



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลฮ่อม (*Strobilanthes*)

ด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

STUDY ON GENETICS DIVERSITY OF STROBILANTHES

BY MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551

จำนวน 124,500 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวกมลพร ปานง่อม

ผู้ร่วมโครงการ นางสาวสุคนธ์ทิพย์ บุญวงศ์

นางสาวกุลชนา เกศสุวรรณ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

6 ตุลาคม 2553

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลอ่อม (*Strobilanthes*)

ด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

STUDY ON GENETICS DIVERSITY OF *STROBILANTHES*

BY MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

กมลพร ปานง่อม¹ สุคนธิพย์ บุญวงศ์¹ และกุลชนา เกศสุวรรณ²

KAMONPORN PANNGOM¹, SUKHONTHIP BUNWONG¹ and KULCHANA KESSUWAN²

¹ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ต. แม่ทราย อ. ร้องกวาง จ. แพร่ 54140

² ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ต. แม่คำมี อ. เมือง จ. แพร่ 54000

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของพืชสกุลอ่อมที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย พบว่า สัณฐานวิทยาของพืชสกุลอ่อมโดยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรงสูงประมาณ 50 - 100 เซนติเมตร เป็นใบเดี่ยวเรียงตรงกันข้าม มีรูปร่างรี ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ดอกออกเป็นช่อที่ ช่อใบมีดอกย่อยหลายดอกสีดอกมีทั้งสีขาว สีม่วงและสีขาวแกมม่วง และเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอฟพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 13 เส้น เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับ ดีเอ็นเอพืชสกุลอ่อมจำนวน 12 ตัวอย่าง คือ *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH, *S. cusia* HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6* HCM, *S. sp.8* KLP และ *S. sp.9* PCM พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น คือไพรเมอร์ KPA-03, KPB-11, KPB-12, KPJ-12, KPJ-13, KPW-03 และ KPW-09 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ พืชสกุลอ่อมได้จำนวนขึ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 12-15 ขึ้น รวมทั้งหมด 131 ขึ้นเฉลี่ย 18.71 ขึ้น/ไพรเมอร์ และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของขึ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500-10000 คู่เบส และแต่ละไพรเมอร์ ให้แบบแผนของขึ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืชสกุลอ่อม จากการวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group with Arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในการสร้างเดนไดรแกรม แบ่งพืชสกุลอ่อม ออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH และ *S. cusia* HPH เป็นพืชชนิดเดียวกันและมีพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน และกลุ่มนี้ยังประกอบด้วยอ่อมชนิด *S. sp.2* BCM และ *S. sp.8* KLP กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยชนิด *S. sp.1* BCM, *S. sp.3* BCM และ *S. sp.6*, กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยชนิด *S. sp.4* KLP และ *S. sp.5* HCM และ กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 1 ชนิด คือ *S. sp.9* PCM

ABSTRACT

Study on morphology of genus *Strobilanthes* that founded in northern part of Thailand. The morphology of *Strobilanthes* were a shrub, erect stem, stem length from 50 -100 centimeters, single leaf which ovate sharp and opposite arrangement, irregular of leaf edge. The flower of *Strobilanthes* species was inflorescent and the colors of flower were white, purple and white blend with purple. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was analyzed of genus *Strobilanthes* 12 samples; *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH, *S. cusia* HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6* HCM, *S. sp.8* KLP และ *S. sp.9* PCM. Using of 13 random primers for indicated diversity and variation of genetics level. Seven RAPD primers generated from 12 to 25 DNA fragments, total 131 DNA fragments from DNA of the *Strobilanthes* species giving an average of 18.71 DNA fragments per primer. The DNA fingerprinting was molecular weight from 500 to 10000 base pairs and was different in specie of genus *Strobilanthes*. Genetic relationship using value of genetic similarity and grouping of species of genus *Strobilanthes* using Unweighted Pair Group with Arithmetic mean (UPGMA) were analyzed. Four distinct groups were identified; group 1 containing six species, *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH, *S. cusia* HPH, *S. sp.2* BCM and *S. sp.8* KLP, group 2 having four species, *S. sp.1* BCM, *S. sp.3* BCM and *S. sp.6* HCM, group 3 having species *S. sp.4* KLP and *S. sp.5* HCM and the last group containing only *S. sp.9* PCM.

กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2551 จนทำให้งานวิจัยนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอขอบคุณฝ่ายวิจัยและสำนักงานวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร ที่ได้ช่วยประสานงาน และดูแลในเรื่องการเบิกจ่ายเงินวิจัยในการทำวิจัยแต่ละงวด สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้- แพร์ เจลิมพระเกียรติ และศูนย์วิจัยข้าวแพร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ครุภัณฑ์ และวัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ สำหรับในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร์ เจลิมพระเกียรติที่ให้ความช่วยเหลือในช่วงของการทำวิจัย

ขอขอบคุณนายกิตติกร สอนนวล นางสาวจริยาภรณ์ ดาสันทัต และนางสาวพัชรภรณ์ โกสุโท นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ช่วยเหลือในการเตรียมสารและอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ และทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

6 ตุลาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	i
Abstract.....	ii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา.....	3
1.5 นิยามศัพท์.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการกระจายพันธุ์ของฮ่อม.....	5
2.2 ประโยชน์ของพืชสกุล.....	6
2.3 จำนวนโครโมโซมของพืชสกุลฮ่อม.....	7
2.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคชีววิทยา ระดับโมเลกุล.....	7
2.5 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์พันธุกรรมของพืช.....	11
2.6 การแยกขนาดของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิส.....	13
2.7 เทคนิคอาร์เอฟดีดีกับการนำไปใช้.....	16
2.8 การสร้างสายวิวัฒนาการแบบต้นไม้.....	20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	24
3.1 ครุภัณฑ์และสารเคมี.....	24
3.2 การเก็บตัวอย่างพืชสกุลฮ่อม.....	25
3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชสกุลฮ่อม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป.....	25
3.4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี.....	26
3.5 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาอาร์เอฟดีด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิส.....	28
3.6 การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	28
3.7 สถานที่ทำการทดลอง.....	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8 ระยะเวลาทำการวิจัยและแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย.....	29
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	30
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลฮ่อม.....	30
4.2 การสกัดดีเอ็นเอพืชสกุลฮ่อม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป.....	34
4.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี.....	34
4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลฮ่อม.....	52
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	53
5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลฮ่อม.....	53
5.2 การสกัดดีเอ็นเอพืชสกุลฮ่อม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป.....	53
5.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี.....	54
5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลฮ่อม.....	55
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	57
6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลฮ่อม.....	57
6.2 การสกัดดีเอ็นเอพืชสกุลฮ่อม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป.....	57
6.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี.....	57
6.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลฮ่อม.....	58
6.5 ข้อเสนอแนะ.....	58
บรรณานุกรม.....	59
ภาคผนวก.....	64
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....	65
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์.....	66

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้อะกาโรสเจลที่มีปริมาณ อะกาโรสเจลต่างๆ กัน.....	15
ตารางที่ 3.1 ชนิดและสถานที่ในการเก็บตัวอย่างพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง.....	25
ตารางที่ 3.2 ไพรมเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์ที่นำมาตรวจสอบ.....	27
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบและความเข้มข้นหรือปริมาณสารสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยา อาร์เอพีดี.....	27
ตารางที่ 4.1 จำนวนไพรมเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง.....	35
ตารางที่ 4.2 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตามภาพที่ 4.3.....	37
ตารางที่ 4.3 การแปลงชิ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.2 เป็นตัวเลข 0 และ 1.....	37
ตารางที่ 4.4 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตามภาพที่ 4.4.....	39
ตารางที่ 4.5 การแปลงชิ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.4 เป็นตัวเลข 0 และ 1.....	39
ตารางที่ 4.6 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตามภาพที่ 4.5.....	41
ตารางที่ 4.7 การแปลงชิ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.6 เป็นตัวเลข 0 และ 1.....	42
ตารางที่ 4.8 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตามภาพที่ 4.6.....	44
ตารางที่ 4.9 การแปลงชิ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.8 เป็นตัวเลข 0 และ 1.....	44
ตารางที่ 4.10 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตามภาพที่ 4.7.....	46
ตารางที่ 4.11 การแปลงชิ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.10 เป็นตัวเลข 0 และ 1.....	47
ตารางที่ 4.12 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตามภาพที่ 4.8.....	49
ตารางที่ 4.13 การแปลงชิ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.12 เป็นตัวเลข 0 และ 1.....	49
ตารางที่ 4.14 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตามภาพที่ 4.9.....	51
ตารางที่ 4.15 การแปลงชิ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.14 เป็นตัวเลข 0 และ 1.....	51

