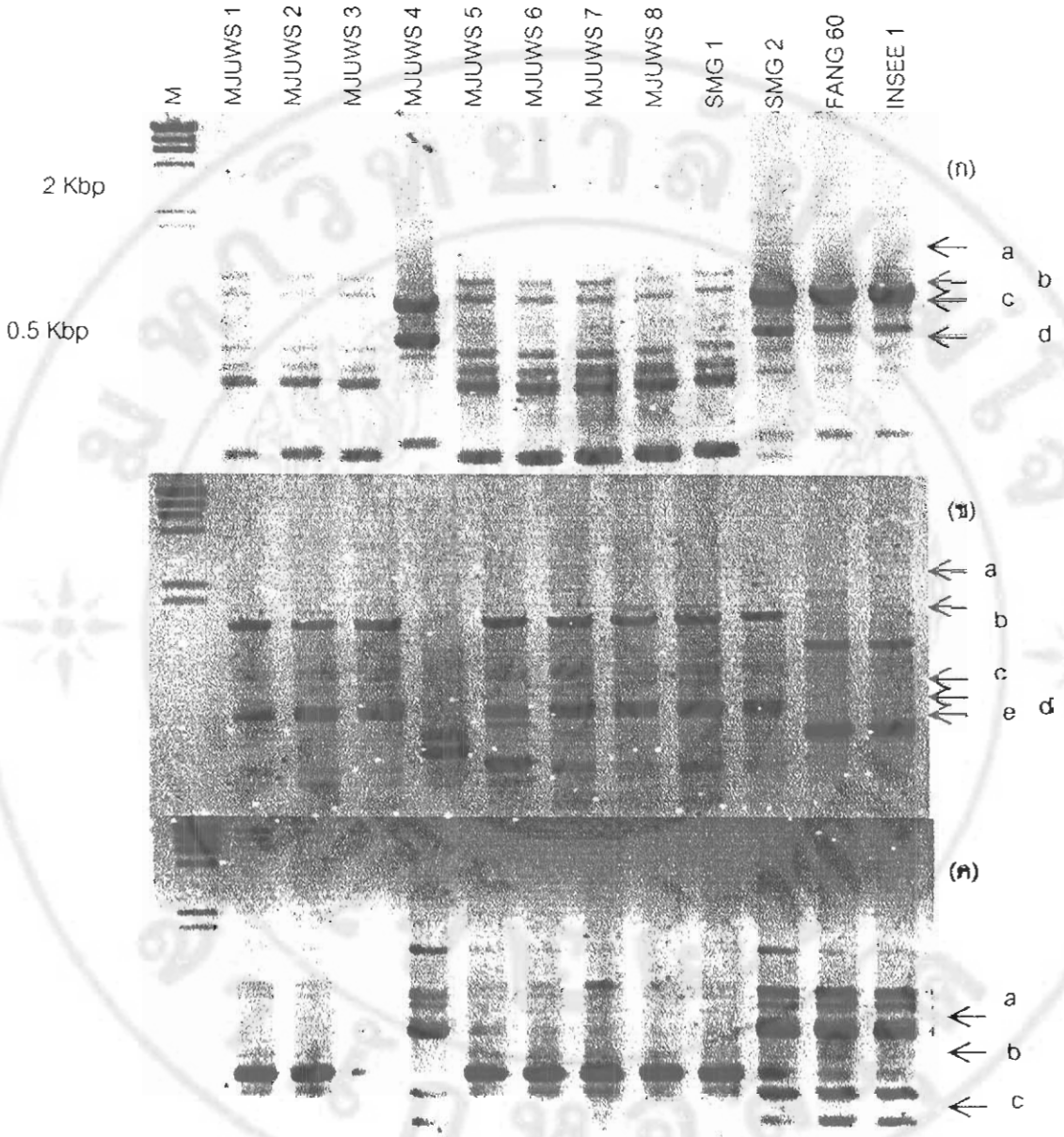
OPF-19 ซึ่งไพรเมอร์ ทั้ง13 หมายเลข ที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวสาลี โดยพิจารณาจากความชัดเจนของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ และในการตรวจสอบความแตกต่างใช้เป็นแถบหลัก(major band) พบว่า มีแถบที่แสดงความแตกต่างทั้งหมดจำนวน 106 แถบ แต่จำนวนแถบที่แสดงความแตกต่างและเป็นแถบหลักที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งอยู่ในช่วง 0.5 –2.0 Kbp มีจำนวน 60 แถบ (ตารางที่ 2) ซึ่งสามารถจำแนกออกเป็นแต่ละไพรเมอร์ ได้ดังต่อไปนี้

โดยไพรเมอร์หมายเลข OPF-01 พบ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แสดงความแตกต่างทั้งหมดจำนวน 11 แถบเท่ากับจำนวนแถบหลัก และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลี โดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อยู่ในช่วง 0.5 –2.0 Kbp จำนวน 4 แถบ แต่ไพรเมอร์หมายเลข OPF-02 พบ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แสดงความแตกต่างทั้งหมดจำนวน 9 แถบเท่ากับจำนวนแถบหลัก และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลี โดยอาศัยลายพิมพ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.5 –2.0 Kbp จำนวน 5 แถบ ส่วนไพรเมอร์หมายเลข OPF-03 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 9 แถบ แต่แถบหลักที่แสดงความแตกต่างกันมีจำนวน 8 แถบ และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp จำนวน 3 แถบ (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของไพรเมอร์ 19 หมายเลข ที่นำมาใช้จำแนก

หมายเลขไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างอยู่ในช่วง 0 5 –2.0 Kbp
OPF-01	11	11	4
OPF-02	9	9	5
OPF-03	9	8	3
OPF-04	7	7	3
OPF-06	11	10	3
OPF-07	-	-	-
OPF-08	7	7	6
OPF-09	-	-	-
OPF-10	8	5	3
OPF-11	-	-	-
OPF-12	9	7	6
OPF-13	14	9	7
OPF-14	11	9	4
OPF-15	11	9	4
OPF-16	12	11	9
OPF-17	-	-	-
OPF-18	-	-	-
OPF-19	4	4	3
OPF-20	-	-	-
รวม	123	106	60

หมายเหตุ ไพรเมอร์หมายเลข OPF-07, OPF-09, OPF-11, OPF-17, OPF-18 และ OPF-20 ไม่มี PCR Products



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-01 (ข) OPF-02 และ (ค) OPF-03

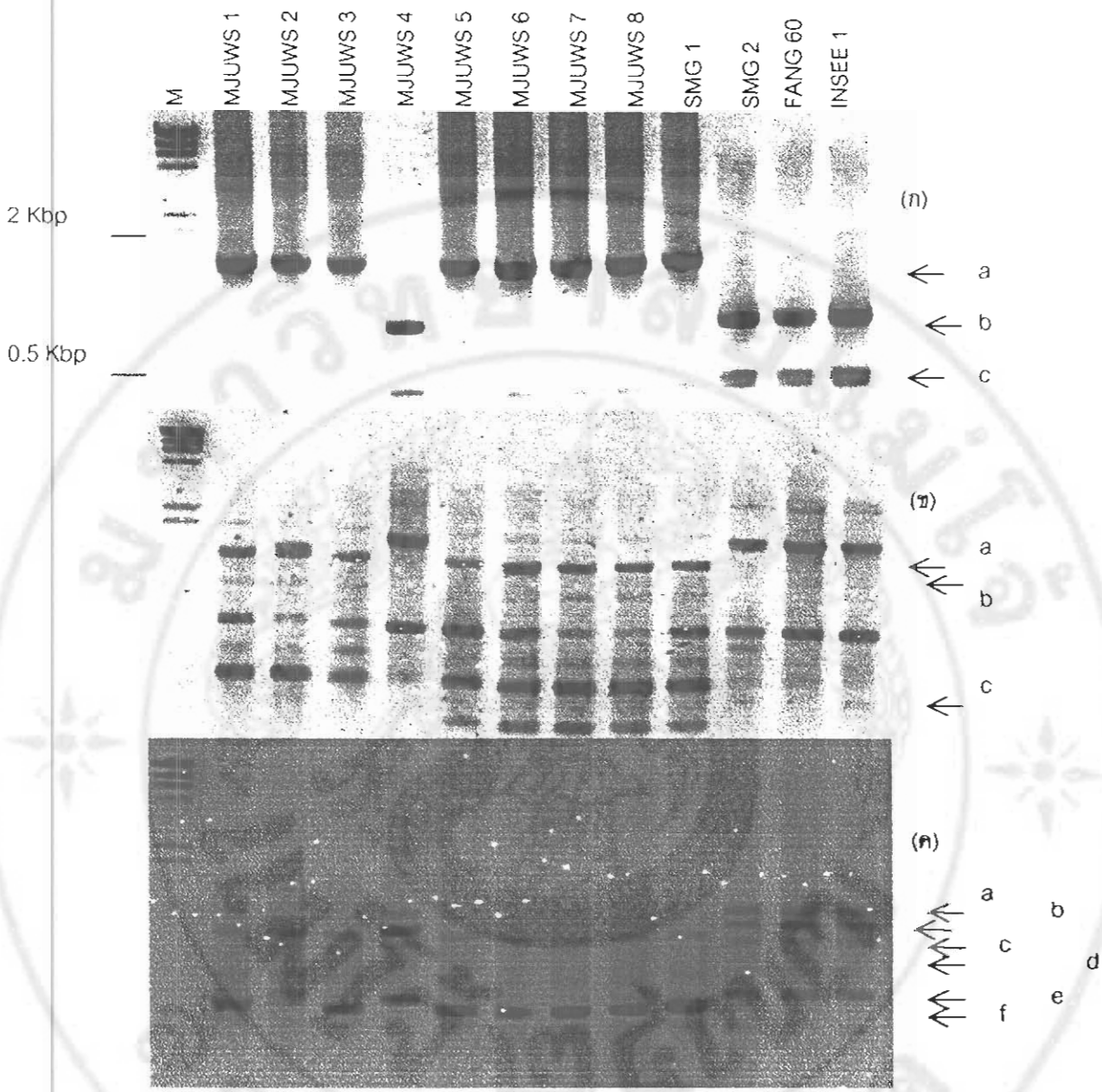
M = Lambda DNA *Hind* III marker ตำแหน่งที่ลูกศรชี้มีความแตกต่างกัน

