รายงานผลงานวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การตรวจสอบพันธุ์และความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

VARIETAL IDENTIFICATION AND GENETIC PURITY TEST OF OKRA (*Abelmoschus esculentus*) USING RAPD MARKERS

อยู่ภายใต้ชุดโครงการ : การวิจัยและพัฒนากระเจี๊ยบเขียว

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2548: 323,222 บาท

2549: 284,540 บาท

รวม 607,762 บาท

หัวหน้าโครงการ นายดำเกิง ป้องพาล

ผู้ร่วมโครงการ นางฉันทนา วิชรัตน์

นายปรีชา รัตนัง

นางสาวเรือนแก้ว ประพฤติ

นางสาววิไลพร ศักดิ์พานิช

งานเสร็จสิ้นสมบูรณ์

วันที่ 30 กันยายน 2549

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยประจำปี 2548-2549 ขอขอบคุณภาควิชาพืชสวน ศูนย์กล้วยไม้และไม้ดอกไม้ประดับ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนในด้านสถานที่และสารเคมีในการวิจัย และขอขอบคุณโครงการวิจัยและพัฒนากระเจี๊ยบเขียวที่ให้การสนับสนุนเมล็ดพันธุ์ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์เรวดี วุฒิจำนงค์ ผศ.ดร.ลักขณา เพ็ชรประดับ ที่เอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ และผศ.ดร.วรวรรณ ชาลีพรหม ที่ให้ข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดเวลาที่ดำเนินงานทดลอง

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุเทพ วัชรเวชศฤงคาร คุณสุจิตราภรณ์ อินถา คุณละออทิพย์ ไมตรี และ อาจารย์กุลยา ป้องพาล รวมทั้งบุคคลที่มิได้เอ่ยนามไว้ในที่นี้ ซึ่งมีส่วนช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญตารางภาคผนวก	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	8
เวลาและสถานที่	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลอง	11
วิจารณ์ผล	57
สรุปผลการทดลอง	60
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	64

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของกระเจี๊ยบเขียว 28 สายพันธุ์	16
2 ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ของกระเจี๊ยบเขียว 28 สายพันธุ์	17
3 แถบดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม 28 คู่ผสม ที่ได้จากไพรเมอร์ OPA-07	52
4 แถบดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม 28 คู่ผสม ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB-10	55
5 ชนิดและหมายเลขไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอของของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์ แม่ พ่อ และลูกผสม 28 คู่ผสม	56

สารบัญตารางผนวก

ตาราง	หน้า
1 ไพรเมอร์ชุด OPA 01-07 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	67
2 ไพรเมอร์ชุด OPB 01-10 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	67
3 ไพรเมอร์ชุด OPC 01-15 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	68
4 ไพรเมอร์ชุด OPG 01-20 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	69
5 ไพรเมอร์ชุด OPN-01 OPO-09 และ OPO-11 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	70

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์ ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	11
2	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์ ที่ใช้ไพรเมอร์ OPB-01	12
3	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์ ที่ใช้ไพรเมอร์ OPB-03	13
4	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์ ที่ใช้ไพรเมอร์ OPO-09	14
5	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์ ที่ใช้ไพรเมอร์ OPO-11	15
6	การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์	20
7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่และพ่อ 8 สายพันธุ์ ที่ใช้ไพรมอร์ OPA-07	21
8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ E_4 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	22
9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ G_6 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	23
10	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ G_6 x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	24
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ H_2 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	25
12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ H_2 x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	26
13	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ H_2 x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	27
14	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ M_1 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	28
15	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ M_1 x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	29
16	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ M_1 x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	30
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ M_1 x H_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	31
18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ M_1 x U_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	32
19	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ P_2 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	33
20	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ P_2 x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	34
21	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ P_2 x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	35
22	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ P_2 x H_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	36
23	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ P_2 x M_1 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	37
24	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ P_2 x R_1 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	38
25	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ P_2 x U_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	39
26	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ R_1 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07	40

27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ R_1 x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 41

28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ R_1 x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 42

29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ R_1 x H_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 43

30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ R_1 x M_1 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 44

31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ R_1 x U_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 45

32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ U_2 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 46

33 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ U_2 x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 และ OPB-10 47

34 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ U_2 x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 และ OPB-10 49

35 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ U_2x H_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 51

การตรวจสอบพันธุ์และความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

VARIETAL IDENTIFICATION AND GENETIC PURITY TEST OF OKRA (*Abelmoschus esculentus*) USING RAPD MARKERS

ดำเกิง ป้องพาล[1/] ฉันทนา วิชรัตน์[1/] ปรีชา รัตนัง[1/]

เรือนแก้ว ประพฤติ[2/] วิไลพร ศักดิ์พานิช[1/]

DAMKOENG PONGPHAN CHANTANA WICHARAT

PREECHA RATTANANG REUNKEAW PRAPHET

WILAIPORN SAKPANITH

[1/]ภาควิชาพืชสวน

คณะผลิตกรรมการเกษตร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2/]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

.....

บทคัดย่อ

จากการนำพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว จำนวน 28 สายพันธุ์ มาจำแนกพันธุ์โดยเทคนิค อาร์เอพีดี โดยสุ่มใช้ไพรเมอร์ 27 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 11 ชนิด หรือ ร้อยละ 41 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และมี 5 ชนิดประกอบด้วย OPA – 07 OPB – 01 OPB – 03 OPO – 09 และ OPO – 11 ที่สามารถทำให้เกิดความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ได้ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 419 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 217 แถบ หรือ ร้อยละ 51.78 เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsys ปรากฏว่า มีค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) เท่ากับ 0.32 และสามารถแยกกลุ่มกระเจี๊ยบเขียวออกเป็น 8 กลุ่ม ตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้

เมื่อนำพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม ทั้ง 28 คู่ผสม จากโครงการปรับปรุงพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 40 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ OPA – 07 กับ OPB – 10 สามารถทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมของแถบดีเอ็นเอ โดยOPA – 07 สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ทั้ง 28 คู่ผสม ในขณะที่ OPB – 01 ให้เพียง 2 คู่ผสม และเมื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความเป็นลูกผสมทั้ง 28 คู่ผสมนี้ มีคู่ผสมถึง 14 คู่ผสม ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นลูกผสม หรือมีความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์สูงถึง ร้อยละ 100

Abstract

In the study of RAPD technique among 28 cultivars of Okra for identification and genetic relationship, Using oligonuclelide 27 primers, The result indicated that eleven primers or 41 percentage could amplified DNA bands. Moreover, out of the eleven primers, only five primers: OPA-07, OPB-01, OPB – 03, OPO – 09 and OPO – 11 performed highly polymorphic banding pattern which is effective for cultivar classification. As it is shown 217 bands or 51.78 percentage from 419 bands. After analyzed the bands with NTsys Program, the lower similarity index is 0.32 and the dendrograms for the eight groups formed, were also found very close to each other and there is differentiation of the accession inside.

Twenty – eight parent lines and hybrid varieties, developed by Okra Improvement project of MJU were used in this experiment of genetic purity test, while forty of arbitrary 10 – mer primers were screened for polymorphic RAPD, two kinds of them, OPA-07 and OPB – 10 produced amplified pattern. In addition, OPA – 07 gave the maximum number of polymorphisms: among 28 hybrid varieties, 14 were found with hybrid representing 100 percentage level of seed hybridity efficiently and reliably used for cultivar identification and hybrid purity test.

คำนำ

กระเจี๊ยบเขียวหรือกระเจี๊ยบมอญ (Okra, Lady's Finger) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Abelmoschus esculentus* Moench เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Malvaceae มีถิ่นเดิมอยู่ในแถบเขตร้อนของทวีปแอฟริกาและเอเชีย นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยทั่วทุกภาคมานานแล้ว ในต่างประเทศปลูกกันมากในเขตร้อนทั่วไป (จารีย์, 2544) กระเจี๊ยบเขียวเป็นพืชที่นิยมบริโภคนิยมบริโภคฝักอ่อนซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมไปด้วยธาตุแคลเซียมและวิตามินซี ในเนื้อที่บริโภคได้ของกระเจี๊ยบเขียว 100 กรัม มีธาตุแคลเซียมและวิตามิน 92.0 มิลลิกรัม และ 31.0 มิลลิกรัมตามลำดับ (กองส่งเสริมพืชสวน, 2537) ฝักกระเจี๊ยบเขียวมีลักษณะเป็นเมือกเพราะประกอบด้วยกัม (gum) และเพคติน (pectin) ในปริมาณสูงซึ่งช่วยป้องกันหลอดเลือดตีบตัน รักษาโรคความดันโลหิต รักษาโรคกระเพาะอาหาร ขับพยาธิตัวจี๊ด และบำรุงสมอง นอกจากนี้เมล็ดกระเจี๊ยบเขียวยังให้โปรตีนไม่ต่ำกว่า 20 % และให้น้ำมันไม่ต่ำกว่า 14 % (เครือพันธุ์, 2544)

เนื่องจากกระเจี๊ยบเขียวมีคุณค่าสูงต่อสุขภาพของมนุษย์ดังกล่าว ปัจจุบันนี้จึงเป็นที่นิยมบริโภคกันมากขึ้น โดยมีตลาดส่งออกได้แก่ ญี่ปุ่น เยอรมัน อังกฤษ ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ และประเทศในตะวันออกกลาง ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออกในรูปของฝักสดและฝักแช่แข็ง ซึ่งกระเจี๊ยบเขียวสามารถปลูกได้ทั้งปีในทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งเริ่มมีการปลูกเพื่อการส่งออกตั้งแต่ปี พ.ศ.2524 และพื้นที่ปลูกได้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่ง พ.ศ. 2542/43 มีพื้นที่ปลูกเพื่อการส่งออกประมาณ 2,500 ถึง 3,000 ไร่ ผลผลิตต่อไร่ที่เข้าเกรดประมาณ 1,800 กก./ไร่ (เครือพันธุ์, 2545) การปลูกกระเจี๊ยบเขียวในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ.2538-2541 ประสบปัญหาการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงของโรคไวรัสเส้นใบเหลือง (Okra yellow vein virus disease) ซึ่งทำให้ฝักกระเจี๊ยบเขียวมีสีเหลืองไม่สามารถส่งออกไปขายยังต่างประเทศ ได้ทำให้เกษตรกรผู้ผลิตและบริษัทผู้ส่งออกกระเจี๊ยบเขียวสูญเสียรายได้จำนวนมากในระยะเวลาดังกล่าว หน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชนจึงเร่งระดมเพื่อหาแนวทางแก้ปัญหาดังกล่าว โดยในการแก้ปัญหานี้ได้นำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว

เทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยเฉพาะเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลได้มีการพัฒนาขึ้นมาโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ร่วมกับการใช้สุ่มไพรเมอร์ (Random Primer) ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) กับการจำแนกพันธุ์พืช

RAPD เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่ง โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) เทคนิคนี้ยังถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยหลักการที่ว่า สิ่งมีชีวิตมีสารควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม คือ ดีเอ็นเอ (DNA : Deoxyribonucleic acid) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่เป็นส่วนประกอบหลักของโครโมโซม บรรจุในนิวเคลียสของเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด (ดำเกิง, 2544) ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่มีการเรียงลำดับเบสที่ต่างกันย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมควรมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน (วัชรี และมนตรี, 2536)

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR :polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน (วิชัยและคณะ, 2547) วสันต์และคณะ (2540) กล่าวว่า ในการทำพีซีอาร์ต้องทราบลำดับเบสที่ขนาบข้างส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา เพื่อที่จะนำมาสร้าง DNA primer ซึ่งเป็น oligonucleotide ท่อนสั้นๆ ขนาดประมาณ 18-22 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับของเบสที่สามารถจับปลายด้านตรงข้ามของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาแต่ละเส้น ดังนั้นจึงต้องใช้ไพรเมอร์ 2 สาย ซึ่งมีทิศทางตรงกันข้ามและมีตำแหน่งที่จับกับดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase โดยทั่วไปมักจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300-1500 เบส ดีเอ็นเอที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่า จะทำให้สามารถตรวจสอบความผิดปกติของยีนได้ง่าย

พีซีอาร์มีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนในหนึ่งรอบของกระบวนการคือ 1) denaturing step โดยการทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ถูกแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว 2) annealing step ให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่งจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และ 3) extension step เป็นการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ที่นำหน่วยย่อยดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อกันสร้างเป็นสารดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์นั้น ๆ และเมื่อเสร็จสิ้นหนึ่งรอบทำให้ได้ดีเอ็นเอบริเวณที่เราสนใจเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และหากทำเช่นนี้หลายๆ รอบ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการมีจำนวนเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ คือ 2^n เรียกดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์นี้ว่า ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) (วีระพงศ์, 2536)

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์อิเล็คโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis) ซึ่งเป็นวิธีการที่จัดได้ว่ามีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษากรดนิวคลิอิก ในแง่การแยกขนาดหรือการศึกษาปริมาณโครงสร้างและคุณสมบัติบางอย่างคือวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (วาสนา ,2539)

มีหลักการคือ ดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบเมื่อให้เคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจล หรือโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ซึ่งทำหน้าที่เป็นทางเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า ดีเอ็นเอเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก และดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วหรือช้าต่างกันตามน้ำหนักของโมเลกุล (ปิยะอร, 2543) และเนื่องจากเจลจะมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายตะแกรง โมเลกุลที่มีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ง่ายกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะเป็นสัดส่วนผกผันกับน้ำหนักโมเลกุล ภายใต้ระยะเวลาการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสช่วงหนึ่ง โมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปไกลกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดีเอ็นเอที่แยกได้จากการทำอิเล็คโตรโฟรีซีส ยังไม่สามารถมองเห็นได้ ต้องนำเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และนำไปบันทึกผลภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตเพื่อดูลักษณะของผลผลิตที่เกิดขึ้น (สุรินทร์, 2545)