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงส่วนประกอบของแผนภูมิกิ่งไม้.....	21
ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงลักษณะของ phylogenetic tree A = Unrooted tree B = Rooted tree ..	22
ภาพที่ 4.1 ลักษณะของพืชสกุลห้อมชนิดต่างๆ	33
ภาพที่ 4.2 ดีเอ็นเอที่สกัดจากพืชสกุลห้อมเมื่อตรวจสอบผลด้วย 1.5% (w/v) agarose gel และ ย้อมด้วยสารละลาย ethidium-bromide	34
ภาพที่ 4.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPA-03 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide.....	36
ภาพที่ 4.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPB-11 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide.....	38
ภาพที่ 4.5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPB-12 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide.....	40
ภาพที่ 4.6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPJ-12 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide.....	43
ภาพที่ 4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPJ-13 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide.....	45
ภาพที่ 4.8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPW-03 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide.....	48
ภาพที่ 4.9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลห้อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPW-09 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide.....	50
ภาพที่ 4.10 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลห้อม 12 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYpc version2.10X.....	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหา

ฮ่อมเป็นพืชในสกุล (genus) *Strobilanthes* วงศ์ (Family) Acanthaceae โดยพืชในสกุลฮ่อมมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น คราม คามหลอย (แม่ฮ่องสอน) ฮ่อม (เหนือ) ฮ่อมเมือง (น่าน) ครามแงะ (ปัตตานี) จ้าฮ่อม (ลำปาง) เต็ม สิมิตินันท์ (2544) รายงานว่าพืชในสกุลฮ่อมที่พบในประเทศไทยมีจำนวนทั้งหมด 9 ชนิด แต่ละชนิดพบกระจายอยู่ทั่วไปในแต่ละภาคของประเทศไทย ส่วนในเขตภาคเหนือของประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่ได้รับรายงานว่ามีความหลากหลายชนิดของพืชสกุลฮ่อมมากที่สุด โดยพบทั้งหมดจำนวน 5 ชนิด คือ *Strobilanthes apica*, *S. auriculata*, *S. cusia*, *S. siamensis* และ *S. suborbicularis* เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ในภาคอื่นๆ ของประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบจำนวน 3 ชนิด คือ *S. cystolithigera*, *S. apica* และ *S. nivea* ส่วนภาคกลางพบจำนวน 1 ชนิด คือ *S. dyeriana* และภาคใต้พบจำนวน 1 ชนิด คือ *S. bibracteata* โดยฮ่อมแต่ละชนิดที่พบนั้นจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันไป ปัจจุบันยังมีบางคนเข้าใจผิดว่าฮ่อมกับคราม (*Indigofera tinctoria* L.) ซึ่งให้สีครามหรือสีน้ำเงินหรือสีอินดิโกที่เหมือนกันเป็นพืชชนิดเดียวกัน แต่ความจริงแล้วฮ่อมกับครามเป็นพืชคนละชนิด โดยฮ่อมเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ส่วนครามเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae เนื่องจากว่าฮ่อมเป็นพืชให้สารสีครามหรือสีน้ำเงินจึงนิยมนำมาใช้ในการย้อมผ้า และผ้าที่ได้จากการย้อมจากต้นฮ่อม เรียกว่าผ้าหม้อฮ่อม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของประชาชนชาวตำบล พุ่งไธสง อำเภอ เมือง จังหวัดแพร่ ที่สร้างรายได้และอาชีพให้กับประชาชนชาวจังหวัดแพร่เป็นอย่างมาก เนื่องจากผ้าหม้อฮ่อมมีลักษณะเป็นสีน้ำเงินซึ่งมีความคล้ายคลึงกับผ้ายีนส์ในแถบยุโรป จึงมีบุคคลบางกลุ่มเรียกผ้าหม้อฮ่อมว่าเป็นยีนส์ตะวันออก (Jeans of the East) ซึ่งในอนาคตอันใกล้ผ้าหม้อฮ่อมควรจะได้รับการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญในระดับประเทศ นอกจากคุณสมบัติที่ใช้ในการย้อมผ้าแล้วฮ่อมยังมีสารเคมีบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบมีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยา Ismail et al. (2000) รายงานว่าสารสกัดจากฮ่อมบางชนิดมีสารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากกรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid) และยังมีองค์ประกอบของสารที่อยู่ในกลุ่ม 2-quinazolinone alkaloids (4(3H)-quinazolinone และ 2,4 (1H,3H)-quinazolinone ที่สามารถยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง (Li et al., 1993) การติดเชื้อของแบคทีเรีย และเชื้อไวรัส influenza ได้ (Liau et al., 2006)