แต่ไพรเมอร์หมายเลข OPF-04 พบ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แสดงความแตกต่างทั้งหมด 7 แถบเท่ากับจำนวนแถบหลัก และการจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อยู่ในช่วง 0.5 –2.0 Kbp จำนวน 3 แถบ ส่วนไพรเมอร์หมายเลข OPF-06 พบ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ความแตกต่างกันทั้งหมด 11 แถบ แต่จำนวนแถบหลักที่แสดงความแตกต่างกัน 10 แถบ และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp จำนวน 3 แถบ และไพรเมอร์หมายเลข OPF-08 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงความแตกต่างทั้งหมด 7 แถบเท่ากับจำนวนแถบหลัก และการจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp จำนวน 6 แถบ (ภาพที่ 2)

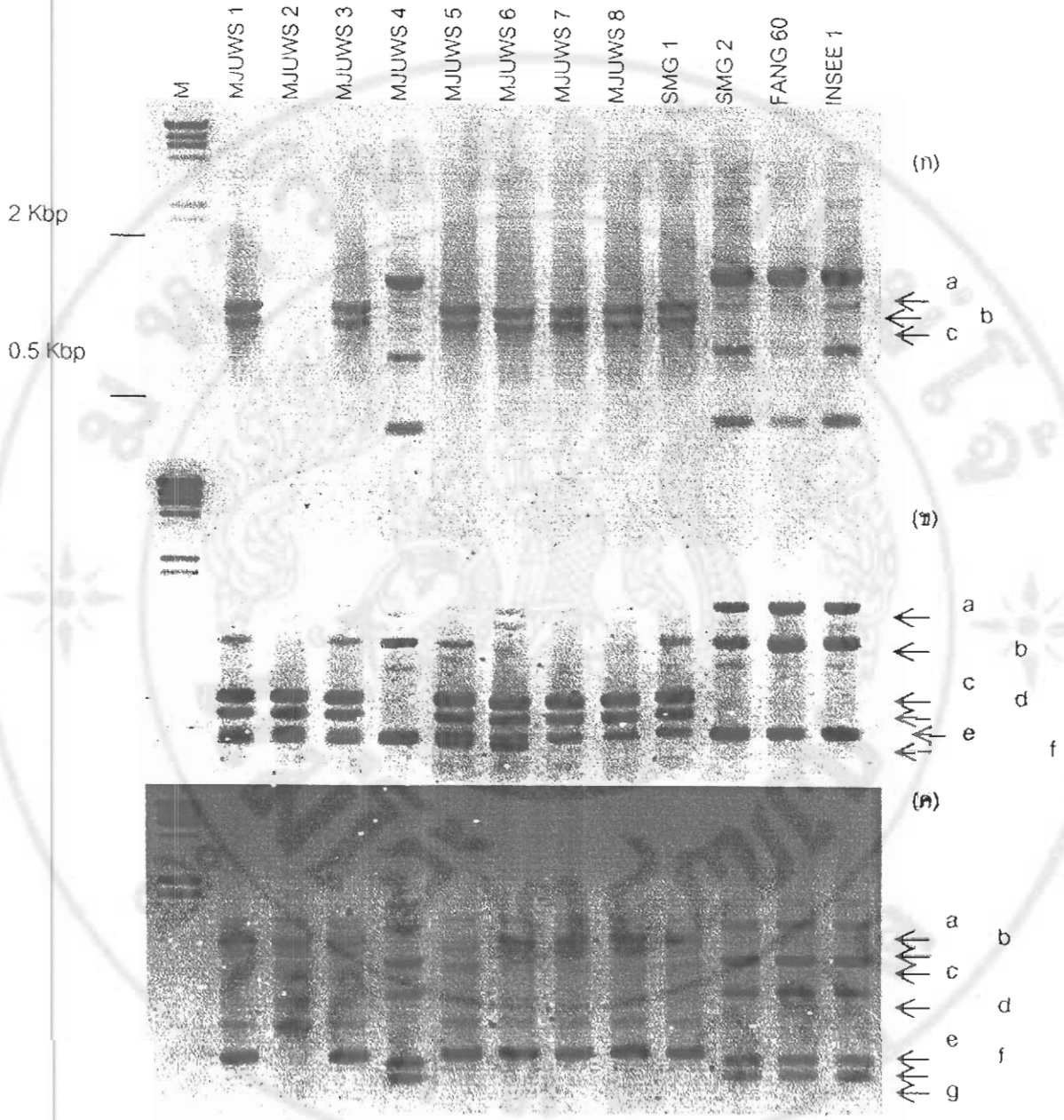
ไพรเมอร์หมายเลข OPF-10 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 9 แถบ แต่แถบหลักที่แสดงความแตกต่างกันมีจำนวน 5 แถบ และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp จำนวน 3 แถบ และไพรเมอร์หมายเลข OPF-12 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 9 แถบ แต่แถบหลักที่แสดงความแตกต่างกันมีจำนวน 7 แถบ และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp จำนวน 6 แถบ ไพรเมอร์หมายเลข OPF-13 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 14 แถบ แต่แถบหลักที่แสดงความแตกต่างกันมีจำนวน 9 แถบ และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp จำนวน 7 แถบ (ภาพที่ 3)

ส่วนไพรเมอร์หมายเลข OPF-14 และหมายเลข OPF-15 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากันทั้งจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏความแตกต่างทั้งหมด 9 แถบ และแถบหลักที่แสดงความแตกต่างกันมีจำนวน 5 แถบ ส่วนในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp พบจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากัน จำนวน 3 แถบ (ภาพที่ 4)

แต่ไพรเมอร์หมายเลข OPF-16 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 12 แถบ แต่แถบหลักที่แสดงความแตกต่างกันมีจำนวน 11 แถบ และในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp จำนวน 9 แถบ ไพรเมอร์หมายเลข OPF-19 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แสดงความแตกต่างทั้งหมด 4 แถบเท่ากับจำนวนแถบหลัก และการจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.5 –2.0 Kbp จำนวน 3 แถบ (ภาพที่ 5)