Sambrook *et al.* (1989) ได้แนะนำวิธีการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสโดยใช้เจลอะกาโรสเป็นตัวกลาง คุณลักษณะของอะกาโรสมีความเหมาะสมในการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 50 bp จนกระทั่ง 30,000 bp ความแตกต่างในขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอสามารถแยกได้โดยการปรับระดับความเข้มข้นของอะกาโรส โดยที่ความเข้มข้นต่ำของอะกาโรส รูพรุนของเจลจะมีขนาดใหญ่ ซึ่งเหมาะสำหรับการแยกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ส่วนอะกาโรสที่มีความเข้มข้นสูง รูพรุนของเจลมีขนาดเล็ก เหมาะในการแยกโมเลกุลขนาดเล็ก

ได้มีการนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการจำแนกพันธุ์และตรวจสอบความามบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ของพืชสวนและพืชผักหลายชนิดรวมทั้งในกระเจี๊ยบเขียวตามรายงานดังต่อไปนี้

ธีระชัย และนฤมล (2543) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์พริกจำนวน 14 สายพันธุ์ มาตรวจสอบกับไพรเมอร์ 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 70 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงได้เลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน มาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของพริกทั้งหมด พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้โดยใช้ไพรเมอร์บางชนิดให้แถบดีเอ็นที่จำเพาะกับพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง ซึ่งสามารถจำแนกพริก 14 พันธุ์ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว

ประสาน และคณะ (2541) พบว่าการใช้เทคนิค RAPD ในการเปรียบเทียบแบบแผนดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ต้านทาน (BL 33) และพันธุ์อ่อนแอ (BL 404) ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียว โดยการวิเคราะห์ RAPD ที่ใช้ arbitrary primer จำนวน 35 ชนิด พบว่ามี 30 ชนิดที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะเขือเทศทั้งสองพันธุ์ได้ แต่ 18 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่พบในพันธุ์ต้านทาน แต่ไม่พบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันนี้ในพันธุ์อ่อนแอ

สมศักดิ์ และคณะ (2542) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการควบคุมการนำเข้าเมล็ดพันธุ์หอมหัวใหญ่ และกระเทียมใบซึ่งมีขนาดและรูปร่างเมล็ดพันธุ์คล้ายคลึงกันมาก และมีการลักลอบ

นำเข้าเมล็ดหอมหัวใหญ่โดยแจ้งว่าเป็นกระเทียมใบ พบว่า จากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 152 ชนิดพบไพรเมอร์จำนวน 16 ชนิด ที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างกระเทียมใบและหอมได้ และยังพบว่าไพรเมอร์ AD-16 สามารถใช้จำแนกในระดับพันธุ์ได้

Kaga *et al.* (1996) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วเขียว 5 ชนิดพันธุ์ จาก 28 แหล่ง พบว่าการใช้ไพรเมอร์ 24 หมายเลข ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ รวม 404 fragments พร้อมทั้งได้จัดกลุ่มโดยวิธี Cluster Analysis แสดงถึงความสัมพันธ์ของพืชชนิดนี้ด้วย

Grzebelus *et al.* (2001) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในการตรวจสอบความสัมพันธ์จาก พ่อและแม่ไปสู่ลูกผสมในแครอท (*Daucus carota* L.) 3 คู่ผสม คือ 1028 x 9370, 9370 x 2158 และ 2163 x 2158 โดยใช้ไพรเมอร์ 33 หมายเลข พบว่ามี 15 หมายเลข สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจน และบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมทั้ง 3 คู่ ได้

Jianhua *et al.* (1997) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในพิทูเนีย และซิคลาเมน ซึ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมสามารถแสดงออกในรุ่นพ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์แท้ และจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เทคนิคนี้สามารถใช้ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้การคัดเลือกพันธุ์ในแต่ละรุ่นของเมล็ดดอกไม้ทั้ง 2 ชนิดทำได้รวดเร็วมากขึ้น

Maciel *et al.* (2001) ทดสอบหาเครื่องหมายของความแปรปรวนระหว่างพันธุ์ปลูกและชนิดที่เป็นพันธุ์ท้องถิ่น landrace ของถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris* L.) ที่พบในทางตอนใต้ของบราซิล โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี กับถั่วแขกพันธุ์ท้องถิ่น จำนวน 18 สายพันธุ์และถั่วแขกพันธุ์การค้าจำนวน 15 สายพันธุ์และถั่วอะซูกิจำนวน 2 สายพันธุ์ และ ถั่วแขกพันธุ์ท้องถิ่นซึ่งไม่สามารถจำแนกกลุ่มได้อีกหนึ่งชนิด รวมทั้งถั่วเหลืองผิวดำแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์สายเดี่ยว พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 15 ชนิด สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม

อัญชรา (2542) รายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จำแนกพันธุกรรมกระเจี๊ยบเขียวจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ เบอร์ 2, 3, 5 และ 7 โดยใช้ไพรเมอร์ OPF 20 หมายเลข ซึ่งพบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 4 หมายเลข คือ OPF – 20, OPF – 03, OPF – 04 และ OPF – 08 สามารถสุ่มจับและแยกกระเจี๊ยบเขียวได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งสายพันธุ์เบอร์ 2 และ 3 กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์เบอร์ 5 และสายพันธุ์เบอร์ 7

จรรยา (2543) ได้ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว 16 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน 24 หมายเลข ได้แก่ OPE 01–04 และ OPF 01–20 เข้าสุ่มจับ พบว่าไพรเมอร์

3 หมายเลขได้แก่ OPF–03, OPF–04 และ OPF–07 สามารถเข้าสุ่มจับดีเอ็นเอต้นแบบแล้วแสดงแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน

Martinello (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกระเจี๊ยบเขียวโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่าง *Abelmoschus* จำนวน 42 ชนิด และ *Hibiscus* จำนวน 1 ชนิด รวมทั้งการคำนวณหาค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ในวิธีการที่ต่าง ๆ กันคือ ระบบการลดหลั่นแบบ single linkage และวิธีของ Tocher เพื่อการจัดกลุ่มตามพันธุลักษณะของกระเจี๊ยบเขียวและจากการเข้าสุ่มจับของไพรเมอร์ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันจำนวน 103 แล้วใช้จัดกลุ่มของกระเจี๊ยบเขียวทั้ง 43 ชนิดได้เป็น 6 กลุ่มตามความใกล้ชิดพันธุกรรม

ปรีดา (2548) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 23 ชนิด มีไพรเมอร์จำนวน 3 หมายเลข ที่สามารถเข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบแล้วแสดงความแตกต่างกันโดยมีไพรเมอร์ OPF-13 เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของพันธุ์แม่ (A010198) กับพันธุ์พ่อ (A010188) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดเหลี่ยมของฝัก และพันธุ์แม่ (A010221) กับพันธุ์พ่อ (G2) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดสีฝัก ส่วนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมการใช้ไพรเมอร์ 0PF-02 สามารถแสดงแถบดีเอ็นที่แตกต่างกันและยืนยันความเป็นลูกผสมที่แท้จริงระหว่างสายพันธุ์แม่ (A010198) และสายพันธุ์พ่อ (A010188) และการใช้ไพรเมอร์ 0PG-02 สามารถแสดงแถบดีเอ็นที่แตกต่างกันและยืนยันความเป็นลูกผสมที่แท้จริงระหว่างสายพันธุ์แม่ (A010221) และสายพันธุ์พ่อ (G2)

ได้มีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบพันธุ์และความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวทั่วไปมาแล้ว แต่ในงานทดลองครั้งนี้ จะได้ดำเนินการตรวจสอบพันธุ์การค้าที่ใช้กินในปัจจุบันและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตโดยโครงการปรับปรุงพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตขึ้นไปพร้อมกัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกพันธุ์และจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียว
2. เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของกระเจี๊ยบเขียวที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์มาแล้ว

เวลาและสถานที่วิจัย

จัดทำงานทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2547 ถึงเดือนกันยายน 2549 ระยะเวลา 2 ปีต่อเนื่อง ณ ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาพืชสวน อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ฯ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถใช้โมเลกุลเครื่องหมายจำแนกพันธุ์ ตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวและจัดกลุ่มพันธุ์ตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม
2. สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลูกผสมของกระเจี๊ยบเขียวได้และเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ (plant material and DNA isolation) แยกออกเป็น 2 งานทดลอง

งานทดลองที่ 1 การจำแนกพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ของโครงการวิจัยและพัฒนากระเจี๊ยบเขียวปี 2544 - 2549

นำใบอ่อนของโครงการกระเจี๊ยบเขียวจากแปลงทดลองบ้านโป่ง จำนวน 28 พันธุ์ โดยแยกเป็นพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เมื่อปี 2544-2545 จำนวน 24 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์10140 10047 10135 10046 10048 10117 10180 10138 10044 10108 10150 10041 10170 10115 10035 10227 10229 10209 10204 10214 10185 10226 10222 และ 10215 ส่วนพันธุ์ R และ M เป็นพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เมื่อปี 2544 -2549 และใช้เป็นพันธุ์การค้าในชื่อ แม่โจ้ 49 และแม่โจ้ 70 ปี สำหรับพันธุ์ P_2 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เมื่อปี 2544 -2549 และ พันธุ์ JP ที่เป็น F_1 ที่ได้มาจากประเทศญี่ปุ่น

ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 27 หมายเลขได้แก่ OPA-07 OPB 01-03 OPG01-20 OPN-01 OPO-09 และ OPO-11 ของบริษัท Operon technologies, USA

งานทดลองที่ 2 การคัดเลือกไพรเมอร์และการทดสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวลูกผสม

2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ สุ่มเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์แม่และพ่อ จำนวน 8 สาย พันธุ์ได้แก่สายพันธุ์ AB E_4 G_6 H_2 M_1 P_2 R_1 และ U_2 สายพันธุ์ละ 10 เมล็ดมาเพาะ จากนั้นนำใบอ่อนของต้นกล้าอายุ 16 วัน มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 23 หมายเลข ประกอบด้วย OP0 – 09 และ OP0 – 11 (ภาคผนวก 1 และ ตารางผนวก 4 และ 5) เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วใช้จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์แม่และพ่อ

2.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ สุ่มเมล็ดพันธุ์ของพันธุ์แม่และพ่อมาอย่างละ 10 เมล็ด และลูกผสมอีก 10 เมล็ด มาเพาะจากนั้นนำใบอ่อนของต้นกล้าที่อายุ 16 วันหลังงอก ได้แก่ แม่ พ่อ และลูกผสม ชั่วที่ 1 ,F_1 hybrid ของแต่ละคู่ผสม รวม 28 คู่ผสม ประกอบด้วย E_4xAB G_6xAB G_6xE_4, H_2xAB H_2xE_4 H_2xG_6 M_1xAB M_1x E_4 M_1x G_6 M_1x H_2 M_1x U_2 P_2xAB P_2x E_4 P_2x G_6 P_2x H_2 P_2x M_1 P_2x R_1 P_2x U_2 R_1x AB R_1x E_4 R_1x G_6 R_1x H_2 R_1x M_1 R_1x U_2 U_2x AB U_2x E_4 U_2x G_6 และ U_2x H_2 มาสกัดดีเอ็นเอ

ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 40 หมายเลขได้แก่ OPA01-07 OPB01-10 OPC01-15 OPG 01-06 OPO-09 และ OPO-11 ของบริษัท Operon technologies, USA

สกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการที่เสนอโดย Doyle and Doyle (1987) โดยจะสุ่มเมล็ดพันธุ์แม่ พ่อ และ ลูกผสม อย่างละ 10 เมล็ด มาเพาะในวัสดุเพาะ เมื่อต้นกล้าอายุได้ 16 วัน นำใบอ่อนของแต่ละตัวอย่างที่มีน้ำหนักประมาณ 100-300 กรัมต่อตัวอย่าง ล้างให้สะอาดแล้วนำเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (ภาคผนวก 1) จากนั้นนำมาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ แล้วปรับความเข้มข้นเท่ากับ 40 ng/µl

2. *การเตรียม PCR reaction* ใน 10 µl ประกอบด้วย 40 ng DNA template 10xPCR buffer 1.9 mM $MgCl_2$ 100 µM dNTPs (Promega) 0.5 unit *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) และ 5 pmol Primer ของแต่ละหมายเลข

3. *การปรับสภาวะเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ* ระยะแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว (predenaturation) ที่อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยระยะ denaturation ที่อุณหภูมิ 92 °ซ นาน 45 วินาที ระยะให้ไพรเมอร์เข้าสุ่มจับดีเอ็นเอแต่ละสาย (annealing) ที่อุณหภูมิ 36 °ซ นาน 1 นาที ตามด้วยระยะให้เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase สังเคราะห์ ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 2 นาที รวม 35 รอบ จากนั้นเป็นระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 5 นาที อีก 1 รอบ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริษัท Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400, Singapore