จากคุณสมบัติดังกล่าวที่พบในพืชสกุลฮ่อม จึงเป็นสิ่งสำคัญที่น่าสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลเบื้องต้นของความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมที่พบในภาคเหนือของประเทศไทยนั้นว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอเป็นอย่างไร ปัจจุบันนี้การประยุกต์เอาข้อมูลจากการศึกษาทางด้านเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลมาใช้ในการบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชนั้นเป็นที่นิยมมากขึ้น เนื่องจากว่าข้อมูลที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชได้อย่างชัดเจน (Archak, 2000) มากกว่าการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ในอดีตการจัดจำแนกพืชสกุลฮ่อมส่วนใหญ่ใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับจำนวนของโครโมโซม โดย Carine and Scotland (2002) ใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกพืชในวงศ์ Acanthaceae ซึ่งมีพืชสกุลฮ่อมรวมอยู่ในกลุ่มออกเป็นสกุลต่างๆ พบว่าการแบ่งพืชออกเป็นแต่ละสกุลนั้นทำได้ยาก เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความผันแปรไปในสภาพแวดล้อมที่พืชอาศัยอยู่ และมีรายงานการใช้เทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ในการจำแนกพืชที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae จำนวน 3 สกุล คือ *Justicia*, *Siphonoglossa* และ *Phaulopsis* พบว่าพืชทั้ง 3 สกุล มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n=14$ ถึง $2n=64$ ต่อมา Xie et al. (2005) ประสบความสำเร็จในการใช้ส่วนประกอบของสารเคมีในกลุ่ม alkaloids แยกพืชสกุลฮ่อมชนิด *S. cusia* ออกจากฮ่อมชนิดอื่นๆ ได้ ส่วนการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ในระดับดีเอ็นเอ McDade and Moody (1999) และ Moylan et al. (2004) ระบุว่าลำดับเบสในส่วนของ intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ สามารถบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Acanthaceae ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชสกุล *Justicia* ซึ่งเป็นสกุลที่ใกล้เคียงกับพืชสกุลฮ่อม พบว่าสามารถระบุความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของพืชสกุล *Justicia* ได้ (Meister et al., 2005)

ที่ผ่านมายังไม่มีรายงานการใช้เทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD) เอเอฟแอลพี (Amplified Polymorphic Length Polymorphism: AFLP) สร้างและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ของพืชสกุลฮ่อมที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย เพื่อบ่งชี้ว่าพืชสกุลฮ่อมมีความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอเป็นอย่างไร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การวิจัยขั้นสูงทางด้านต่างๆ เช่น ศึกษาสารเคมีต่างๆ หลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางยาที่ใช้ในทางการแพทย์ และสารเคมีสีน้ำเงินที่ใช้ในการย้อมผ้าหม้อฮ่อม เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะใช้เทคนิคทาง

ชีววิทยาระดับโมเลกุลวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย
- 1.2.2 เพื่อระบุความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
- 1.2.3 เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทยจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
- 1.2.4 เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือ ของประเทศไทย และนำข้อมูลดังกล่าวมาเป็นแนวทางในการวิจัยในระดับสูงต่อไป

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย
- 1.3.2 ทำให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย
- 1.3.3 ทำให้ทราบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลส้มที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย
- 1.3.4 เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม ซึ่งมีมหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ และศูนย์วิจัยข้าวแพร่ สามารถนำข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวไปใช้ประกอบในการทำวิจัยขั้นสูงต่อไป เช่น ศึกษาพันธุกรรมเกี่ยวกับการสร้างสารสารเคมีที่สำคัญชนิดต่างๆ ที่พบในพืชสกุลส้ม

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

สำรวจและเก็บรวบรวมพืชสกุลส้มชนิดต่างๆ ในพื้นที่บางจังหวัดในเขตภาคเหนือของประเทศไทย และนำมาปลูกในเรือนเพาะชำของมหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล ณ ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ และนำข้อมูลที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ในการระบุความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรม พร้อมบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลส้ม