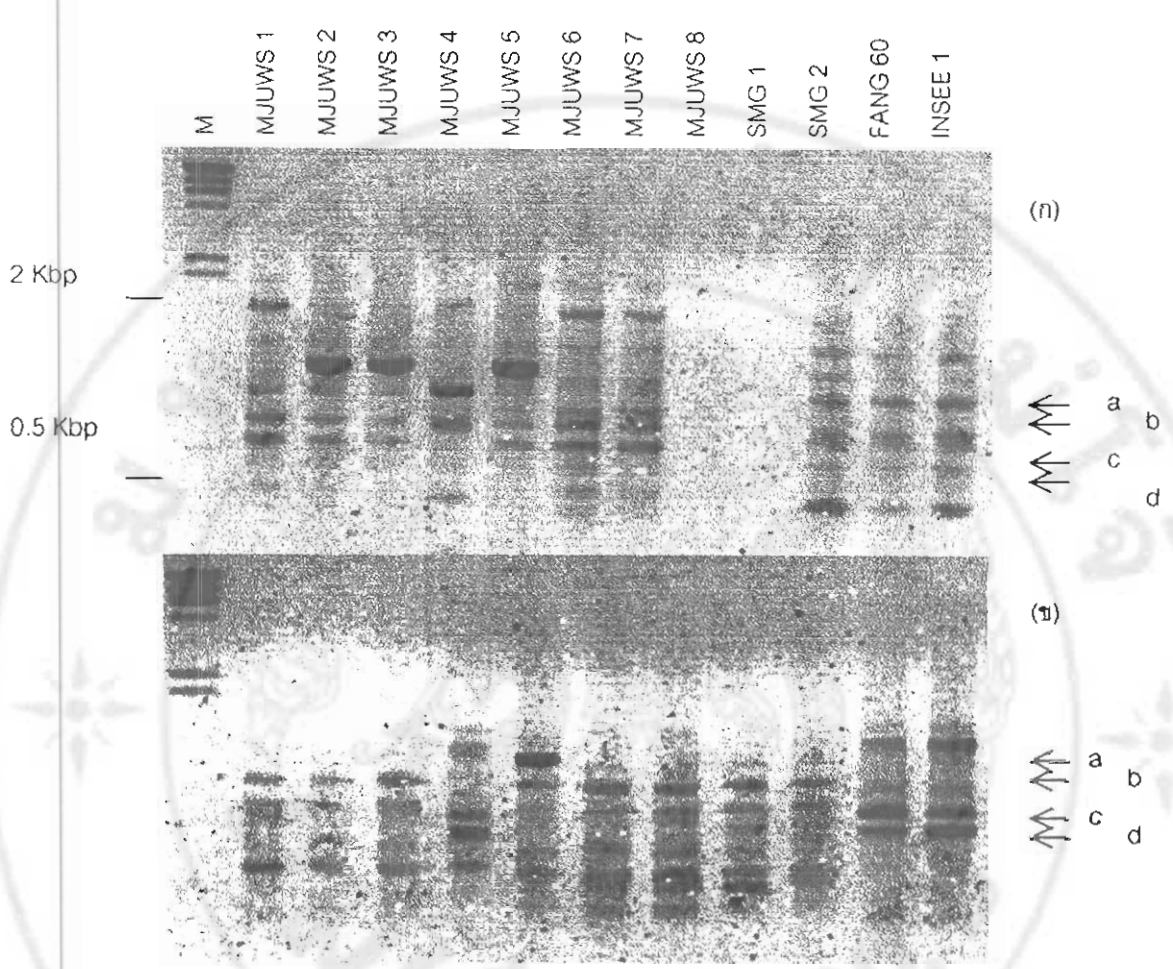


ภาพที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-04 (ข) OPF-06 และ (ค) OPF-08 M = Lambda DNA *Hind* III marker ตำแหน่งที่ลูกศรชี้มีความแตกต่างกัน



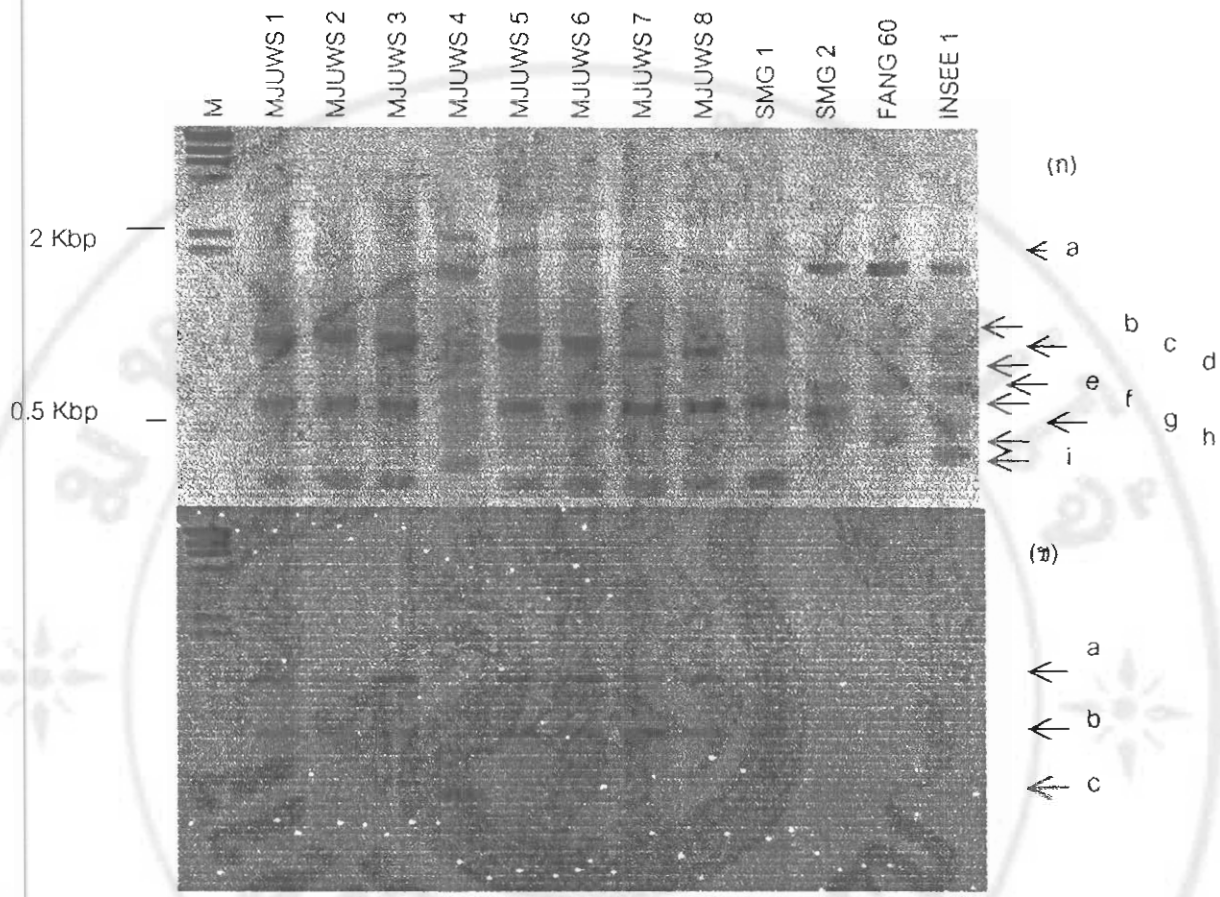
ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-10 (ข) OPF-12 และ (ค) OPF-13

M = Lambda DNA *Hind* III marker ตำแหน่งที่ลูกศรชี้มีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-14 และ (ข) OPF-15

M = Lambda DNA *Hind* III marker ตำแหน่งที่ลูกศรชี้มีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวสาลีที่ใช้ไพรเมอร์ (ก) OPF-16 และ (ข) OPF-19

M = Lambda DNA *Hind* III marker ตำแหน่งที่ลูกศรชี้มีความแตกต่างกัน

การจัดกลุ่มข้าวสาลี

การจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวสาลี โดยพิจารณาจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลักษณะการปรากฏ (1) และการไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลี เมื่อใช้ไพรเมอร์ 13 หมายเลข ได้แก่ OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-08, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, OPF-16 และ OPF-20 ที่เกิดจากการสุ่มจับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) กับจำนวน 12 ตัวอย่าง(สายพันธุ์) จากการการจัดกลุ่มพันธุกรรม ตามวิธี Cluster analysis ด้วยการใช้โปรแกรม STATISTICA เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ข้าวสาลี โดยไพรเมอร์แต่ละหมายเลขสามารถจัดกลุ่มของพันธุ์ เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสาลี 12 พันธุ์ ดังนี้

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-01 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 3) พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 6) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยพันธุ์ SMG2 FANG60 และ พันธุ์ INSEE1

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-02 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 3) พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 7) ดังต่อไปนี้

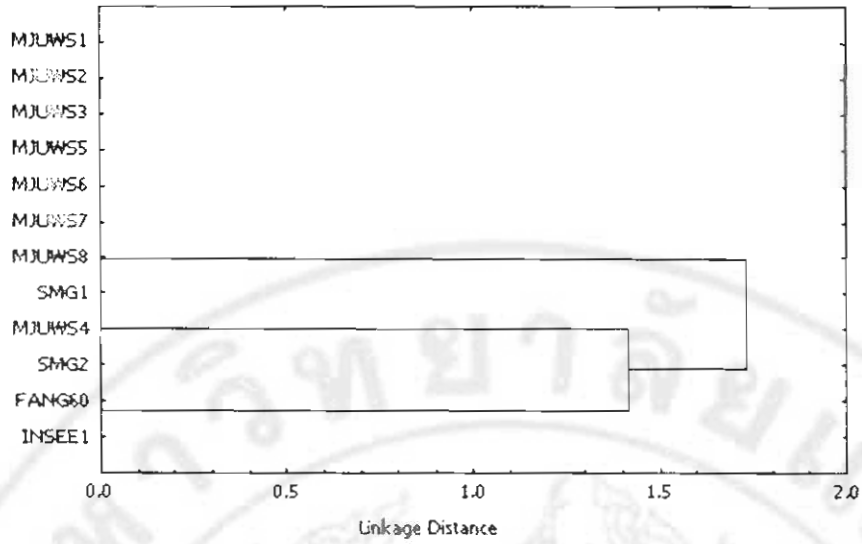
กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 พันธุ์ SMG1 และ พันธุ์ SMG2