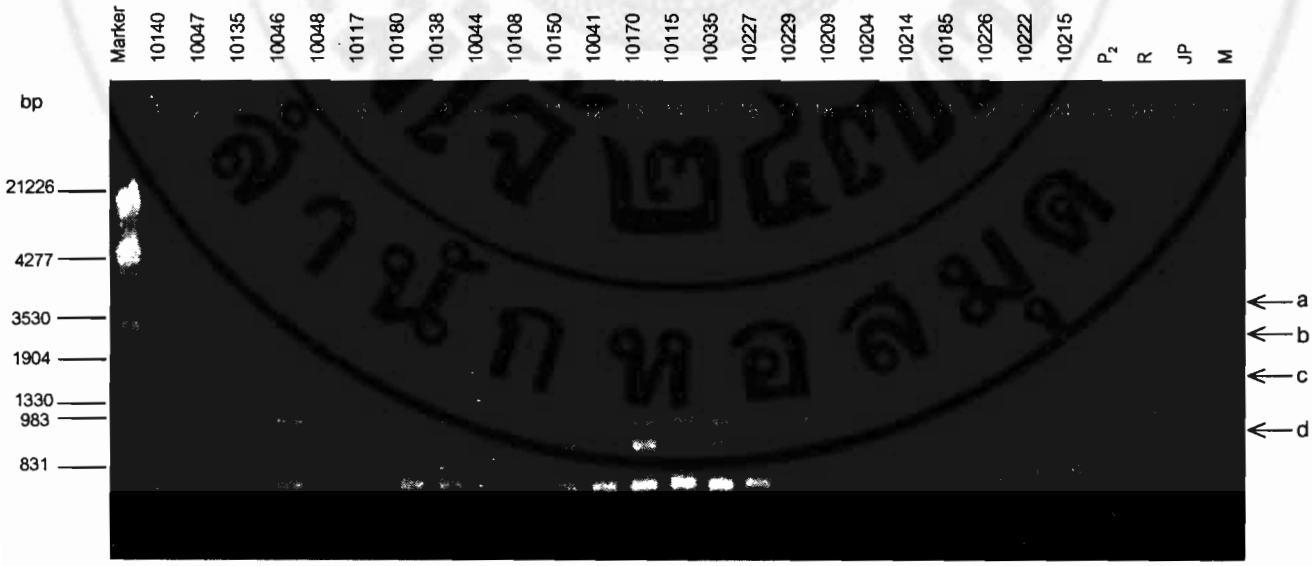
4 *การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ* นำเข้าสู่วิธีอิเล็คโตรไฟรีซีส เพื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอในแผ่นวุ้นโดยใช้กระแสไฟฟ้าในอากาโรสเจลความเข้มข้น 1.6% ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ในเครื่อง electrophoresis gel system รุ่น Mupid - 2 mini, Japan แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล Sony รุ่น DC 290

ผลการทดลอง

งานทดลอง 1 การจำแนกพันธุ์

จากการนำไพรเมอร์จำนวน 27 หมายเลข เข้าสุ่มจับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่ามีไพรเมอร์ 11 หมายเลข ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic marker) 5 หมายเลข ได้แก่ OPA-07 OPB-01 OPB-03 OPO-09 และ OPO-11 เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แสดงออกมาในรูปของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเล็ต เป็นการแสดงลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรมที่นำไปใช้ในการจำแนกพันธุ์ของกระเจี๊ยบเขียว

ในภาพ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียว เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPA-07 เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏอยู่ระหว่าง 1-6 แถบ โดยในช่องที่ 1 2 14 18 23 และ 24 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน ส่วนในช่องที่ 3 4 7 9 11ถึง13 15 ถึง17 19 ถึง 22 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันคือที่ตำแหน่ง d ในช่องที่ 8 25 และ 26 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง c และช่องที่ 25 - 26 นั้น จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง a และ b แต่ในช่องที่ 5 6 และ 10 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

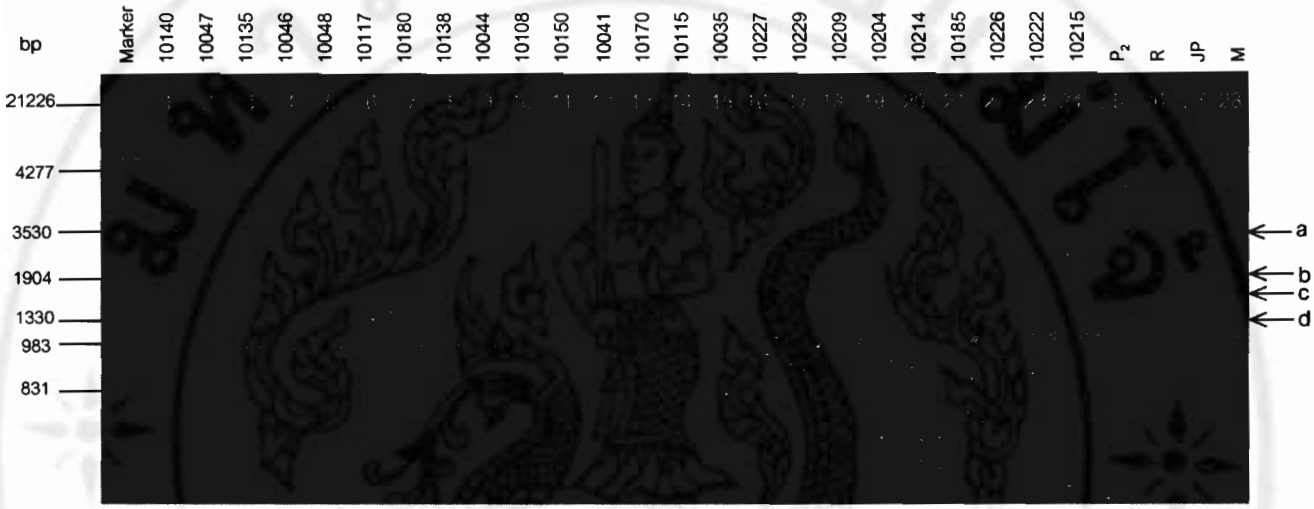


ภาพ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

ในภาพ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียว เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-01 เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏอยู่ระหว่าง 1-5 แถบ โดยในช่องที่ 1 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง a b c และ d ส่วนในช่องที่ 2 ถึง 24 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน คือที่ตำแหน่ง d

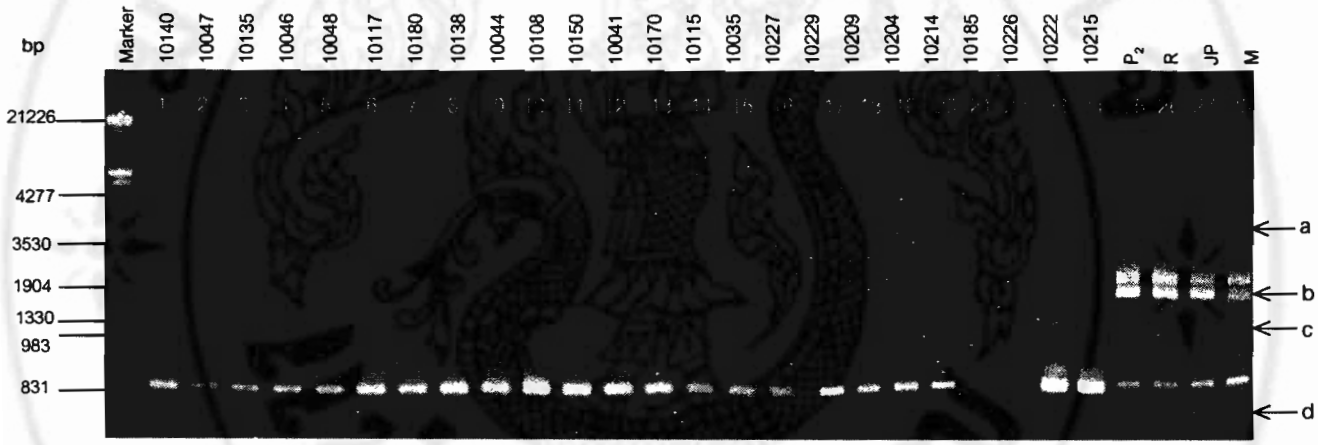


ภาพ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ไพรเมอร์ OPB-01

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

ในภาพ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียว เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-03 เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏอยู่ระหว่าง 1 - 6 แถบ โดยในช่องที่ 1 6 ถึง 8 10ถึง 12 23 ถึง 28 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง b ส่วนในช่องที่ 1 4 6 8 10ถึง20 23ถึง24 26 ถึง27 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันคือ c ในช่องที่ 25-28 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง a และในช่องที่ 1 23 ถึง 28 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง d แต่ในช่องที่ 21ถึง22 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

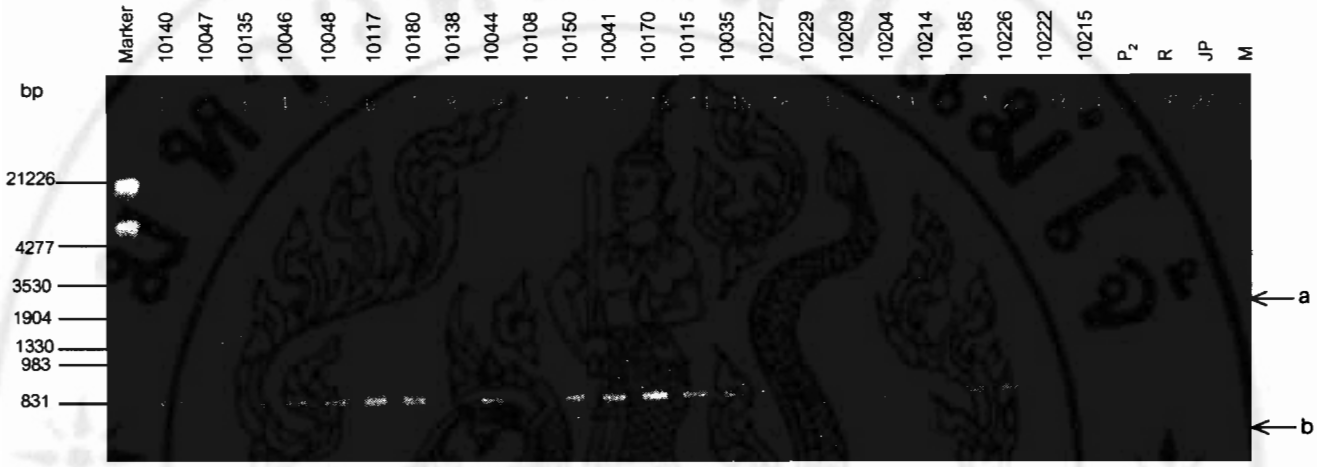


ภาพ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ไพรเมอร์ OPB-03

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

ในภาพ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียว เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPO-09 เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏอยู่ระหว่าง 1ถึง3 แถบ โดยในช่องที่ 1 7 10 และ 12 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง a ส่วนในช่องที่ 1 25 และ 28 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันคือ b แต่ในช่องที่ 2 23 ถึง24 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

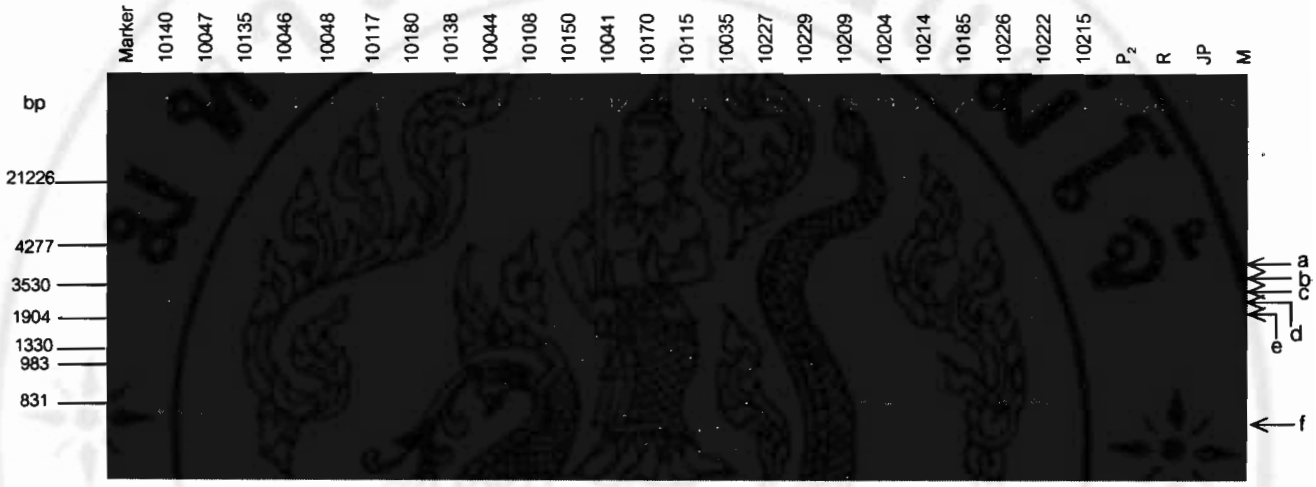


ภาพ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ไพรเมอร์ OPO-09

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

ในภาพ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียว เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPO-11 เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏอยู่ระหว่าง 1-7 แถบ โดยในช่องที่ 28 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง a b c d e และ f ส่วนในช่องที่ 1ถึง2 5 ถึง11 13 ถึง19 และ 21ถึง24 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันคือ b c d e และ f ส่วนในช่องที่ 3 และ 20 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ



ภาพ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ไพรเมอร์ OPO-11

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 1 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์ จากการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ 5 หมายเลข

ไพรเมอร์		พันธุ์																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
OPA-07	a	0	0	0	0	-	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	b	0	0	0	0	-	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	c	0	0	0	0	-	-	0	1	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	d	0	0	1	1	-	-	1	0	1	-	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB-01	a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	d	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
OPB-03	a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	1	1	1	1
	b	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	1	1	1	1	1	1
	c	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	1	1	0	1	1	0
	d	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	1	1	1	1	1	1
OPO-09	a	1	-	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0
	b	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	1	0	0	1
OPO-11	a	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	1
	b	1	1	-	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	0	0	0	1
	c	1	1	-	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1
	d	1	1	-	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1
	e	1	1	-	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1
	f	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1