1.5 นิยามคำศัพท์

1.5.1 *Strobilanthes* sp. หมายถึง ไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 50-80 เซนติเมตร ลำต้นเป็นข้อปล้องคล้ายขาคี แต่กกิ่งก้านตามข้อ ลำต้นกลม ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม หักใบเรียบทำใบแหลมขอบใบหยัก ใบด้านบนสีเขียวมัน ใบแก่หรืออ่อนเมื่อถูกกดหรือทุบทิ้งไว้กลายเป็นสีดำ ดอกเป็นช่อออกตามซอกใบและกิ่ง รูปทรงคล้ายระฆัง ดอกสีม่วง เมล็ดอ่อนสีเขียว เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาล แตกง่าย (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 20 สิงหาคม 2552)

1.5.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์ที่อาศัยหลักการของวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างสุ่มเพียงเส้นเดียว หรือสองเส้นก็ได้ สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน ต้นทุนในการทำ ไม่สูงนัก ใช้ชิ้นส่วนของพืชเพียงเล็กน้อย ไม่ต้องการ probe ที่เฉพาะเจาะจงสามารถแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูง ดำเนินการได้ทั้งจีโนมของพืชและสภาพแวดล้อมไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Yu et al, 1993)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการกระจายพันธุ์ของฮ่อม

เป็นพืชสกุล *Strobilanthes* วงศ์ *Acanthaceae* เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นกลมและตั้งตรงสูงได้ถึง 1 เมตร บริเวณข้อโป่งพอง เหน้าเป็นรูปทรงกระบอก ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงกันข้ามรูปวงรี กว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาว 5-14 เซนติเมตร ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยละเอียด มีเส้นแขนงใบ 5-9 คู่ ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบ เวลาบานโคนดอกเป็นหลอดยาว ปลายบานมี 5 กลีบ โคนกลีบเชื่อมติดกัน ปลายกลีบเว้า รูปทรงคล้ายระฆัง ดอกมีหลายสีขึ้นกับแต่ละชนิด อาทิ สีม่วง สีน้ำตาล สีขาว หรือชมพู ลำต้นสูงประมาณ 50-100 เซนติเมตร ขยายพันธุ์โดยเมล็ดและส่วนลำต้นนำมาปักชำไว้รากจะงอกบริเวณข้อ เจริญเติบโตได้ดีในป่าชื้น ใกล้เคียงน้ำ ลำธาร ต้องการร่มเงามาก ไม่ชอบแสงแดดจัด ส่วนมากจะพบตามเขตป่าอนุรักษ์ที่มีต้นไม้ใหญ่ร่มครึ้ม ใบฮ่อมสามารถเก็บมาใช้ทำสีน้ำเงินได้ต่อเนื่องเมื่อเข้าปีที่ 2 ระยะของการเก็บไม่จำกัดแล้วแต่จะออกแขนงช้าหรือเร็ว ถ้าฮ่อมต้นใหญ่ มีมากจะตัดทั้งกิ่งและใบมาใช้ ถ้าต้นเล็กใช้ใบเป็นหลัก ต้นฮ่อมจะมีอายุ 8-9 ปี (วุฒิไกร, 28 สิงหาคม 2552) และลำดับของการจัดจำแนกพืชสกุลฮ่อมโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาตามหลักอนุกรมวิธาน เป็นดังนี้



พืชสกุลฮ่อมมีกระจายพันธุ์ในแถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่ทางตะวันออกเฉียงของประเทศอินเดีย พม่า ไทย ไปจนถึงทางตอนใต้ของประเทศจีน (Xie et al., 2005) โดยทั่วไปแล้วพืชสกุลนี้จะพบได้ทั่วไปในพื้นที่ชุ่มชื้นในป่าดงดิบทางภาคเหนือของประเทศไทย ออกดอกในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์