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

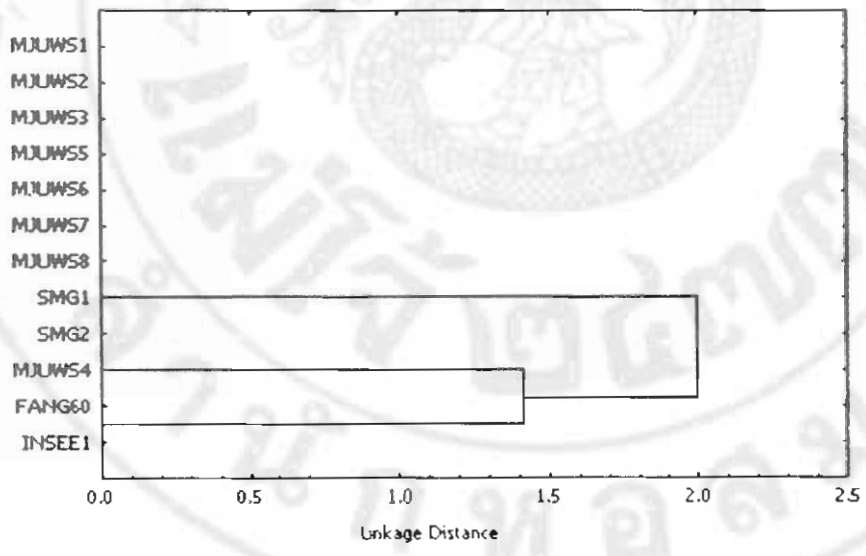
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE 1

ตารางที่ 3 การปรากฏ(1) และไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลี ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 หมายเลข

ตัวอย่างที่	OPF-01				OPF-02					OPF-03			OPF-04			OPF-06		
	a	b	c	d	a	b	c	d	e	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
3	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
4	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
5	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
6	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
7	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
8	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
9	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
10	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
11	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
12	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0



ภาพที่ 6 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-01



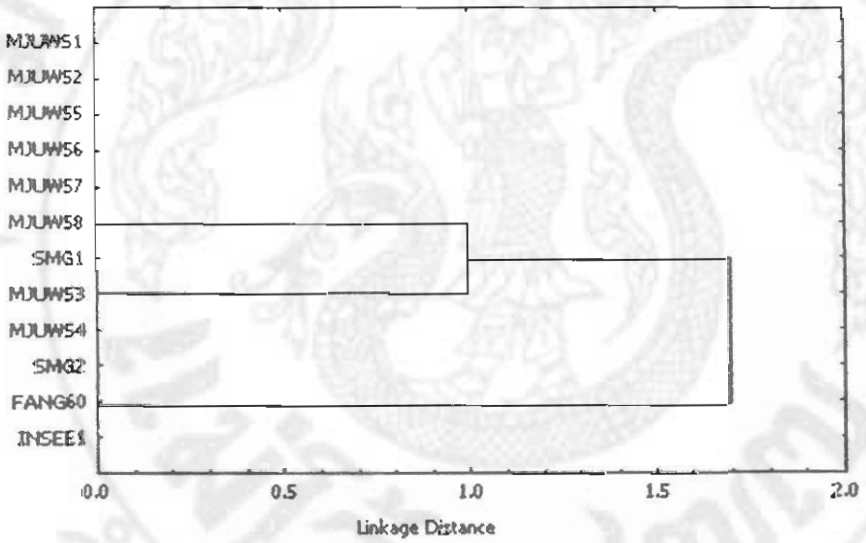
ภาพที่ 7 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-02

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-03 ตรวจลายพิมพ์ (ตารางที่ 3) พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 8) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS3

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS4 พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1



ภาพที่ 8 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-03

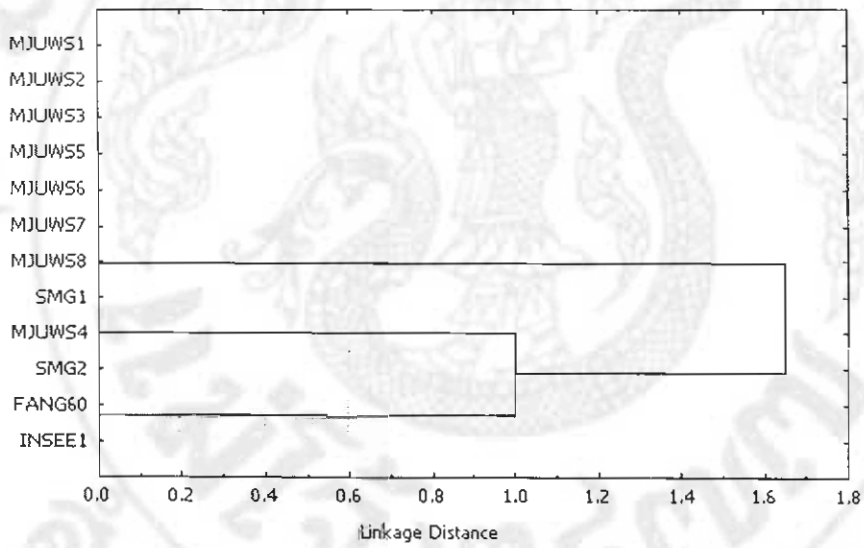
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-04 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 3) พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 9) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1



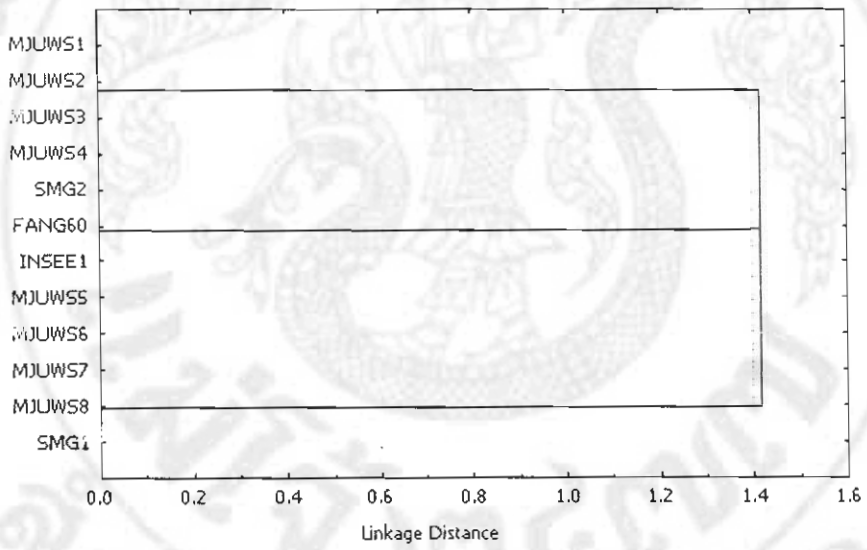
ภาพที่ 9 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-04

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-06 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 3) พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 10) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 และสายพันธุ์ MJUWS3

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS4 พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และพันธุ์ INSEE1

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1



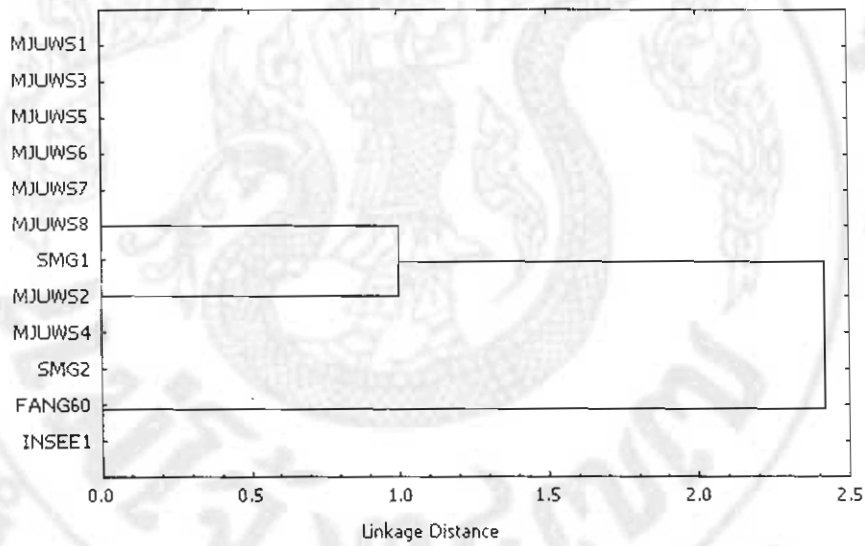
ภาพที่ 10 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-06

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-08 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4) พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 11) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS3 MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS2