หมายเหตุ 1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ, - ไม่แสดงแถบดีเอ็น, 0 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตาราง 2 ค่าดัชนีความเหมือน (similarity) ของกระเจี๊ยบเขียว 28 สายพันธุ์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. 10140	1.0000													
2. 10047	0.5000	1.0000												
3. 10135	0.1000	0.5000	1.0000											
4. 10046	0.2000	0.2500	0.6667	1.0000										
5. 10048	0.4286	1.0000	1.0000	0.2857	1.0000									
6. 10117	0.5714	0.7500	0.3333	0.3750	0.7500	1.0000								
7. 10180	0.5333	0.7500	0.5000	0.3000	0.7500	0.7778	1.0000							
8. 10138	0.5333	0.6667	0.2000	0.3000	0.7500	1.0000	0.6364	1.0000						
9. 10044	0.4000	0.8571	1.0000	0.3750	1.0000	0.7500	0.7778	0.6000	1.0000					
10. 10108	0.6429	0.7500	0.2500	0.3333	0.6667	0.8889	0.8889	0.8889	0.6667	1.0000				
11. 10150	0.5333	0.6667	0.5000	0.4444	0.7500	1.0000	0.8000	0.8000	0.7778	0.8889	1.0000			
12. 10041	0.2667	0.1111	0.4000	0.5000	0.1111	0.3333	0.4000	0.2727	0.2000	0.4444	0.4000	1.0000		
13. 10170	0.4667	0.7500	0.6667	0.5000	0.8571	0.8750	0.7000	0.7000	0.8750	0.7778	0.8889	0.3000	1.0000	
14. 10115	0.5000	0.8571	0.3333	0.3750	0.8571	0.8750	0.6000	0.7778	0.7500	0.7778	0.7778	0.2000	0.8750	1.0000
15. 10035	0.4667	0.7500	0.6667	0.5000	0.8571	0.8750	0.7000	0.7000	0.7000	0.7778	0.8889	0.3000	1.0000	0.8750
16. 10227	0.4667	0.7500	0.6667	0.5000	0.8571	0.8750	0.7000	0.7000	0.7000	0.7778	.8889	.3000	1.0000	0.8750

ตาราง 2 ค่าดัชนีความเหมือน (similarity) ของกระเจี๊ยบเขียว 28 สายพันธุ์ (ต่อ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
17. 10229	0.4667	0.7500	0.6667	0.5000	0.8571	0.8750	0.7000	0.7000	0.7000	0.7778	0.8889	0.3000	1.0000	0.8750
18. 10209	0.5000	0.8571	0.3333	0.3750	0.8571	0.8750	0.7778	0.7778	0.7778	0.7778	0.7778	0.2000	0.8750	1.0000
19. 10204	0.4667	0.7500	0.6667	0.5000	0.8571	0.8750	0.7000	0.7000	0.7000	0.7778	0.8889	0.3000	1.0000	0.8750
20. 10214	0.2000	0.3333	0.6667	1.0000	0.5000	0.6667	0.4000	0.4000	0.4000	0.5000	0.7500	0.6000	1.0000	0.6667
21. 10185	0.5000	0.8571	1.0000	0.4286	1.0000	1.0000	0.7500	0.7500	0.7500	0.8571	1.0000	0.2500	1.0000	0.8571
22. 10226	0.5000	0.8571	1.0000	0.4286	1.0000	1.0000	0.7500	0.7500	0.7500	0.8571	1.0000	0.2500	1.0000	0.8571
23. 10222	0.7500	0.6667	0.2000	0.3000	0.6667	0.8889	0.8000	0.8000	0.8000	0.8889	0.8000	0.3000	0.7000	0.7778
24. 10215	0.7500	0.6667	0.2000	0.3000	0.6667	0.8889	0.8000	0.8000	0.8000	0.8889	0.8000	0.3000	0.7000	0.7778
25. P_2	0.3889	0.3333	0.0000	0.0714	0.4000	0.4545	0.4286	0.4286	0.4286	0.4167	0.3333	0.0667	0.2667	0.2857
26. R	0.3889	0.3077	0.0000	0.1538	0.4000	0.6000	0.5385	0.5385	0.5385	0.5455	0.4286	0.1429	0.3571	0.3846
27. JP	0.4667	0.4000	0.0000	0.2000	0.4000	0.6000	0.5455	0.5455	0.5455	0.5455	0.5455	0.1818	0.4545	0.5000
28. M	0.5000	0.5000	0.0000	0.0769	0.4545	0.5000	0.4615	0.4615	0.4615	0.4615	0.4615	0.0714	0.3846	0.4167

ตาราง 2 ค่าดัชนีความเหมือน (similarity) ของกระเจี๊ยบเขียว 28 สายพันธุ์ (ต่อ)

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
15. 10035	1.0000													
16. 10227	1.0000	1.0000												
17. 10229	1.0000	1.0000	1.0000											
18. 10209	0.8750	0.8750	0.8750	1.0000										
19. 10204	1.0000	1.0000	1.0000	0.8750	1.0000									
20. 10214	1.0000	1.0000	1.0000	0.6667	1.0000	1.0000								
21. 10185	1.0000	1.0000	1.0000	0.8571	1.0000	1.0000	1.0000							
22. 10226	1.0000	1.0000	1.0000	0.8571	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000						
23. 10222	0.7000	0.7000	0.7000	0.7778	0.7000	0.4000	0.8571	0.8571	1.0000					
24. 10215	0.7000	0.7000	0.7000	0.7778	0.7000	0.4000	0.8571	0.8571	1.0000	1.0000				
25. P_2	0.2667	0.2667	0.2667	0.2857	0.2667	0.0000	0.3333	0.3333	0.4615	0.4615	1.0000			
26. R	0.3571	0.3571	0.3571	0.3846	0.3571	0.1111	0.3636	0.3636	0.5385	0.5385	0.8333	1.0000		
27. JP	0.4545	0.4545	0.4545	0.5000	0.4545	0.1667	0.5000	0.5000	0.7000	0.7000	0.5833	0.7273	1.0000	
28. M	0.3846	0.3846	0.3846	0.4167	0.3846	0.0000	0.5000	0.5000	0.6364	0.6364	0.6154	0.5000	0.6364	1.0000

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียวทั้ง 28 พันธุ์ โดยใช้โปรแกรม NTsys pc รุ่น 2.01d และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair grouping method using arithmetic average (UPGMA) แสดงผลในรูปของ phylogenetic tree (ภาพ 6) พบว่าจัดแบ่งออกได้เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มี 1 พันธุ์ ได้แก่ 10140

กลุ่มที่ 2 มี 6 พันธุ์ ได้แก่ 10047 10048 10135 10044 10185 และ 10226

กลุ่มที่ 3 มี 8 พันธุ์ ได้แก่ 10170 10035 10227 10229 10204 10214 10115 และ 10209

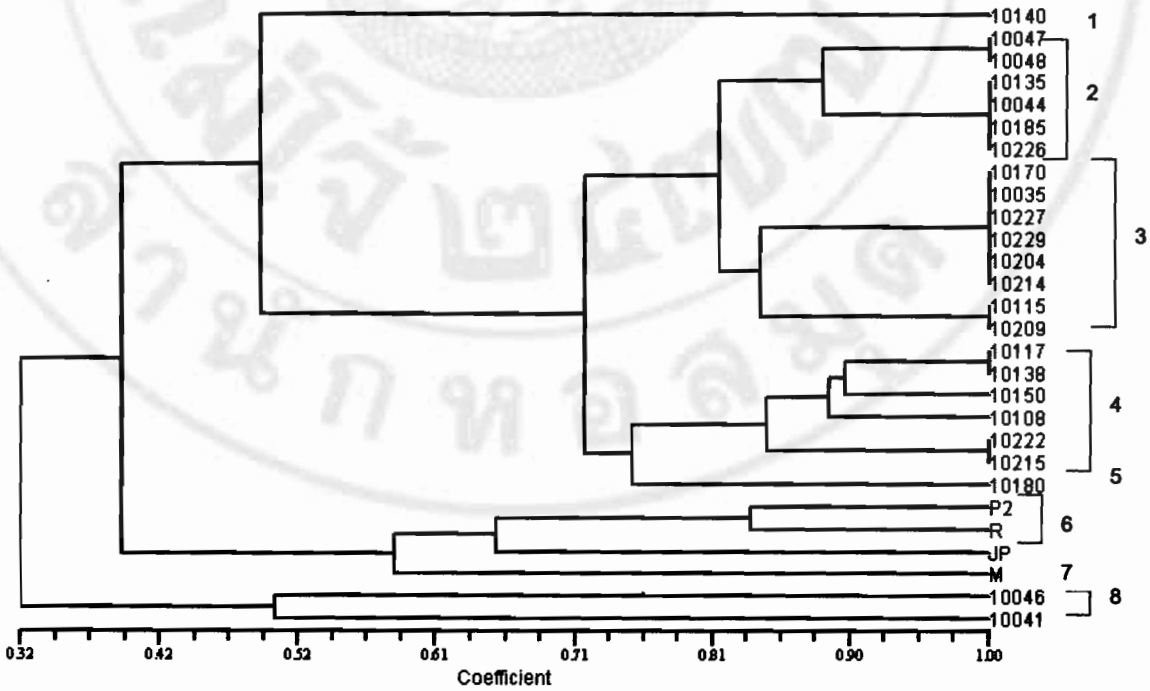
กลุ่มที่ 4 มี 6 พันธุ์ ได้แก่ 10117 10138 10150 10108 10222 และ 10215

กลุ่มที่ 5 มี 1 พันธุ์ ได้แก่ 10180

กลุ่มที่ 6 มี 3 พันธุ์ ได้แก่ P_2 R และ JP

กลุ่มที่ 7 มี 1 พันธุ์ ได้แก่ M

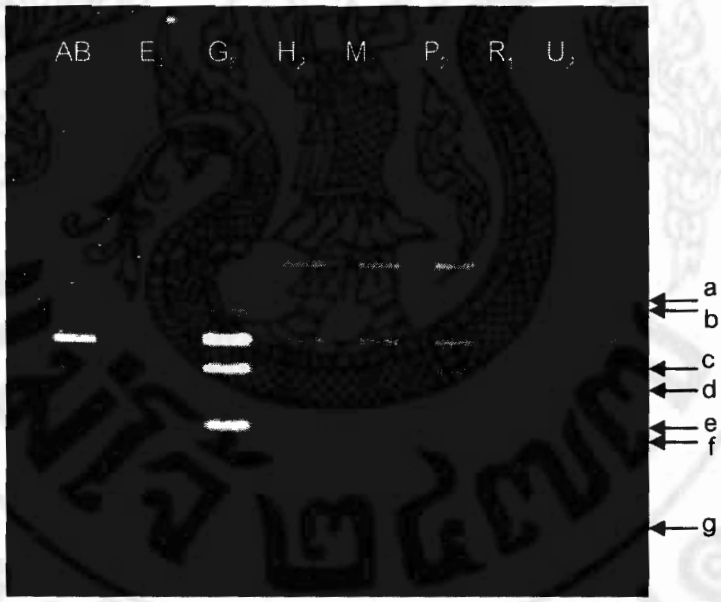
กลุ่มที่ 8 มี 2 พันธุ์ ได้แก่ 10046 และ 10041



ภาพ 6 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์

งานทดลองที่ 2 การคัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบความบริสุทธิ์ของลูกผสม

จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 27 หมายเลข เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ไว้ 2 หมายเลข ได้แก่ OPA 07 และ OPB10 โดยไพรเมอร์ OPA 07 สามารถเข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์พ่อ ทั้ง 8 สายพันธุ์แล้วแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Polymorphic banding of DNA หรือ Polymorphism) ทุกสายพันธุ์ (ภาพ 7) และไพรเมอร์หมายเลขเดียวกันนี้ยังสร้างแถบดีเอ็นที่แตกต่างกันในลูกผสมทั้ง 28 คู่ผสม ส่วนไพรเมอร์ OPB-10 สามารถเข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบแล้วแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 คู่ผสม คือ U_2x AB และ U_2x E_4



ภาพ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่และพ่อ 8 สายพันธุ์ ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

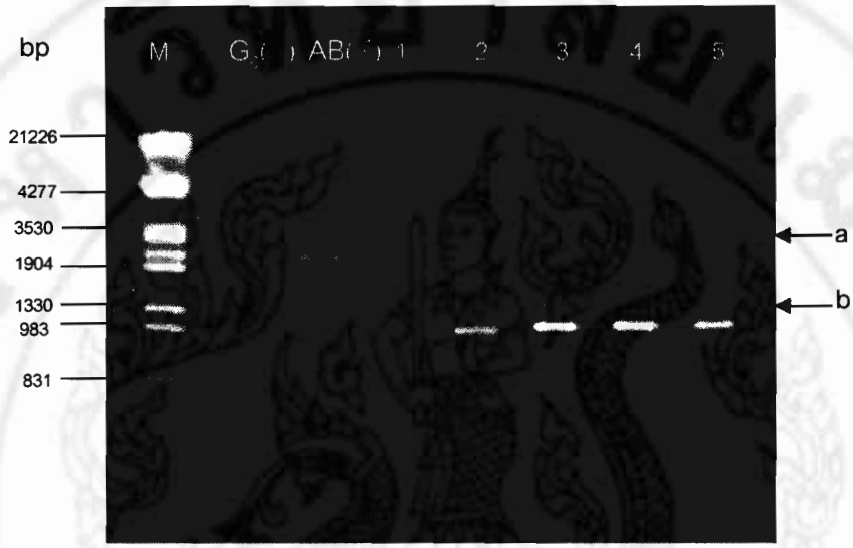
ในคู่ผสม E_4 x AB ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 3 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่แต่ไม่พบในพันธุ์พ่อ และปรากฏว่า แถบนี้ในลูกผสมต้นที่ 3 – 5 ส่วนแถบ b พบในพันธุ์พ่อ และปรากฏแถบนี้ในลูกผสมต้นที่ 1 2 4 และ 5 (ภาพ 8 และตาราง 3)