2.2 ประโยชน์ของพืชสกุลส้ม

2.2.1 ประโยชน์ในการรักษาโรค

สรรพคุณทางยา ทางคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รวบรวมข้อมูลไว้ว่า ต้นส้มในยาพื้นบ้านล้านนาใช้ ใบ ต้มน้ำดื่ม แก้ไข้ ปวดศีรษะเนื่องจากหวัด เจ็บคอ หลอดลมอักเสบ ต่อมนทอนซิลอักเสบ ตาอักเสบ ส้มถือเป็นยาเย็นนำมาใช้ในการลดไข้ โดยนำต้นสดๆ มาทุบพอกกระหม่อมเด็ก หรือผู้ใหญ่จะช่วยลดไข้ได้ดี แต่ถ้าหาต้นสดไม่ได้ ใช้ผ้าที่ย้อมด้วยส้ม ที่เป็นการย้อมจากสีธรรมชาติจริงๆ ไม่ใช่สารเคมี ผ้าหม้อส้มธรรมชาติสามารถนำมาชุบน้ำวางที่กระหม่อมช่วยลดไข้ได้ดีกว่า ใช้ผ้าธรรมดาชุบน้ำ และใช้ผ้าหม้อส้มชุบน้ำประคบลดการเจ็บปวดจากแมลงสัตว์กัดต่อยได้ ภูมิความรู้โบราณ ซึ่งเข้ากับกระแสนิยมสตรียูโฟหลังคลอด คือ หมอเมืองหรือหมอพื้นบ้านล้านนาจะนำผ้าย้อมส้มมาใช้ในการทับหม้อเกลือ ในการดูแลหญิงหลังคลอด เพื่อให้มดลูกเข้าอู่ไวขึ้น หมอยาพื้นบ้านภาคเหนือและอีสาน จะนำเพื่อผ้าย้อมด้วยส้มมาห่อลูกประคบ เพราะตัวยาจะช่วยให้กล้ามเนื้อส่วนต่างๆ กระชับยิ่งขึ้น (กระทรวงวิทย์, 2549)

2.2.2 ประโยชน์ในการย้อมสีผ้า

การย้อมสีครามธรรมชาติ นั้นพบว่าการย้อมได้จากพืชหลายชนิด แต่ที่พบในประเทศไทยนั้นมีอยู่สองชนิดคือ ส้ม และ คราม ซึ่งกรรมวิธีในการย้อมจะคล้ายคลึงกัน คือการนำส่วนของพืชมาหมักแช่น้ำให้เน่าเปื่อยแล้วแยกเอาส่วนของเนื้อสีออกมาโดยการตกตะกอนด้วยปูนขาว และอากาศ ปล่อยให้ตะกอนนอนกันแล้วจึงแยกส่วนที่เป็นน้ำออก จะได้เนื้อครามเป็นตะกอนชั้นเหนียวเหมือนโคลน เนื้อครามที่ได้สามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นปี โดยเก็บไว้ในหม้อดินที่มีน้ำค้างหล่อเลี้ยงไม่ให้เนื้อครามแห้ง น้ำค้างที่กล่าวถึงคือน้ำล้างขี้เถ้าของพืชเช่น ต้นกล้วย มะละกอ มะขาม เปลือกผลุ่นเป็นต้น

การย้อมผ้าครามที่เรียกกันว่า “การย้อมคราม” หรือ “หม้อส้ม” จะนำเนื้อครามที่ได้จากการหมัก มาทำการย้อมด้วยสภาวะที่เป็นด่าง โดยการผสมกับส่วนประกอบต่างๆ มากมายตามสูตรหรือวิธีการของแต่ละท้องถิ่น เช่น น้ำด่าง ปูนขาว ขมิ้น เหล้าป่า ผักส้มป่อย ต้นอ้อย กล้วย ใบฝรั่ง แล้วกว่นหรือโจกให้โดนอากาศแล้วทิ้งไว้จนส่วนผสมต่างๆ ทำให้น้ำครามเปลี่ยนจากสีคราม น้ำเงินกลายเป็นสีเหลืองอมเขียว จึงนำผ้าหรือด้ายที่ทำความสะอาดแล้วชุบน้ำพอหมาด ลงย้อมให้น้ำครามเข้าเกาะเส้นใย แล้วจึงนำขึ้นกระตุกให้โดนอากาศ ผ้าหรือฝ้ายจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีเหลืองของน้ำหม้อครามเป็นสีน้ำเงิน นำไปผึ่งให้แห้ง ถ้าต้องการให้สีครามเข้มก็ทำการย้อมหลายๆ ครั้ง หรือย้อมทับด้วยสีธรรมชาติอื่นๆ ก็ได้สีแตกต่างกันไป ตามชนิดของสีที่ใช้ผสม ขึ้นอยู่กับเทคนิควิธีการของผู้ย้อมแต่ละคน สีคราม นั้นเคยได้ชื่อว่าเป็น “ราชาแห่งสี” เพราะไม่มีสีชนิดใดที่มี