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4 พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1



ภาพที่ 11 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-08

ตารางที่ 4 การปรากฏ(1) และไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลี ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 หมายเลข

ตัวอย่างที่	OPF-08						OPF-10			OPF-12						OPF-13						
	a	b	c	d	e	f	a	b	c	a	b	c	d	e	f	a	b	c	d	e	f	g
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	0	0	1	0	0	0	-	-	-	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
4	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
5	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
7	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
8	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
9	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
10	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
11	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
12	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0

หมายเหตุ (-) หมายถึงไม่มี PCR Products

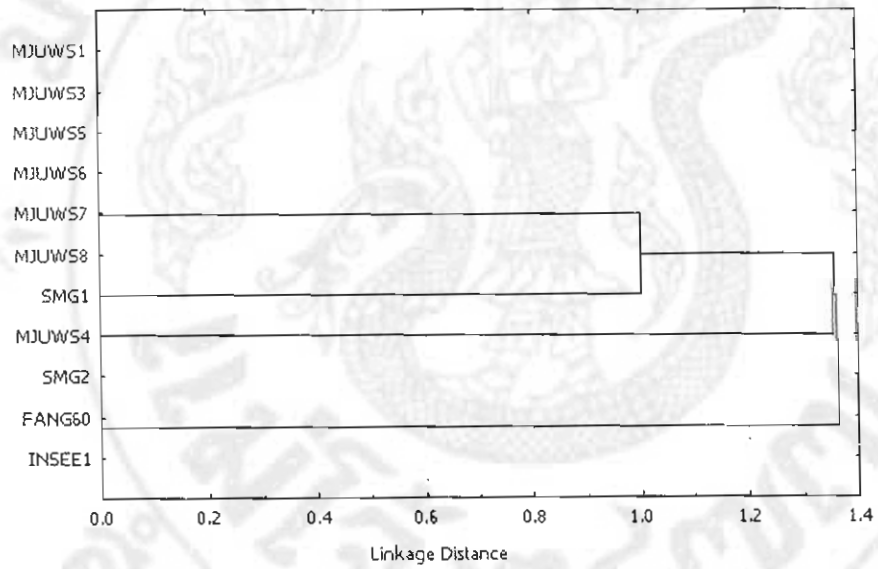
ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-10 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4) พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 12) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS3 MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 และสายพันธุ์ MJUWS8

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1



ภาพที่ 12 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-10

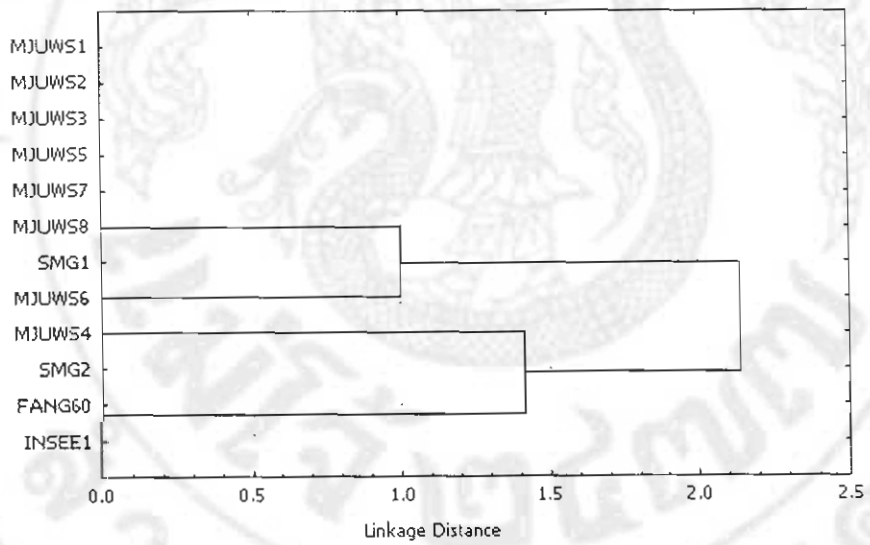
ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-12 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4) พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 13) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS5 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS6

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1



ภาพที่ 13 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-12

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-13 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4) พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 14) ดังต่อไปนี้

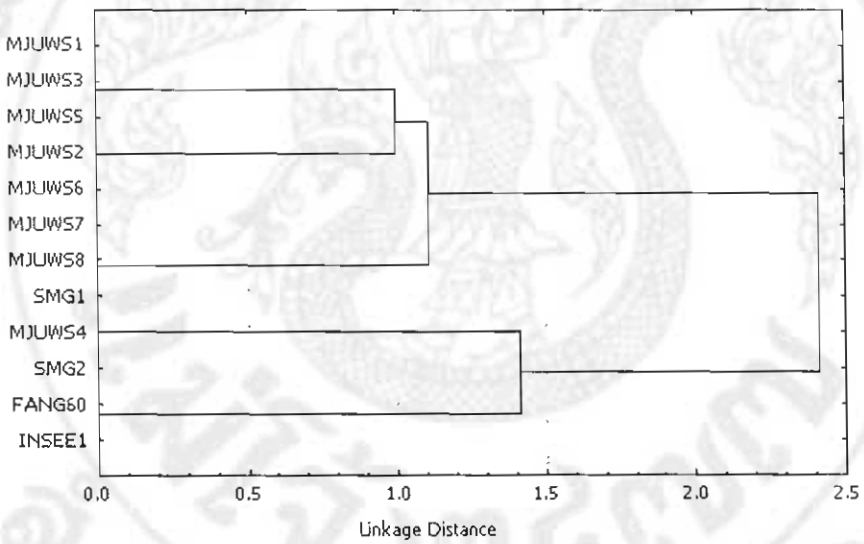
กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS3 และ สายพันธุ์ MJUWS5

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS2

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1



ภาพที่ 14 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-13

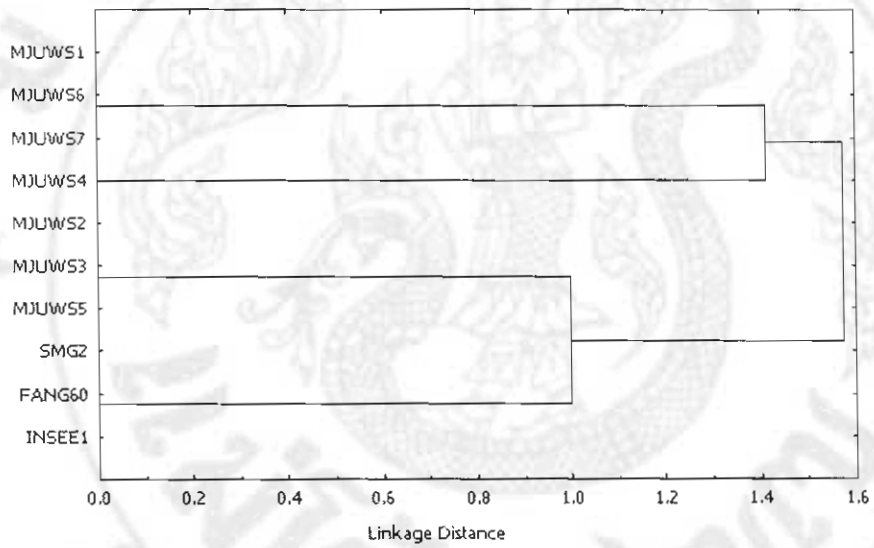
ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-14 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถ (ตารางที่ 5) พบว่าจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 15) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS6 และ สายพันธุ์ MJUWS7

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS2 MJUWS3 และ สายพันธุ์ MJUWS5

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1



ภาพที่ 15 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-14

ตารางที่ 5 การปรากฏ(1) และไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอของข้าวสาลี ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 หมายเลข

ตัวอย่างที่	OPF-14				OPF-15				OPF-16									OPF-19		
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	c	f	g	h	i	a	b	c
1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
4	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
7	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
8	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
9	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
12	0	0	0	0	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0

หมายเหตุ (-) หมายถึงไม่มี PCR Products

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-15 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 5) พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 16) ดังต่อไปนี้