ภาพ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ E_4xAB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA- 07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

ในคู่ผสม G_6 x AB ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 8 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่แต่ไม่พบในพันธุ์พ่อ(AB) และปรากฏแถบนี้ในลูกผสมต้นที่ 2 – 5 ส่วนแถบ b พบในพันธุ์พ่อ (AB) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 9 และตาราง 3)



ภาพ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ G_6x ABและลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hind* III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

สำหรับคู่ผสม G_6 x E_4 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (G_6) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น และแถบ b พบในพันธุ์พ่อ (E_4) ที่ปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 10 และตาราง 3)

ภาพ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ G_6x E_4และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

สำหรับคู่ผสม H_2 x AB ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (H_2) ที่ปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ b พบในพันธุ์พ่อ (AB) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 11 และตาราง 3)

ภาพ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ H_2x ABและลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

สำหรับคู่ผสม H_2 x E_4 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 5 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 2 แถบ โดยแถบ a และ b พบในพันธุ์แม่ (H_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 12 และตาราง 3)

ภาพ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ H_2x E_4และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

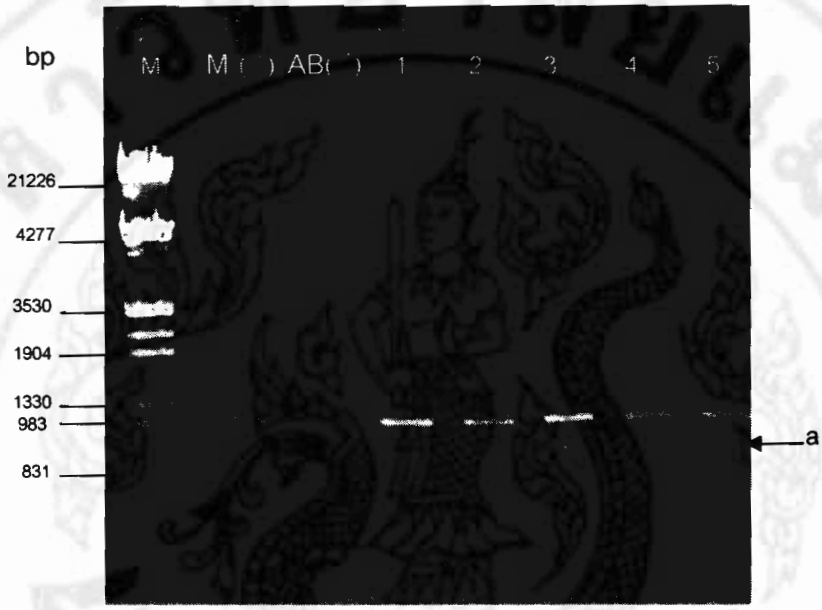
ในคู่ผสม H_2 x G_6 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 6 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (G_6) ปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 13 และตาราง 3)

ภาพ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์H_2xG_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม M_1 x AB ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (AB) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 14 และตาราง 3)



ภาพ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ M_1xABและลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม M_1 x E_4 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 5 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (M_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 15 และตาราง 3)

ภาพ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ M_1x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

คู่ผสม M_1 x G_6 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 5 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (M_1) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 1 3 4 และ 5 (ภาพ 16 และตาราง 3)

ภาพ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ M_1x G_6และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

สำหรับคู่ผสม M_1 x H_2 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (H_2) และปรากฏในลูกผสมต้นที่1-4 ส่วนแถบ b พบในพันธุ์แม่ (M_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น และแถบ c พบในพันธุ์แม่และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 17 และตาราง 3)

ภาพ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ M_1x H_2และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แสดงความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ

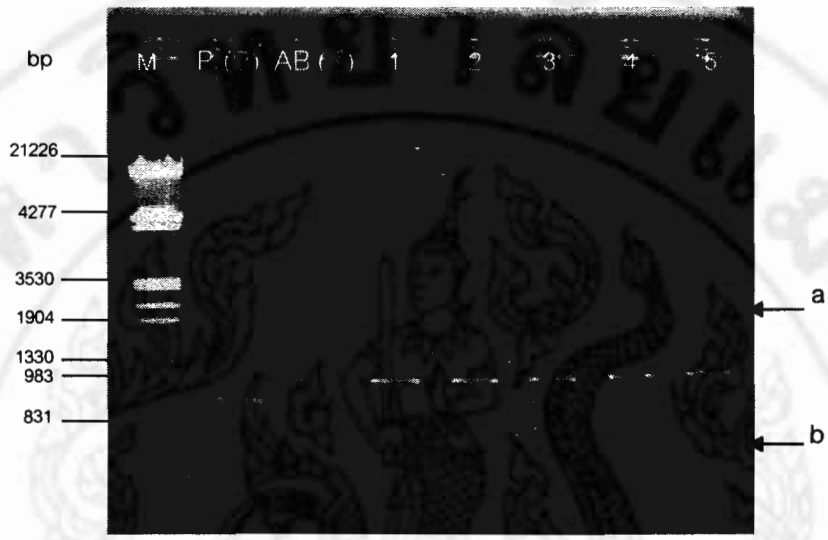
ในคู่ผสม M_1 x U_2 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (U_2) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 3 - 5 (ภาพ 18 ตาราง 3)

ภาพ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ M_1x U_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม P_2 x AB ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 5 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (P_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 19 และตาราง 3)

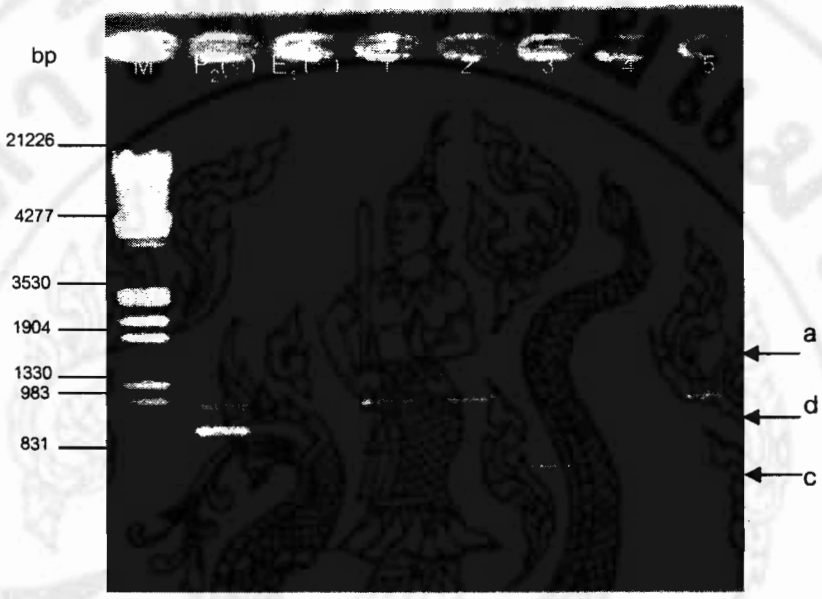


ภาพ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ P_2x ABและลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hind* III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม P_2 x E_4 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (AB) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ b พบในพันธุ์แม่ (P_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 20 และตาราง 3)



ภาพ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ P_2 x E_4และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hind* III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม P_2 x G_6 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 แถบ โดยแถบ a และ b พบในพันธุ์แม่ (P_2) ที่ปรากฏในลูกผสมต้นที่ 1 2 และ 5 ส่วนแถบ c พบในพันธุ์แม่ (P_2) ที่ปรากฏ ในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 21 และตาราง 3)

ภาพ 21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ P_2 x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม P_2 x H_2 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (H_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 22 และตาราง 3)

ภาพ 22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ P_2 x H_2และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม P_2 x M_1 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (M_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 23 และตาราง 3)

ภาพ 23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ P_2x M_1 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

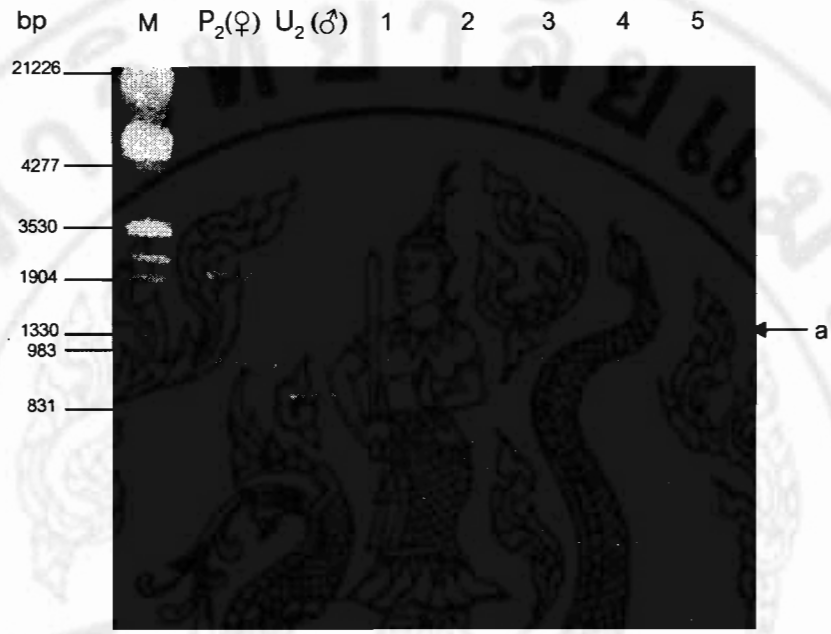
ในคู่ผสม P_2 x R_1 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ(R_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 24 และตาราง 3)

ภาพ 24 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ P_2x R_1 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

สำหรับคู่ผสม P_2 x U_2 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 9 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 6 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์พ่อ (U_2) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 1 - 4 (ภาพ 25 และตาราง 3)

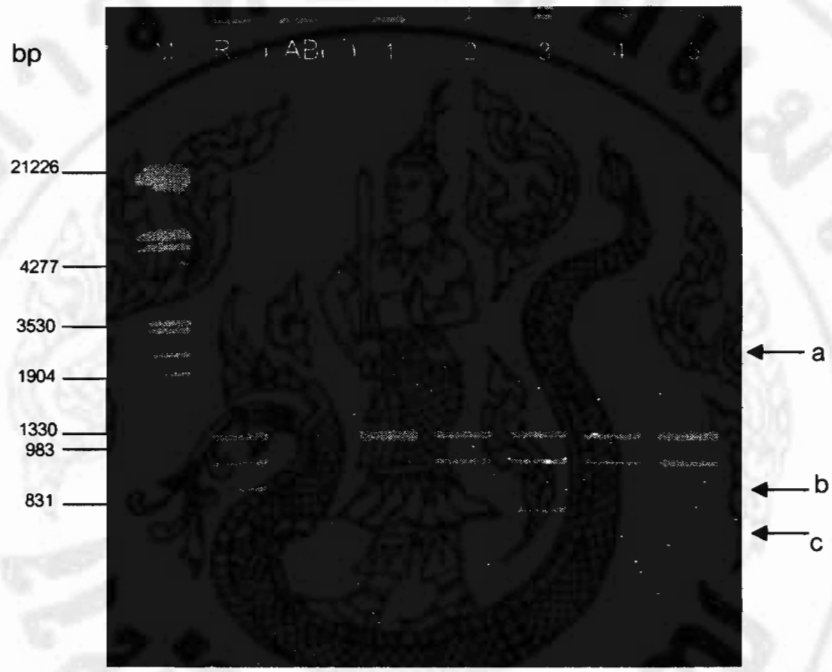


ภาพ 25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ P_2 x U_2และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

สำหรับคู่ผสม R_1 x AB ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (R_1) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 1 และ 2 ส่วนแถบ b พบในพันธุ์แม่ (R_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 26 และตาราง 3)



ภาพ 26 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ R_1x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

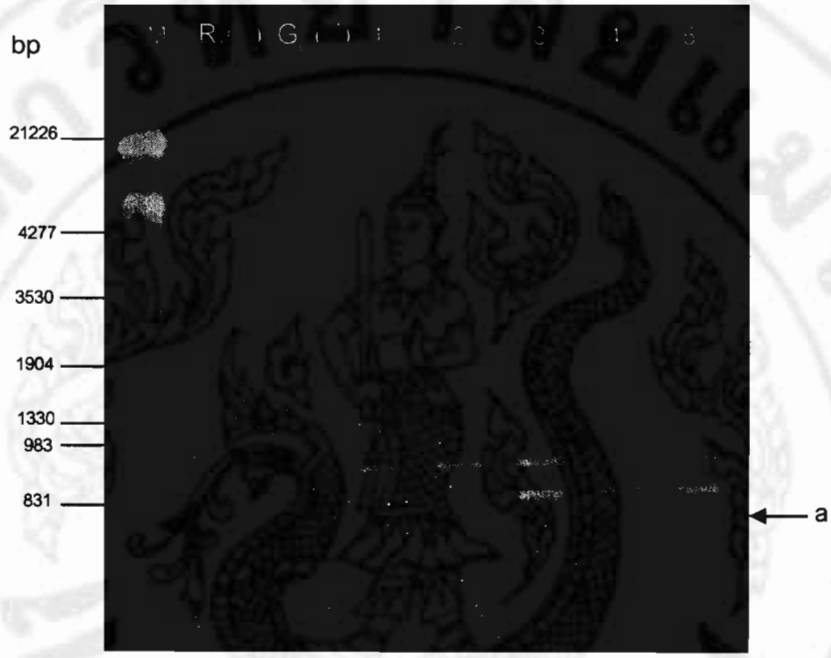
สำหรับคู่ผสม R_1 x E_4 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 6 แถบ โดยแถบ a และ b พบในพันธุ์แม่ (R_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 27 และตาราง 3)