ความสัมพันธ์กับขนบธรรมเนียมและประเพณีเพียบเท่าศีลธรรม สิ้นน้ำเงินเข้ม หรือศีลธรรมเป็นที่นิยม โดยทั่วไป ประวัติการใช้ศีลธรรมจากพืชมีมานานับพันปี อย่างไรก็ตามการย้อมสีครามจากธรรมชาติ เกือบจะหมดสิ้นจากสังคมเมื่อมีการใช้และผลิตสีสังเคราะห์ แต่ยังมีกลุ่มคนที่ยังรักและหวงแหน ภูมิรู้ มรดกของท้องถิ่นจึงยังคงยึดถือและสืบทอดการย้อมสีครามธรรมชาติอยู่อย่างเงียบๆ ใน ท้องถิ่นชนบท (กระทรวงวิทย์, 2549)

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการตื่นตัวในเรื่องปัญหามลภาวะจากอุตสาหกรรมการผลิตสีสังเคราะห์และผลกระทบของสีสังเคราะห์ต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค จึงก่อให้เกิดความสนใจที่จะรื้อฟื้นวิถีการผลิตจากธรรมชาติจริงๆ โดยเชื่อมสัมพันธ์กับขนบธรรมเนียมประเพณีท้องถิ่น ขณะที่ช่างทอผ้าสืบทอดและรักการย้อมสีครามธรรมชาติยังคง รักษา พัฒนา และนำภูมิรู้ของบรรพบุรุษ มาปรับใช้ในวิถีการผลิตของตนซึ่งไปประจวบเหมาะกับการบริโภคที่หวงกลับสู่ธรรมชาติ (กระทรวงวิทย์, 2549)

2.3 จำนวนโครโมโซมของพืชสกุลย้อม

จำนวนโครโมโซมของพืชสกุลย้อมแต่ละชนิดที่พบในประเทศไทยยังไม่มีรายงานที่แน่ชัด แต่มีรายงานในต่างประเทศที่มีการศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชในสกุลที่ใกล้เคียง และอยู่ในวงศ์ Acanthaceae เหมือนกัน Allan (1983) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชสกุล *Siphonoglossa* พบว่าพืชในสกุล *Siphonoglossa* มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n=22$ และ $2n=28$ Mikael Bo Christer (1989) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชสกุล *Justicia* กลุ่ม (section) *Hamieria* ในแถบแอฟริกา จำนวน 11 ชนิด พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n=26$ Ensermu (1990) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชสกุล *Justicia* กลุ่ม *Ansellia* จำนวน 8 ชนิด พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n=14$ Mariette (1996) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชในสกุล *Phaulopsis* จำนวน 13 ชนิด พบว่าพืชในสกุล *Phaulopsis* มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n=32$ ถึง $2n=64$

2.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอจากการลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชโดยตรงมีส่วนได้เปรียบกว่าการศึกษาทางสัณฐานวิทยา เพราะดีเอ็นเอของพืชจะมีความคงตัว และไม่มี ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ประกอบกับสามารถตรวจสอบได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ เกิดจากการกลายพันธุ์ของเบสในสายนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้เกิดลักษณะที่มีความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาความแปรปรวน

หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2545) สำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้ม เพื่อใช้ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลมีหลายเทคนิคด้วยกันดังนี้

2.4.1 เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียในรูปของดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็มีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองหรือเหตุอื่น การเปลี่ยนแปลงไม่ได้มีเพียงการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวเท่านั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงถึงระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ในส่วนของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement หรือ inversion) หรือมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จนสามารถกล่าวได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดไม่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอเหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ ความหลากหลายดังกล่าวนี้สามารถตรวจพบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2545)

2.4.2 การวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิค PCR-RFLP

Meister et al. (2005) วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพืช *Justicia areysiana* (Acanthaceae) ซึ่งเป็นสกุลที่ใกล้เคียงกับพืชสกุลส้มด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) และเทคนิค Microsatellite พบว่าพืช *J. areysiana* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำภายในประชากรที่เป็นชนิดเดียวกัน แต่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงระหว่างประชากรที่ต่างชนิดกัน

2.4.3 การวิเคราะห์พันธุกรรมพืชด้วยเทคนิค RAPD

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (เทคนิคที่มีพื้นฐานมาจากเทคนิค PCR) Williams et al. (1990) ได้พัฒนาเทคนิคใหม่เรียกว่า RAPD-PCR ซึ่งเทคนิคนี้มีพื้นฐานมา