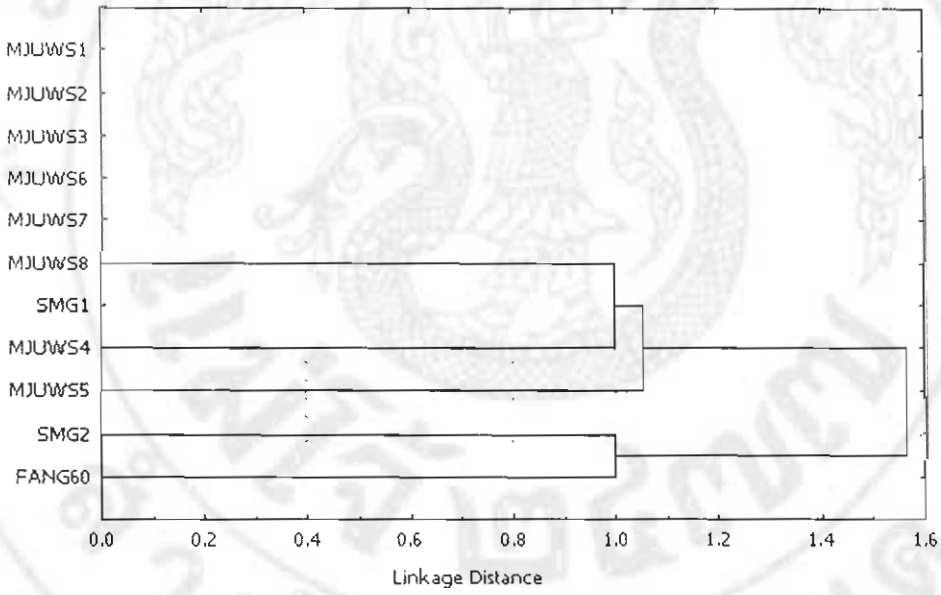
กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS5

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย พันธุ์ FANG60



ภาพที่ 16 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-15

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-16 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ตารางที่ 5) พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 6 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 17) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS5 และ สายพันธุ์ MJUWS6

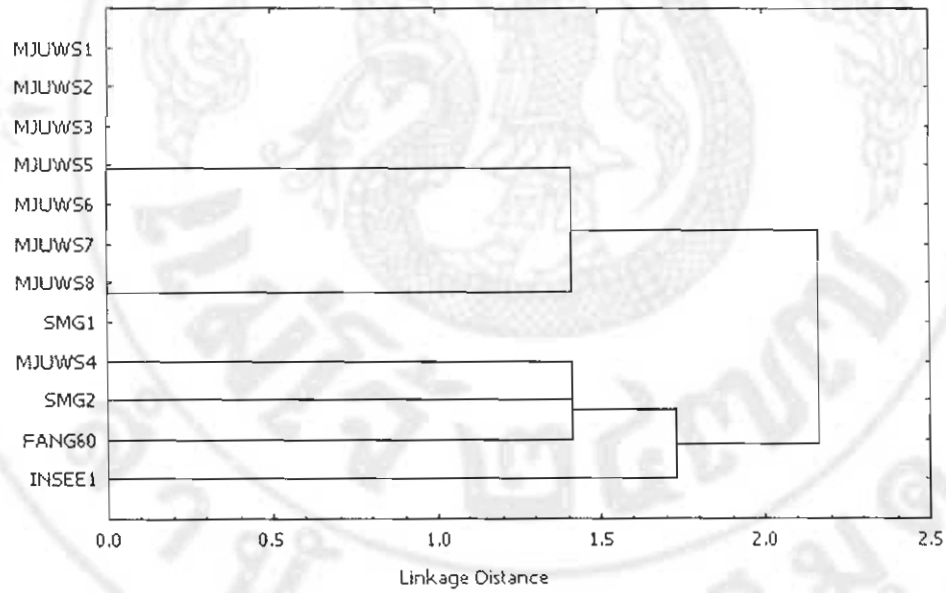
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย พันธุ์ FANG60

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย พันธุ์ INSEE1 และสายพันธุ์ MJUWS6



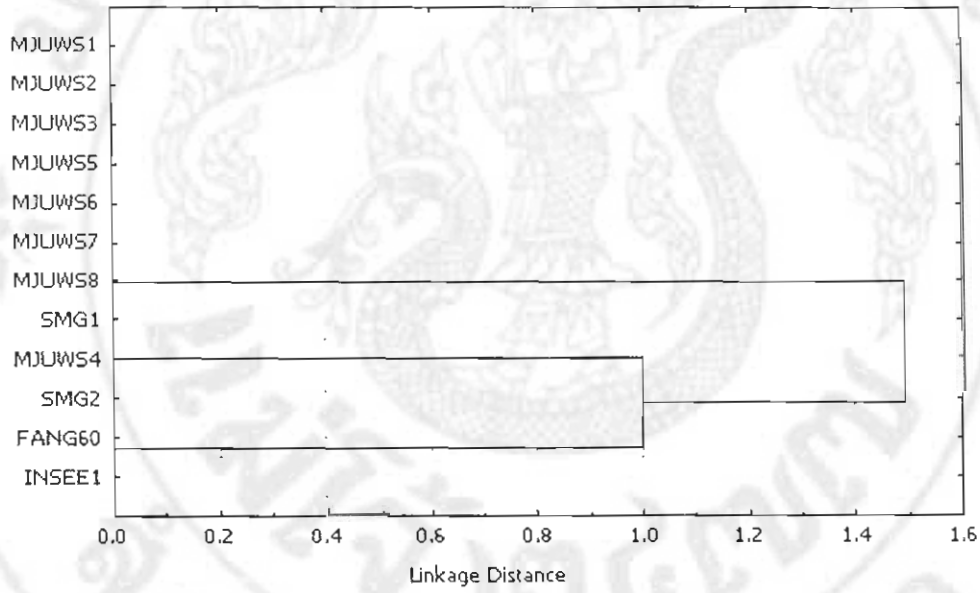
ภาพที่ 17 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-16

ผลการใช้ไพรเมอร์หมายเลข OPF-19 ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ(ตารางที่ 5) พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวสาลีออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ (ภาพที่ 18) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS5 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 และ พันธุ์ SMG1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และ พันธุ์ INSEE1

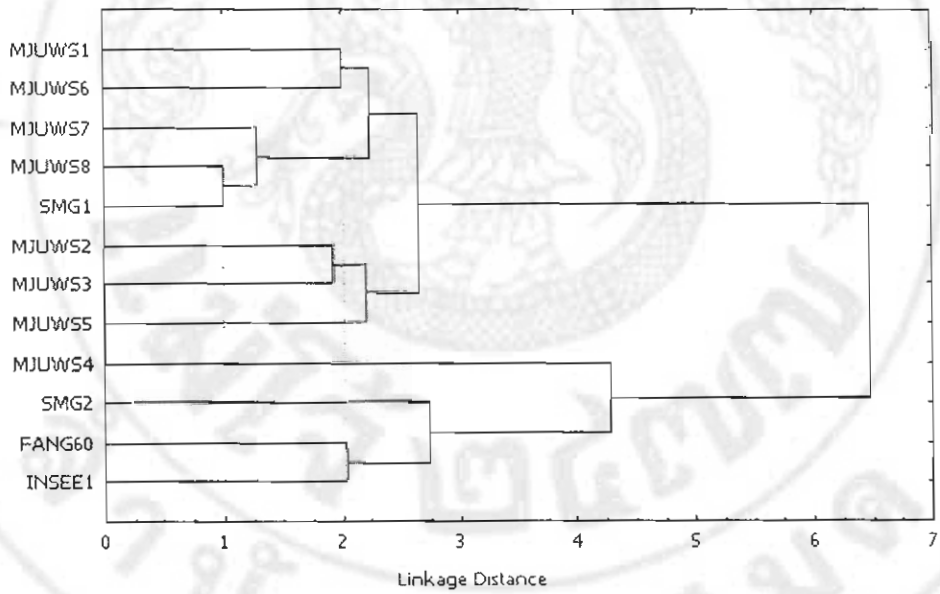


ภาพที่ 18 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-19

ผลการใช้ไพรเมอร์ 13 หมายเลข ได้แก่ OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-08, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, OPF-16 และ OPF-19 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สามารถแบ่งกลุ่มของข้าวสาลี ออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ (ภาพที่ 19) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 8 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 SMG1 MJUWS2 MJUWS3 และ สายพันธุ์ MJUWS5

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ MJUWS4 พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG 60 และ พันธุ์ INSEE 1



ภาพที่ 19 การจัดกลุ่มข้าวสาลีโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-08, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, OPF-16 และ OPF-19

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวสาลีภายในกลุ่มที่ 1 พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ตามความใกล้ชิด ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1.1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS 8 และ พันธุ์ SMG 1

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS2 MJUWS3 และสายพันธุ์ MJUWS5

การจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวสาลีอาศัยความแตกต่างของแบนแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแถบหลัก (major band) ซึ่งข้าวสาลีที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือพันธุ์ใดมีความใกล้ชิดกันแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกัน เป็นเพราะพันธุ์นั้นมีความสัมพันธ์ทางเครือญาติกันมีพันธุกรรมที่มีความใกล้เคียงกัน

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสาลี

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสาลี 12 สายพันธุ์ โดยอาศัยความแตกต่างของแบนแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแถบหลัก (major band) ดังผลการทดลองต่อไปนี้

สายพันธุ์ MJUWS 1 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ MJUWS3 และ สายพันธุ์ MJUWS 6 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากันคือ 2.00 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS1 โดยมีค่าเท่ากับ 6.78