ภาพ 27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ R_1x E_4 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

สำหรับคู่ผสม R_1 x G_6 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (R_1) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 1 2 3 และ 5 (ภาพ 28 และตาราง 3)



ภาพ 28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ R_1x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

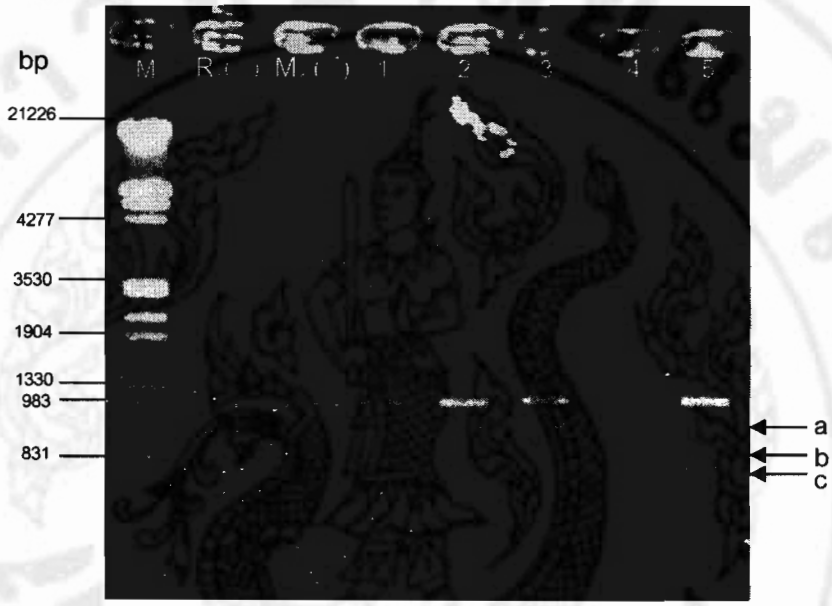
ในคู่ผสม R_1 x H_2 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 5 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่(R_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ b พบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 29 และตาราง 3)

ภาพ 29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ R_1x H_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

คู่ผสม R_1 x M_1 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 6 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (R_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ b พบในพันธุ์แม่ (R_1) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 1 2 3 และ 5 และแถบ c พบในพันธุ์พ่อ(M_1) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 3-5 (ภาพ 30 และตาราง 3)

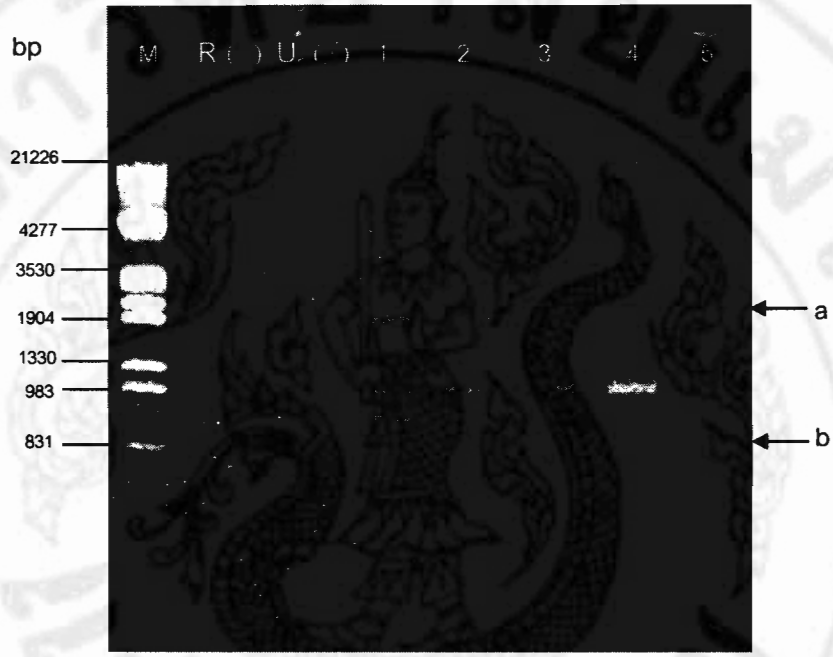


ภาพ 30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ R_1x M_1และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม R_1 x U_2 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 5 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (R_1) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ b พบในพันธุ์พ่อ (U_2) และพบในลูกผสมทั้งหมด 5 ต้น (ภาพ 31 และตาราง 3)



ภาพ 31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ R_1x U_2และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม U_2 x AB ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ b พบในพันธุ์แม่ (U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น สำหรับ แถบ c พบเฉพาะในพันธุ์แม่(U_2) และปรากฏ ในลูกผสมต้นที่ 1 2 3 และ 5 (ภาพ 32 และตาราง 3)

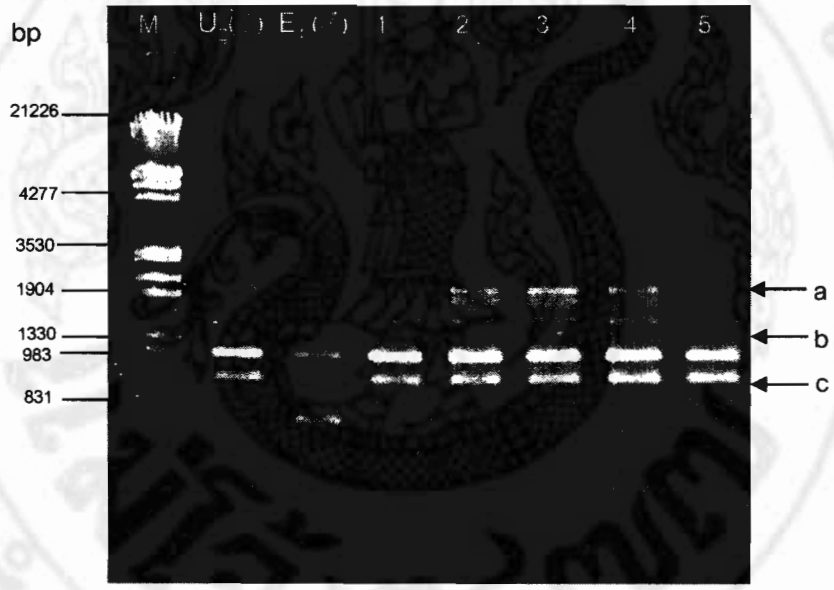
ภาพ 32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียว U_2 x AB และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม U_2 x E_4 ปรากฏว่า มีการเข้าสุ่มจับของไพรเมอร์ 2 หมายเลข คือ OPA-07 กับ OPB-10 โดย OPA-07 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 8 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 แถบ โดยแถบ a และ b พบในพันธุ์แม่ (U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ c พบเฉพาะในพันธุ์แม่ (U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 33 ก และตาราง 3)

สำหรับไพรเมอร์ OPB-10 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่(U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 33 ข และตาราง 4)



ก OPA - 07

ข OPB-10

ภาพ 33 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ U_2 x E_4 และลูกผสม 5 ต้นที่ใช้ไพรเมอร์ OPA - 07 (ก) และOPB -10 (ข)

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม U_2 x G_6 ปรากฏว่า มีการเข้าสุ่มจับของไพรเมอร์ 2 หมายเลข คือ OPA-07 กับ OPB-10 โดย OPA-07 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น ส่วนแถบ b พบในพันธุ์พ่อ (G_6) และปรากฏในลูกผสมต้นที่ 1 2 3 และ 5 (ภาพ 34 ก และตาราง 3)

ไพรเมอร์ OPB-10 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ โดยแถบ a พบในพันธุ์แม่ (U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 34 ข และตาราง 4)

ก OPA - 07

ข OPA - 10

ภาพ 34 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ U_2 x G_6 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-07 (ก) และ OPB-10 (ข)

M = Lambda DNA *Hin*d III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

ในคู่ผสม U_2 x H_2 ปรากฏว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 7 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 แถบ โดยแถบ a b และ c พบในพันธุ์แม่ (U_2) และปรากฏในลูกผสมทั้ง 5 ต้น (ภาพ 35 และตาราง 3)

ภาพ 35 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวพันธุ์ U_2x H_2 และลูกผสม 5 ต้น ที่ใช้ไพรเมอร์OPA-07

M = Lambda DNA *Hind* III marker

ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน

จากการตรวจสอบสาบพันธุ์ดีเอ็นเอในพันธุ์แม่ พ่อ จำนวน 28 คู่ผสม และลูกผสมทั้ง 5 ต้น ปรากฏว่า การใช้ไพรเมอร์OPA – 07 ให้ความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมร้อยละ 100 ได้ 14 คู่ผสม และจากการใช้ไพรเมอร์ OPB – 10 ให้ความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมร้อยละ 100 ใน 2 คู่ผสม (ตาราง 3 และ 4)

ตาราง 3 แถบดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม 28 คู่ผสม จากไพรเมอร์ OPA-07

คู่ผสม	♀	♂	F1 hybrid					ตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่าง	ความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ (%)
			1	2	3	4	5		
E_4 x AB	0	0	0	0	0	0	1	a	60
	0	1	1	1	0	0	0	b	80
	1	1	0	0	1	1	1	c	
G_6 x AB	1	1	0	1	1	1	1	a	80
	1	1	0	1	1	1	1	b	100
G_6 x E_4	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	0	0	0	0	0	1	1	b	100
H_2 x AB	0	1	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	1	1	1	1	1	b	100
H_2 x E_4	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	1	1	1	1	1	b	
H_2 x G_6	1	1	1	0	1	1	0	a	100
M_1 x AB	0	1	1	1	1	1	1	a	100
M_1 x E_4	1	0	1	1	1	1	1	a	100
M_1 x G_6	1	0	1	0	1	1	1	a	100
	0	1	0	0	1	0	0	b	80
	0	1	1	1	1	1	1	c	

ตาราง 3 แถบดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม 28 คู่ผสม จากไพรเมอร์ OPA-07 (ต่อ)

คู่ผสม	♀	♂	F1 hybrid					ตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่าง	ความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ (%)
			1	2	3	4	5		
M_1 x H_2	0	1	1	1	1	1	0	a	100
	1	0	1	1	1	0	0	b	80
M_1 x U_2	0	1	0	0	1	1	0	a	60
P_2 x AB	0	1	1	1	1	1	1	a	100
	1	1	0	0	0	0	0	b	
P_2 x E_4	0	1	0	1	1	1	1	a	100
	1	0	1	1	1	1	1	b	
	0	1	0	0	0	0	0	c	
P_2 x G_6	1	0	1	1	0	0	1	a	60
	1	0	1	1	0	0	1	b	100
	1	0	1	1	0	0	1	c	
P_2 x H_2	0	1	1	0	1	1	1	a	100
P_2 x M_1	0	0	1	1	1	1	0	a	100
P_2 x R_1	0	1	1	1	1	1	1	a	100
P_2 x U_2	0	1	0	0	0	0	0	a	80
R_1 x AB	1	0	1	1	0	0	0	a	40
	1	0	1	1	0	0	1	b	100
	0	1	0	1	0	0	1	c	
R_1 x E_4	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	1	1	1	1	1	b	20
R_1 x G_6	1	0	1	1	1	0	1	a	80

ตาราง 3 แถบดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม 28 คู่ผสม จากไพรเมอร์ OPA-07 (ต่อ)

$R_1 \times H_2$	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	0	0	1	1	1	1	1	b	100
	1	0	1	1	1	1	1	c	
	1	0	1	1	1	1	1	d	
	0	1	1	1	1	1	1	e	
$R_1 \times M_1$	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	0	1	0	0	1	b	80
	1	1	0	0	1	1	1	c	
$R_1 \times U_2$	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	1	1	1	1	1	b	100
$U_2 \times AB$	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	0	0	0	0	0	b	80
	1	0	0	0	0	0	0	c	
$U_2 \times E_4$	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	0	0	0	0	0	b	100
	1	0	1	1	1	1	1	c	
$U_2 \times G_6$	1	0	1	0	1	1	1	a	100
	0	1	1	0	0	0	1	b	80
$U_2 \times H_2$	1	0	1	1	1	1	1	a	100
	1	0	1	1	1	1	1	b	100
	1	0	0	0	0	0	0	c	100
	1	0	1	1	1	1	1	d	
	1	1	0	0	0	0	0	e	
	1	0	1	1	1	1	1	f	

ตาราง 4 แถบดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม 28 คู่ผสม ที่ได้จากไพรเมอร์ OPB-10

คู่ผสม	♀	♂	F1 hybrid					ตำแหน่งที่แถบดีเอ็นเอแตกต่าง	ความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ (%)
			1	2	3	4	5		
$U_2 \times E_4$	1	0	1	1	1	1	1	a	100
$U_2 \times G_6$	1	0	1	1	1	1	1	a	100