สายพันธุ์ MJUWS 2 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ MJUWS3 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ1.92 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS2 โดยมีค่าเท่ากับ 6 46

สายพันธุ์ MJUWS 3 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ MJUWS5 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.00 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS3 โดยมีค่าเท่ากับ 6 63

สายพันธุ์ MJUWS 4 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับพันธุ์ INSEE1 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 4.23 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วน

สายพันธุ์ MJUWS5 และ สายพันธุ์ MJUWS6 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS4 โดยมีค่าเท่ากับ 6.32

สายพันธุ์ MJUWS 5 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ MJUWS8 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.18 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS5 โดยมีค่าเท่ากับ 6.78

สายพันธุ์ MJUWS 6 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ MJUWS7 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.73 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS6 โดยมีค่าเท่ากับ 6.93

สายพันธุ์ MJUWS 7 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ MJUWS8 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.07 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS7 โดยมีค่าเท่ากับ 6.86

สายพันธุ์ MJUWS 8 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับพันธุ์ SMG1 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.00 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ MJUWS8 โดยมีค่าเท่ากับ 6.74

สายพันธุ์ SMG1 พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับพันธุ์ FANG60 โดยมีค่าเท่ากับ 6.66 ซึ่งเป็นพันธุ์ตรวจสอบแสดงว่า มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากพันธุ์ตรวจสอบพันธุ์อื่นๆ

พันธุ์ SMG2 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับพันธุ์ FANG60 และ INSEE1 โดยมีค่าเท่ากับ 2.65 และ 2.83 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน

พันธุ์ FANG60 พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับพันธุ์ INSEE1 สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับคือ 2.02 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสาลี 12 พันธุ์ วิเคราะห์โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD

	MJUWS2	MJUWS3	MJUWS4	MJUWS5	MJUWS6	MJUWS7	MJUWS8	SMG1	SMG2	FANG60	INSEE1
MJUWS1	2.39	2.00	6.16	2.45	2.00	2.24	2.48	2.68	6.40	6.78	6.70
MJUWS2		1.92	5.79	2.39	3.11	3.27	2.91	2.82	6.06	6.46	6.37
MJUWS3			6.16	2.00	2.83	3.00	2.60	2.78	6.24	6.63	6.55
MJUWS4				6.32	6.32	6.24	6.18	6.10	4.36	4.24	4.23
MJUWS5					2.45	2.65	2.18	2.40	6.40	6.78	6.63
MJUWS6						1.73	2.04	2.28	6.56	6.93	6.85
MJUWS7							1.07	1.48	6.48	6.86	6.77
MJUWS8								1.00	6.35	6.74	6.65
SMG1									6.27	6.66	6.57
SMG2										2.65	2.83
FANG60											2.02

df=11-2=9 *มีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 5% **มีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 1%

ตารางที่ 7 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต รวมทั้งลักษณะทางพืชไร่ ที่สำคัญของข้าวสาลี 11 สายพันธุ์ที่ปลูกทดสอบภายใต้ 6 แหล่งปลูกฤดูแล้ง2543/44

ลักษณะ	น้ำหนัก 1000 เมล็ด	จำนวน รวง/กอ	จำนวน เมล็ด/รวง	ความสูง วันออกดอก	ความสูง วันเก็บเกี่ยว	อายุ วันออกดอก	อายุ วันเก็บเกี่ยว
ผลผลิต	-0.0394	0.8560**	0.2273	-0.2604	-0.3301	0.3695	0.3130
นน.1000เมล็ด		-0.0289	-0.0559	-0.0120	-0.0069	-0.2954	0.1994
จำนวนรวง/กอ			0.2761	-0.2711	-0.3495	0.2549	0.1994
จำนวนเมล็ด/รวง				-0.5031	-0.4812	-0.6203*	-0.6061*
ความสูงออกดอก					0.9740**	0.5185	0.5110
ความสูงเก็บเกี่ยว						0.4277	0.4253
อายุวันออกดอก							0.9918**

df=11-2=9 *มีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 5% **มีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 1%

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยอาศัยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อช่วยในการตรวจสอบว่าความสัมพันธ์ของลักษณะต่างๆ ว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ และมีการตอบสนองกันอย่างไร โดยผลการวิเคราะห์จากการทดสอบภายใต้สภาพแวดล้อมภาคเหนือตอนบน 6 แหล่งปลูกพบว่า ลักษณะผลผลิตมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับจำนวนรวงต่อกอ ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมีสหสัมพันธ์ทางลบกับอายุวันออกดอกและอายุวันเก็บเกี่ยว ลักษณะความสูงวันออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับความสูงวันเก็บเกี่ยว ลักษณะอายุวันออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับอายุวันเก็บเกี่ยว ส่วนลักษณะอื่นๆ ไม่มีสหสัมพันธ์กัน (ตารางที่ 7)

วิจารณ์ผลการทดลองและเสนอแนะ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสาลีโดยเทคนิค RAPD ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีปริมาณมาก โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการสุ่มจับดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) จำนวน 12 ตัวอย่าง จากการทดสอบไพรเมอร์สุ่มจับจำนวน 19 หมายเลข ได้แก่ ไพรเมอร์หมายเลข OPF-01 ถึง OPF-20 ยกเว้นไพรเมอร์หมายเลข OPF-05 เพื่อ คัดเลือกหาไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกอยู่ในช่วง 0.5 - 2 Kbp ซึ่งสามารถระบุได้ว่าสายพันธุ์ ข้าวสาลีมีความแตกต่างกัน พบว่า มีไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 13 หมายเลข ได้แก่หมายเลข OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-08, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, OPF-16 และ OPF-20ที่สามารถใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์พันธุ์พืชที่แสดงความแตกต่างของพันธุ์ข้าวสาลีได้อย่างชัดเจน แม้ว่าแต่ละไพรเมอร์สามารถใช้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสาลีได้ก็ตาม แต่ควรจะมีการเพิ่มชุดของไพรเมอร์ให้มากขึ้นและมีการทำซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง

ในการพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสาลี โดยเทคนิค RAPD หลังจากการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างพืช ควรปรับให้ได้ 5 ng / µl เพื่อใช้แก้ปัญหาการปรากฏและการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ การเตรียม master mix ในการทำปฏิกิริยา PCR ควรมีความละเอียดและรอบคอบในการปรับไมโครปิเปตและควรระมัดระวังการใช้สารเคมีต่างๆ เนื่องจากอาจทำให้ส่วนผสมของ

master mix มีปริมาณไม่เพียงพอกับจำนวนตัวอย่าง หากส่วนผสมของ master mix มีจำนวนไม่เพียงพอ ควรนำหลอด master mix ไปทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge อีกครั้ง เพื่อให้ส่วนผสมที่ติดข้างหลอดรวมตัวกันที่ก้นหลอด หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ควรเติม loading dye ทันที การเตรียม gel สำหรับ gel อิเล็คโตรโฟรีซีส ส่วนผสมของ gel ที่นำไปต้มควรเดือดและใสมากๆ ควรลดอุณหภูมิให้ได้ 65 องศาเซลเซียส แล้วจึงใส่ ethidium bromide ลงไป เพื่อสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนยิ่งขึ้น (อาภัสสรา , 2537 , วาสนา ,2539 อ้างโดย จันทร์จีรา , 2541)

การจัดกลุ่มพันธุกรรมข้าวสาลีทั้ง 12 สายพันธุ์ โดยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พิจารณาจากลักษณะการปรากฏ (1) และการไม่ปรากฏ (0) ของแถบดีเอ็นเอ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 MJUWS2 MJUWS3 MJUWS5 และ พันธุ์ SMG1 ส่วนกลุ่มที่สองประกอบด้วย สายพันธุ์ MJUWS4 พันธุ์ SMG2 พันธุ์ FANG60 และพันธุ์ INSEE1 จะพบว่า พันธุ์ SMG1 ซึ่งเป็นพันธุ์ตรวจสอบถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มพันธุ์ที่นำมาทดสอบ มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ส่วนสายพันธุ์ MJUWS4 แสดงความแปรปรวนทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์อื่นๆ จึงถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มพันธุ์ FANG60 พันธุ์ SMG2 และพันธุ์ INSEE1 จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทำให้มีโอกาสในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ และสามารพัฒนาพันธุ์ของข้าวสาลีโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (Marker Assisted Selection, MAS) ต่อไป