นอกจากนี้ยังพบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 2 หมายเลข คือ OPA – 07กับ OPB - 10 จากจำนวนไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในงานทดลองนี้ทั้งหมด 40 หมายเลข หรือคิดเป็นร้อยละ 5 ที่สามารถเข้าไปสุ่มจับกับแถบดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวแล้วเพิ่มปริมาณจนปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกพันธุ์คู่ผสมและตรวจสอบความเป็นลูกผสมของคู่ผสมได้ ทั้งนี้ไพรเมอร์ OPA-07 สามารถเข้าสุ่มจับกับแม่แบบดีเอ็นเอ (DNA template) ได้ทุกคู่ผสมคือ 28 คู่ผสม รองลงมาคือ OPB-10 ได้เท่ากับ 2 คู่ผสม (ตาราง 3)

ตาราง 5 ชนิดและหมายเลขไพรเมอร์ที่สร้างแถบดีเอ็นเอ ของกระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่ พ่อ และลูกผสม

ลำดับที่	ชนิด/หมายเลขของไพรเมอร์	คู่ผสม/ลูกผสม	รวมจำนวนคู่ผสม	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (maximum bands)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands)
1	OPA-07	E_4xAB G_6xAB G_6xE_4 H_2xAB H_2xE_4 H_2xG_6 M_1xAB M_1x E_4 M_1x G_6 M_1x H_2 M_1x U_2 P_2xAB P_2x E_4 P_2x G_6 P_2x H_2 P_2x M_1 P_2x R_1 P_2x U_2 R_1x AB R_1x E_4 R_1x G_6 R_1x H_2 R_1x M_1 R_1x U_2 U_2x AB U_2x E_4 U_2x G_6 U_2x H_2	28	183	114
2	OPB-10	U_2 x E_4 U_2 x G_6	2	4	2
รวม	2	30	30	187	116

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานทดลองที่ 1

การจำแนกพันธุ์

การตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว 28 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 27 หมายเลข เข้าสุ่มจับดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่ามี 11 หมายเลข ที่เข้าสุ่มจับแล้วแสดงแถบดีเอ็นเอ และมีเพียง 5 หมายเลข ได้แก่ OPA-07 OPB-01 OPB-03 OPO-09 และ OPO-11 ที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกระเจี๊ยบเขียวทั้ง 28 พันธุ์ได้จำนวน 217 ตำแหน่งจากจำนวนทั้งหมด 419 ตำแหน่ง คิดเป็น 51.78% โดยไพรเมอร์ OPO-11 (ภาพ 5) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 7 แถบ และไพรเมอร์ OPO-09 (ภาพ 33) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดเพียง 3 แถบ เมื่อพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอแล้วพบว่า เกือบทุกไพรเมอร์จะแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ R และพันธุ์ M หรือพันธุ์แม่โจ้ 49 และพันธุ์แม่โจ้ 70 ปีตามลำดับอย่างชัดเจน ในขณะที่พันธุ์ JP ซึ่งนำมาจากประเทศญี่ปุ่น ในไพรเมอร์ OPO-11 จะแสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์อื่น ๆ แสดงว่ามีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันหรือนำสายพันธุ์มาจากแหล่งเดียวกัน

สำหรับการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในบางพันธุ์ เช่น พันธุ์ 10048 10117 10108 ในไพรเมอร์ OPA-07 (ภาพ 1) เมื่อการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์หมายเลขอื่นพบว่าพันธุ์ดังกล่าวปรากฏแถบดีเอ็นเอ แสดงว่า DNA ที่ใช้ไม่ผิดปกติ แต่ไพรเมอร์อาจไม่มีลำดับเบสที่สามารถจับกับตำแหน่งของจีโนมบริเวณที่ทำให้เกิดแถบเครื่องหมาย จึงไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีอ็นเอในพีซีอาร์ ได้ (เสริมสกุลและคณะ, 2545) นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ 10185 10226 10047 10222 10215 10135 และ 10214 ที่ไม่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบางไพรเมอร์ได้

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsys pc รุ่น 2.01d และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ได้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity matrix) โดยพบว่ากระเจี๊ยบเขียวทั้ง 28 สายพันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.00-100% (ตาราง 2) โดยพันธุ์ 10170 มีความใกล้ชิด (100%) กับพันธุ์อื่นมากที่สุด ในขณะที่พันธุ์ P_2, R, JP และ M แตกต่างไปจากพันธุ์ 10135 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าวมีการปรับปรุงพันธุ์มาแล้วหลายครั้งจึงทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป

และเมื่อแสดงในรูปของ dendrogram (ภาพ 6) พบว่าค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) เท่ากับ 0.32 สามารถแยกกลุ่มของกระเจี๊ยบเขียวเป็น 8 กลุ่ม จะเห็นว่าพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์เมื่อปี 2544-2545 คือกลุ่มที่ 1-8 จะมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์มาก ยกเว้นพันธุ์

10046 และ 10041 ในกลุ่มที่ 8 ส่วนพันธุ์ JP ในกลุ่มที่ 6 มีความใกล้ชิดกับพันธุ์ P_2 และ R แต่ก็ยังมีความแตกต่างในกลุ่มเดียวกันอยู่ อาจเนื่องมาจาก พันธุ์ JP มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศญี่ปุ่นทำให้ให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากน้อยแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้แสดงความสัมพันธ์กับประเทศแหล่งกำเนิดหรือที่มาของพันธุ์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ เสริมสกุลและคณะ (2545) ที่ศึกษาพันธุ์มะกอกน้ำมันจากประเทศ สเปน อิตาลี และอิสราเอลพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีความสัมพันธ์กับประเทศแหล่งกำเนิดพันธุ์ด้วย และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ R ในกลุ่มที่ 6 และพันธุ์ M ในกลุ่มที่ 7 พบว่ายังให้ความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์กันบ้างแต่ไม่มากนัก เพราะอาจมีถิ่นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน

งานทดลองที่ 2

ความบริสุทธิ์ของลูกผสม

จากการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 40 หมายเลข ทดสอบกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ จำนวน 28 คู่ผสม พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 27 หมายเลข สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่มีเพียง 2 หมายเลขเท่านั้นที่แถบดีเอ็นเอของต้นพ่อแตกต่างจากต้นแม่ ในแต่ละคู่ผสม โดยไพรเมอร์หมายเลข OPA-07 สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายได้ทุกคู่ผสม แสดงให้เห็นว่ากระเจี๊ยบเขียวสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์พ่อที่นำมาทดสอบนี้อาจมีฐานทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมาก ถึงแม้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏแตกต่างกัน สาเหตุอีกประการหนึ่งอาจจะเนื่องมาจากแหล่งที่มาของเมล็ดพันธุ์ การใช้เทคนิคนี้จะแสดงผลได้สูงกว่าการใช้ในถั่วฝักยาว รายงานของ ปิยะพรและคณะ (2544) ที่ตรวจสอบระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 43 ไพรเมอร์ แต่มีเพียง 3 ไพรเมอร์ ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เทคนิคRAPD ไม่สามารถแสดงความแปรปรวนในถั่วฝักยาวได้ดีเท่าที่ควรจะเป็น

ผลจากการสุ่มเลือกลูกผสมมาคู่ผสมละ 5 ต้น ทั้ง 28 คู่ผสม พบว่ามี 14 คู่ผสม ที่มีความบริสุทธิ์ 100 % คือ คู่ผสม G_6x E_4 H_2 x AB H_2xE_4 M_2x AB M_1x E_4 P_2 x AB P_2x E_4 P_2x H_2 P_2x M_1 P_2x R_1 R_1x H_2 R_1 x U_2 U_2x E_4 และ U_2 x H_2 ในไพรเมอร์ OPA-07 และ 2 คู่ผสมคือ U_2 x E_4 และ U_2 x G_6 ในไพรเมอร์ OPB-10 ส่วนคู่ผสมอื่นๆ จะมีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไป เช่น คู่ผสม P_2 x G_6 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนแม่มากกว่าพ่อ ในทางตรงข้าม คู่ผสมที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนพ่อมากกว่าแม่ คือ P_2 x R_1 ซึ่งการที่ลูกผสมได้รับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาจากแม่หรือ พ่อ จำนวนหลายแถบ ย่อมแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับแม่ หรือพ่อนั้นด้วย

ในการถ่ายทอดสารพันธุกรรมผ่านเซลล์สืบพันธุ์ เมื่อมีการผสมกันระหว่างเซลล์พ่อและเซลล์แม่แล้ว เซลล์ที่ได้มาใหม่หรือลูก จะมีสารพันธุกรรมแม่ที่ได้มาจากพ่อและแม่จึงใช้ประโยชน์ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อ แม่ และลูก เพื่อพิศูจน์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้

เนื่องจากลูกผสมเป็นผลมาจากการรวมหน่วยพันธุกรรมจาก แม่ และพ่อ อย่างละครึ่ง (อัญชลี, 2546) การปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ได้รับมาจาก แม่ และพ่ออย่างละครึ่งได้ในคู่ผสม H_2x AB จากลูกผสมทั้ง 5 ต้น ในคู่ผสม M_1x H_2 จากลูกผสมต้นที่ 3 ในคู่ผสม P_2x E_4 จากลูกผสมต้นที่ 3 ในคู่ผสม R_1x AB จากลูกผสมต้นที่ 5

นอกจากนี้ ยังพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมบางต้นในบางคู่ผสมพบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแม่และพ่ออยู่ด้วย เช่น คู่ผสม G_6x E_4 ในลูกผสมต้นที่ 4 และ5 จำนวน 1 แถบ ส่วนคู่ผสม R_1 x E_4 พบในลูกผสมต้นที่ 1-5 จำนวน 2- 3 แถบ เป็นต้น โดยสาเหตุของการเกิดแถบใหม่เช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมหรือเปลี่ยนตำแหน่งหน่วยของพันธุกรรม ซึ่งพบได้บ่อยในพวกที่เป็น heterozygous (White, 1973) และอีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากคุณภาพของดีเอ็นเอ ซึ่ง Daude et al. (1997) กล่าวไว้ว่า คุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบมีผลอย่างมากต่อความสามารถในการเกิดซ้ำได้ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (reproducibility) จากการเปรียบเทียบตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชต้นเดียวกัน พบว่าการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละครั้งมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีพวกเกลือปะปนอยู่ มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ความถูกต้องของลายพิมพ์ดีเอ็นเอลดลง ดังนั้น ในการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างพืชเดียวกันจึงควรทำให้สภาพที่เหมือนกันให้มากที่สุด เพื่อให้คุณภาพดีเอ็นเอมีความใกล้เคียงกัน

ก่อนที่ผู้ผลิตจะจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ผลิตได้ จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องผ่านระบบการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์หรือการตรวจสอบความเป็นลูกผสม (hybridity) หรือความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมให้ผ่านมาตรฐานที่กำหนดไว้ และโดยหลักการแล้วควรมีความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมากกว่าร้อยละ 98 เพื่อสร้างความเชื่อมั่นแก่เกษตรกรผู้ใช้เมล็ดพันธุ์และจากงานทดลองนี้พบว่า มีพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวรวม 14 พันธุ์ที่มีความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมสูงกว่าร้อยละ 98

สรุปผลการทดลอง

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว จำนวน 28 สายพันธุ์ โดยทดสอบกับไพรเมอร์ 27 หมายเลข พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 11 หมายเลข หรือร้อยละ 41 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และมีไพรเมอร์ 5 หมายเลข หรือร้อยละ 45 ของไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันและใช้จำแนกพันธุ์ได้ ได้แก่ OPA-07 OPB-01 OPB-03 OPO-09 และ OPO-11 โดยมีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 419 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 217 แถบ คิดเป็นร้อยละ 51.78 และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsys พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ (similarity coefficient) เท่ากับ 0.32 สามารถแยกกลุ่มของกระเจี๊ยบเขียวเป็น 8 กลุ่ม โดยมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.00-100% ตลอดจนพบความแตกต่างระหว่างประเทศแหล่งกำเนิดด้วย

จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจี๊ยบเขียวลูกผสม 28 คู่ผสม โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 40 หมายเลข คือ OPA01-07 OPB01-10 OPC01-15 OPG 01-06 OPO-09 และ OPO-11 พบว่ามีไพรเมอร์ 2 หมายเลข คิดเป็น 5% คือ OPA -07 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้ง 28 คู่ผสม และ OPB-10 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 คู่ผสม คือ U_2x AB และ U_2x E_4 โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 187 แถบ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างรวม 116 แถบ

ผลจากการสุ่มเลือกลูกผสมมาคู่ผสมละ 5 ต้น ทั้ง 28 คู่ผสม พบว่ามี 14 คู่ผสม ที่มีความบริสุทธิ์ 100 % คือ คู่ผสม G_6x E_4 H_2 x AB H_2xE_4 M_2 x AB M_1x E_4 P_2 x AB P_2x E_4 P_2x H_2 P_2x M_1 P_2x R_1 R_1x H_2 R_1 x U_2 U_2x E_4และ U_2 x H_2 ในไพรเมอร์ OPA-07 คู่ผสม U_2 x E_4 และ U_2 x G_6 ในไพรเมอร์ OPB-10

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มพืชผัก กองส่งเสริมพืชสวน. 2537. **เอกสารวิชาการเรื่องกระเจี๊ยบเขียว**. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร.

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ .2545. **โรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว**. หนังสือเกษียนอายุราชการศาสตราจารย์ ดร.ธีระ สูตะบุตร. 86 – 89 น.

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ อรประไพ คชนนทน์ สุวรรณ กลัดพันธุ์ อำนวย อรรถลังรอง วไลลักษณ์ แพทย์วิบูลย์ และจิรภา จอมไธสง. ใน **รายงานการสัมมนาเรื่อง "กระเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออก"**. วันที่ 26 ตุลาคม 2544 ณ อาคารศูนย์กล้วยไม้และไม้ดอกไม้ประดับ. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

จรรยา จงอยู่. 2543. **การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอกระเจี๊ยบเขียว**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.

จารีย์ พันสิทธิ์. 2544. **กระเจี๊ยบ**. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. ราชบัณฑิตยสถาน. 33 น.

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2543. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(ภาษาไทย)**. 8(1) : 6-10.

ดำเกิง ป้องพาล. 2544. **การจำแนกพรรณไม้โดยวิธีการ Molecular Biology**. เอกสารประกอบการสอนวิชา พส.300 วัสดุพืชพรรณและการจำแนกไม้ดอกไม้ประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.

ประสาน สืบสุข วัลลา ดิฐพงษ์ติชญ์ และ วิไลลักษณ์ ชินะจิตร. 2541. การเปรียบเทียบแบบแผน RAPD เพื่อวิเคราะห์หา molecular markers ของมะเขือเทศที่ต้านทานต่อโรคเหี่ยวเขียว. **วารสารเทคโนโลยีสุรนารี**. 5 : 32-37.

ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และอรรัตน์ มงคลพร. 2544. ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว 5 สายพันธุ์ โดยใช้ RAPDs และ microsatellites. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 32(1-4) : 185-189.

ปิยะอร เสมอวงศ์. 2543. **เทคโนโลยีชีวภาพทางพืช**. เอกสารประกอบการสอนวิชา พร 411. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. น. 1-7.

ปรีดา นาเทเวศน์. 2548. **การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดสีและเหลี่ยมฝักในกระเจี๊ยบ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่. 83 น.

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538. **เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).** เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme Pattern และ RAPD ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 10 น.

วสันต์ จันทราทิตย์ ปราณี ลี้ชนะชัย แสงเดือน วงษ์เมตตา และ คำเพียร คำนิล. 2540. **การตรวจหา DNA finger print จาก micro satellite DNA ในกลุ่มคนไทยด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction.** รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 36 น.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และ มนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. **ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology.** โรงพิมพ์เรือนแก้ว, กรุงเทพฯ. 208 น.

วิชัย บุญแสง อัญชลี ทัศนาจร ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ นุสรา สิทธิดิลกรัตน์ และ สกล พันธุ์ยิ้ม. 2547. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ : จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล**. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ปทุมธานี. 120 น.

วาสนา ศิริรังสี. 2539. Gel Electrophoresis. น. 8-12 *ใน* วสันต์ จันทราทิตย์ ปราณี ลี้ชนะชัย และวาสนา ศิริรังสี (บรรณาธิการ). **วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน**. เชียงใหม่ : ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2539. เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction *ใน* **หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ** "เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม" เล่ม 2 น. 20.1 - 20.12. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

เสริมสกุล พจนการุณ และดิเรก ตนพยอม. 2545. การรวบรวมและศึกษาพันธ์มะกอกน้ำมัน : การศึกษาลักษณะพันธุ์มะกอกน้ำมันโดยเทคนิค RAPD. **วารสารวิชาการเกษตร**. 20(2): 155 – 168

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช อัจฉรีย์ พรพิฉิจสุวรรณ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา. 2542. **เทคนิคอาร์เอพีดีกับการควบคุมการนำเข้าเมล็ดพันธุ์หอมหัวใหญ่และกระเทียมใบ.** วารสารวิทยาศาสตร์. 17(2-3) : 19-26.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 น.

อัญชรา เขตปลาขาว. 2542. **การจำแนกพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.

อัญชลี ทัศนาขจร. 2546. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. **วารสารวิทยาศาสตร์**. 57(2) : 83-85.

Daude, F.M., D.Ralph and M. McCelland. 1997. **Arbitrarily primed PCR fingerprints**. P.5-16. *In* G.R. Taylor (ed.). Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. New York.

Doyle, J.J. and J.L.Doyle. 1987. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. Phytochemial Bulletin.19:11 – 15.

Grzebelus, D., R.Baranski, B. Michalik and P.W. Simon. 2001. **Comparison of RAPD and AFLP techniques used for the evolution of genetic diversity of carrot breeding materials.** Acta Horticulture. 546 : 413-416.

Jianhua, Z., M.B. McDonald and P.M. Sweeney. 1997. **Testing for genetic purity in petunia and cyclamen seed using random amplified polymorphic DNA markers**. Hort Science. 32 : 246-247.

Kaga, A., N. Tomooka, Y. K. Hosaka and O. Kamijima. 1996. **Species Relationship in the Subgenus ceratotropis (genus Vigna) as Revealed by RAPD analysis.** Euphytica. 88: 17 – 24.

Maciel, F. L., L.T.S. Gerald and S.Echeverrygaray. 2001. **Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker vaiability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vugalis* L.) of south – Brazil.** Euphytica. 120: 257 – 262.

Martinello, G. E. 2003. **Genetic Diversity in Okra using RAPD markers**. Hortic bras. 21: 20 – 21.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T.Maniatis. 1989. **Molecular cloning** : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Tajima, T., S. Noguchi, W. Tanoue, H. Negishi, T. Nakakawaji and T. Ohno. 2002. **Background Selection Using DNA Markers in Backcross Breeding Program for Potato Virus Y Resistance of Tobacco**. Breeding Science. 52: 253 – 257.

White, M.J.D. 1973. **The chromosome**. Northumberland Press Limited, Gateshead. 214 p.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การสกัดดีเอ็นเอ

1. เติม liquid nitrogen ลงไปในโกร่งเพื่อช่วยให้โกร่งเย็นทั่วถึงกัน จากนั้นเด็ดใบใส่ลงไปประมาณ 100-300 กรัม

2. บดตัวอย่างให้เป็นผงละเอียดมากที่สุด ค่อยๆ ทยอยเติม liquid nitrogen เมื่อตัวอย่างถูกบดละเอียดดีแล้ว ตักตัวอย่างประมาณ 50-100 มิลลิกรัมใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml. ซึ่งมี CTAB buffer อยู่ 700 µl (ต้องนำ CTAB buffer มาแช่ใน water bath 65 °C ก่อนนำไปใช้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง)

3. นำหลอดที่ใส่ตัวอย่างมาเขย่าให้ตัวอย่างผสมเข้ากันได้ดีโดยใช้ vortex จากนั้นนำไปบ่มที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมงโดยทำการพลิกกลับหลอดทุก 15 นาที

4. เมื่อครบเวลานำหลอดออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เย็นลงประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงเริ่มสกัดโดยเติม Phenol : chloroform : isoamyl alcohol 700 µl พลิกกลับหลอดเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

5. นำหลอดมาทำการปั่นเพื่อให้แยกชั้น ใช้ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 3 นาทีหลังจากปั่นแล้วสารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น ดีเอ็นเอที่เราต้องการจะอยู่ในชั้นบน ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 600 µl ใส่ในหลอดใหม่ (ในการดูดเก็บสารละลายในชั้นบนไม่ควรดูดเก็บมาหมดให้เหลือไว้ประมาณ 100 µl เพราะดีเอ็นเอในส่วนนี้จะมีโปรตีนปนอยู่มาก หากติดมากับดีเอ็นเอมากจะทำได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำ) เนื่องจากกระเจี๊ยบจะมีเมือกมากเวลาดูดเก็บทำได้ยาก การตัดปลาย tip ให้กว้างจะช่วยให้ดูดได้ง่ายขึ้น

6. ทำการสกัดอีกรอบ โดยการเติม Chloroform : Isoamylalcohol (24:1) 600 µl พลิกหลอดกลับไป-มาให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm นาน 3 นาที

7. ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 500 µl ใส่หลอดใหม่ จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง (รวมทั้งหมด 3 รอบ จำนวนรอบที่จะใช้ในการสกัดอาจขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและหากต้องการให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นก็สามารถเพิ่มรอบในการสกัดได้ แต่ก็จะมีการสูญเสียดีเอ็นเอไปในแต่ละรอบของการสกัด)

8. ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 400 µl ใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 7.5 M sodium acetate 120 µl (0.3 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด) และ 80% ethanol 800 µl (2 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้ง หมด) พลิกหลอดกลับไป-มา เบาๆ หากปริมาณดีเอ็นเอมีมากพอในขั้นตอนนี้จะเห็นเส้นใสๆคล้ายวุ้น

9. นำหลอดที่ตกตะกอนไปแช่ที่ –20 °C 1 ชั่วโมง

10. นำมาปั่นเพื่อเก็บดีเอ็นเอที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที (อาจเพิ่มเวลาในการปั่นให้นานขึ้นหากดีเอ็นเอมีปริมาณน้อย) หลังจากปั่นแล้วควรจะได้ตะกอนสีขาวนวล และสีจะเริ่มใสขึ้นเรื่อยๆตามจำนวนรอบของการปั่นล้าง ตะกอนที่ได้ไม่ควรจะมีสีเขียวหรือเหลืองปน และไม่ควรมีสีขาวขุ่นเหมือนแป้ง)

11. เทเอาสารละลายทิ้งเบาๆ ระวังอย่าให้ก้อนดีเอ็นเอที่ติดอยู่ก้นหลอดหลุดหายไป จากนั้นเคาะก้นหลอดเบาๆเพื่อให้ดีเอ็นเอหลุดออกมา

12. จากนั้นทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol แช่เย็น 1 ml. พลิกหลอดกลับไปมา 4-5 ครั้งนำไปปั่นที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นเทส่วนสารละลายทิ้ง ทำการปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอทั้งหมด 3 รอบ จนดีเอ็นเอมีสีใส หลังจากปั่นล้างรอบสุดท้ายให้ใช้ไปเปตดูดสารละลายทิ้งแทนการเท เพราะต้องการดูดเอา ethanol ออกให้มากที่สุด

13. ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งโดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที ไม่ควรให้นานมากเกินไปเพราะดีเอ็นเอที่แห้งมากจะละลายยาก

14. เติมTE buffer ประมาณ 50-100 µl ขึ้นอยู่กับขนาดตะกอนของดีเอ็นเอ จากนั้นละลายดีเอ็นเอ (resuspened) โดยใช้นิ้วตีเบาๆที่ข้างหลอด

15. เติม RNase 0.5 µl incubate ที่ 37 °C 3 ชั่วโมง

16. สกัดด้วย Chloroform อีก 2 รอบ เพื่อให้โปรตีนออกมากที่สุด

17. ตกตะกอนด้วย 0.3 เท่า ของ 7.5 M sodium acetate และ 2 เท่า 80% ethanol

18. dry ตะกอนให้แห้ง เติม TE pH 8.0

ตารางผนวก 1 ไพรเมอร์ชุด OPA 01-07 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	$5' \rightarrow 3'$
OPA-01	-CAGGCCCTTC-
OPA-02	-TGCCGAGCTG-
OPA-03	-AGTCAGCCAC-
OPA-04	-AATCGGGCTG-
OPA-05	-AGGGGTCTTG-
OPA-06	-GGTCCCTGAC-
OPA-07	-GAAACGGGTG-

ตารางผนวก 2 ไพรเมอร์ชุด OPB 01-10 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	$5' \rightarrow 3'$
OPB -01	-GTTTCGCTCC-
OPB -02	-TGATCCCTGG-
OPB -03	-CATCCCCCTG-
OPB -04	-GGACTGGAGT-
OPB -05	-TGCGCCCTTC-
OPB -06	-TGCTCTGCCC-
OPB -07	-GGTGACGCAG-
OPB -08	-GTCCACACGG-
OPB -09	-TGGGGGACTC-
OPB -10	-CTGCTGGGAC-

ตารางผนวก 3 ไพรเมอร์ชุด OPC 01-15 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	5′ → 3′
OPC -01	-TTCGAGCCAG
OPC -02	-GTGAGGCGTC-
OPC -03	-GGGGGTCTTT-
OPC -04	-CCGCATCTAC-
OPC -05	-GATGACCGCC-
OPC -06	-GAACGGACTC-
OPC -07	-GTCCCGACGA-
OPC -08	-TGGACCGGTG-
OPC -09	-CTCACCGTCC-
OPC -10	-TGTCTGGGTG-
OPC -11	-AAAGCTGCGG-
OPC -12	-TGTCATCCCC-
OPC -13	-AAGCCTCGTC-
OPC -14	-TGCGTGCTTG-
OPC -15	-GACGGATCAG-

ตารางผนวก 4 ไพรเมอร์ชุด OPG 01-20 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	$5' \rightarrow 3'$
OPG-01	-CTACGGAGGA-
OPG-02	-GGCACTGAGG-
OPG-03	-GAGCCCTCCA-
OPG-04	-AGCGTGTCTG-
OPG-05	-CTGAGACGGA-
OPG-06	-GTGCCTAACC-
OPG-07	-GAACCTGCGG-
OPG-08	-TCACGTCCAC-
OPG-09	-CTGACGTCAC-
OPG-10	-AGGGCCGTCT-
OPG-11	-TGCCCGTCGT-
OPG-12	-CAGCTCACGA-
OPG-13	-CTCTCCGCCA-
OPG-14	-GGATGAGACC-
OPG-15	-ACTGGGACTC-
OPG-16	-AGCGTCCTCC-
OPG-17	-ACGACCGACA-
OPG-18	-GGCTCATGTG-
OPG-19	-GTCAGGGCAA-
OPG-20	-TCTCCCTCAG-

ตารางผนวก 5 ไพรเมอร์ชุด OPN-01 OPO-09 และ OPO-11 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	$5' \rightarrow 3'$
OPN-01	-CTCACGTTGG-
OPO-09	-TCCCACGCAA-
OPO-11	-GCAAGGAGGT-