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมซึ่งค่าแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มที่ 1 จะมีค่าความสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 1.00-3.27 โดยแต่ละพันธุ์ภายในกลุ่มเดียวกันจะมีค่าความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้แก่พันธุ์ MJUWS8 กับพันธุ์ SMG2 แสดงว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันหรือเป็นญาติพี่น้องกัน ส่วนค่าแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มที่ 2 จะมีค่าความสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 2.02-6.66 ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มเดียวกันจะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงกว่ากลุ่มที่ 1 โดยพบว่าพันธุ์ SMG1กับพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากโดยมีค่าเท่ากับ 6.66 ส่วนพันธุ์ FANG60 กับพันธุ์ INSEE1 มีความใกล้ชิดมากกว่าพันธุ์อื่นๆในกลุ่มนี้ ส่วนการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะผลผลิตมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับจำนวนรวงต่อกอ ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมีสหสัมพันธ์ทางลบกับอายุวันออกดอกและอายุวันเก็บเกี่ยว ลักษณะความสูงวันออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับความสูงวันเก็บเกี่ยว ลักษณะอายุวันออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับอายุวันเก็บเกี่ยว ส่วนลักษณะอื่นๆไม่มีสหสัมพันธ์กัน

ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์พืช ต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่แตกต่างกันให้มากที่สุดสำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสาลี โดยพิจารณาได้จากความแตกต่างของพืชที่ทำการจัดกลุ่ม และค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสาลีทั้ง 12 พันธุ์ ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 จะมีค่าสหสัมพันธ์อยู่ระหว่าง 1.00-3.27 แสดงว่าพันธุกรรมของข้าวสาลีภายในกลุ่มมีความใกล้ชิดกันมาก คือมีฐานพันธุกรรมแคบ แต่กลุ่มที่ 2 มีค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 2.02-6.66 แสดงว่ามีฐานพันธุกรรมกว้างเหมาะสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช จึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์ MJUWS1 จากกลุ่มที่ 1 และพันธุ์ SMG2 จากกลุ่มที่ 2 เพื่อใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ซึ่งจะทำให้มีโอกาสได้พันธุ์ข้าวสาลีที่มีลักษณะที่ดีตรงตามความต้องการ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสาลี โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ไพรเมอร์ 19 หมายเลข คือ ไพรเมอร์หมายเลข OPF-01 ถึง OPF-20 (ยกเว้นไพรเมอร์หมายเลข OPF-05) พบความแตกต่างของดีเอ็นเอจำแนกได้ในช่วง 0.5 –2.0 Kbp ตั้งแต่จำนวน3-9 แถบ โดยไพรเมอร์หมายเลข OPF-16 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการจำแนกอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp สูงสุดโดยมีจำนวน 9 แถบ ในขณะที่ไพรเมอร์หมายเลข OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-10 และ OPF 19 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการจำแนกอยู่ในช่วง 0.5 – 2.0 Kbp ต่ำสุดมีจำนวนเพียง 3 แถบ ส่วนไพรเมอร์หมายเลข OPF-07, OPF-09, OPF-11, OPF-17, OPF-18 และ OPF-20 ไม่มีผลผลิตของพีซีอาร์ (PCR Products) ซึ่งไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีจำนวน 13 หมายเลข ได้แก่หมายเลข OPF-01, OPF-02, OPF-03, OPF-04, OPF-06, OPF-08, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPF-15, OPF-16 และ OPF-20 สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวสาลีได้อย่างชัดเจนและใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของพันธุ์พืช ได้ในช่วง 0.5 - 2 Kbp

ลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์และจัดกลุ่มโดยใช้ไพรเมอร์ 13 หมายเลข กับสายพันธุ์ข้าวสาลีจำนวน 12 ตัวอย่าง ทำให้แบ่งสายพันธุ์ข้าวสาลีออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS1 MJUWS6 MJUWS7 MJUWS8 MJUWS2

MJUWS3 MJUWS5 และพันธุ์ SMG1 ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ MJUWS4 และพันธุ์ SMG2 FANG60 และ INSEE1

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยพิจารณาจากค่าสหสัมพันธ์(r) ซึ่งค่าต่ำแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน เนื่องจากมีลักษณะพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน ทำให้แบ่งสายพันธุ์ข้าวสาลีออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ MJUWS8 กับพันธุ์ SMG1 มีค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 1.00 – 3.27 แสดงว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน

กลุ่มที่ 2 พันธุ์ FANG60 กับพันธุ์ INSEE1 มีความใกล้ชิดกันมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ ในกลุ่มนี้ โดยมีค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 2.02 – 6.66 แต่พันธุ์ SMG1 กับพันธุ์ FANG60 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากโดยมีค่าเท่ากับ 6.66 โดยแต่ละสายพันธุ์ภายในกลุ่มเดียวกันจะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงกว่ากลุ่มที่ 1

ส่วนการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ พบว่า ลักษณะผลผลิตมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับจำนวนรวงต่อกอ ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวงมีสหสัมพันธ์ทางลบกับอายุวันออกดอกและอายุวันเก็บเกี่ยว ลักษณะความสูงวันออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับความสูงวันเก็บเกี่ยว ลักษณะอายุวันออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับอายุวันเก็บเกี่ยว ส่วนลักษณะอื่นๆไม่มีสหสัมพันธ์กัน

เอกสารอ้างอิง

งามชื่น รัตนดิลก. 2542. พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 471 หน้า.

จิรพร นิรมิตเจียรพันธุ์. 2542. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารี โดยใช้วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD). ปัญหาพิเศษสาขาพืชศาสตร์ (พืชสวนประดับ) ภาควิชาพืชสวน. คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 44 หน้า.

จันทร์จีรา เชียงดา. 2541. การวิเคราะห์พันธุกรรมของลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) โดยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิตย์ศรี แสงเดือน, พัฒนา ศรีฟ้า และวินิตชาญ รื่นใจชน. 2537 . การพัฒนาพันธุ์หญ้าแฝกหอม : การใช้ Random Amplified Polymorphic DNA Technique (RAPD) ในการจัดจำแนกพันธุ์หญ้าแฝกหอมในประเทศไทย. แบบรายงานความก้าวหน้าโครงการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝกอันเนื่องมาจากพระราชดำริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีงบประมาณ 2537. ภาควิชาพันธุศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นวลน้อย แจ่มจันทา. 2539. การตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาวโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นวลพรรณ ค่ำสุริยา. 2542. เรื่องการจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพรรณไม้สกุล Heliconia. ปัญหาพิเศษสาขาพืชศาสตร์ (พืชสวนประดับ) ภาควิชาพืชสวน, คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 48 หน้า.

พัทธกุล จันทนมัฏฐะ. 2525. ข้าวสาลี. กองการข้าว กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 72 น.

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538. เทคนิคการจำแนกพันธุ์ด้วยวิธี RAPD. เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่องการตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD ครั้งที่1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. น 39-40.

ไพบูรณ์ พงษ์สกุล ทรรศนะ ลาภรวย และนคร แสงปลั่ง. 2540. การส่งเสริมธัญพืชเมืองหนาว, น. 161-189. ใน รายงานการประชุมธัญพืชเมืองหนาวแห่งชาติ ครั้งที่ 18 17-29 มกราคม 2540 ณ โรงแรมโฆษะ, ขอนแก่น.

วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะชัย และวาสนา ศิริรังษี. 2539. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซม และอื่น ๆ. พงศ์สวัสดิ์การพิมพ์, เชียงใหม่. 476 หน้า.

วาสนา ศิริรังษี. 2539. Gel electrophoresis. ในวิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก. คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2539. Nucleic acid amplification Techniques, น.7 , 1-24. ใน วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะภัย และ วาสนา ศิริรังษี (บรรณาธิการ). วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology, คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณะกุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์. บางเขน, กรุงเทพฯ. 233 หน้า.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส. ภาควิชาสรีรวิทยา. คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อำภร ผากา. 2542. เรื่องการจำแนกสายพันธุ์ปอลา โดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). ปัญหาพิเศษสาขาพืชศาสตร์ (พืชสวนประดับ) ภาควิชาพืชสวน, คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. 40 หน้า.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2540. ข้าวสาลีวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะอุตสาหกรรมการอาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 290 หน้า.

Buso, G.S.C., P.H. Rangel and M.E. Ferreir. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice population (*Oryza glumaepatula*) with isozyme and RAPD makers. Mol. Ecol.; 7(1) : 107-117.

Doyle, J.J. & J.L. Doyle, 1987 . A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem.Bull. 19 : 11-15.

Jianhua, Z, M.B. McDonald and P.M., Sweeney. 1996 Soybean cultivar identification using RAPD. Seed Sci Techonol, 24. 589-592.

Kent, N.L. 1983 "Technology of cereals. An introduction for students of food-science and agriculture". Third edition Pergamon Press, Oxford. อ้างโดย อรอนงค์ นัยวิกุล, 2540. ข้าวสาลีวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.290 หน้า.

Wang, G. , S. Castiglione, J. Zhang, R. Fu, J. Ma, W. Li, Y. Sun, and F. Sola, 1994. Hybrid rice (*Oryza sativa* L.) : Identification and parentage determination by RAPD. Plant cell Rept. 14 : 112-115.