จากเทคนิค PCR ข้อแตกต่างกันคือ เทคนิค RAPD-PCR นี้จะใช้ไพรเมอร์เพียง 1 ไพรเมอร์ (single primer) ที่มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 10 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น ซึ่ง Random amplified polymorphic DNA (RAPD) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า Rapid RAPD markers เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ที่แตกต่างกันด้วยวิธี PCR จาก primer ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ amplified DNA fragments นั้นไม่จำเพาะว่ามาจากบริเวณใด polymorphisms ระหว่าง individuals เป็นผลมาจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ primer เข้าไปจับ RAPD marker เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ตรวจสอบผลได้ด้วย agarose gel

ในการจำแนกพันธุ์กรรมพืชเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ ตลอดจนการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชที่ตรงตาม พันธุ์ นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถใช้ศึกษาการกระจายตัวทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ที่เก็บมาใหม่ การเปลี่ยนแปลงทาง พันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ทั้งก่อนและหลังการขยายพันธุ์วิธีนี้สามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน ต้นทุนในการทำ ไม่สูงนัก ใช้ชิ้นส่วนของพืชเพียงเล็กน้อย ไม่ต้องการดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probe) ที่เฉพาะเจาะจงจะสามารถแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูง ดำเนินการได้ทั้งจีโนมของพืชและสภาพแวดล้อมไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (เอกพล ขำชื่น, 2551)

2.4.4 การวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิค AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ที่คิดค้นโดย Vos และคณะ (1995) เป็นเทคนิคที่รวมเอาจุดเด่นของ RFLP กับ RAPD เข้าด้วยกัน โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำต่างกัน แล้วเชื่อมต่อ adapter (เป็นชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบลำดับเบส) เข้ากับปลายทั้งสองด้านของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อเป็นส่วนให้ primer มาเกาะได้ที่ปลายทั้งสองด้าน และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดย primer ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจะมีลำดับเบสเหมือนกับส่วนของ adapter ที่เชื่อมต่อนำที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอ ส่วนปลาย 3' ของ primer มีลำดับเบสที่เป็นส่วนตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ และเพิ่มเบสอีก 2-3 เบส เข้าที่ปลาย 3' ของ primer นี้ เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ดังนั้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จะมีเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ติดกับบริเวณจดจำของเอนไซม์เข้าคู่ได้กับ primer ที่เลือกใช้นั้น จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโตโฟเรซิส Gimenes *et al.* (2002) ใช้เทคนิคเอฟแอลพีประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วลิสงจำนวน 7 กลุ่ม ประกอบด้วย *Arachis*, *Erectoides*, *Procumbensae*, *Caulorhizae*, *Heteranthae*, *Rhizomatosaes* และ *Extranervosae* จำนวน 20 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ คือ *EcoRI* ACT/MseI CTT, *EcoRI*

AGC/MseI CTG, EcoRI ACC/MseI CTG พบว่าไพรเมอร์แต่ละคู่ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ถั่วลิสงแตกต่างกันคือ 108, 131 และ 169 ชิ้น ตามลำดับ รวมทั้งหมด 408 ชิ้น เฉลี่ย 136 ชิ้น/คู่ไพรเมอร์ เมื่อนำข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วลิสงทั้ง 7 กลุ่ม 20 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) เพื่อจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน ทำให้แบ่งกลุ่มถั่วลิสงออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยถั่วลิสงกลุ่ม *Arachis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยถั่วลิสงกลุ่ม *Erectoides*, *Procumbensae*, *Caulorhizae*, *Heteranthae* และ *Rhizomatosae* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยถั่วลิสงกลุ่ม *Extranervosae* นอกจากนี้เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพที่จะใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในอ้อย สำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในและระหว่างชนิดของพืชภายในสกุลเดียวกันได้ (Cunningham, et al, 2000)

2.4.5 การวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิค Microsatellites

Microsatellites หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) จัดเป็นเทคนิคในการระบุตำแหน่งดีเอ็นเอ (DNA markers) เพื่อใช้ในการทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) และศึกษาประชากรที่มีต้นพืชอยู่เป็นจำนวนมาก โดยสามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ได้ดี ทั้งที่เป็นต้นพืชภายในประชากร หรือพันธุ์พืชที่มีความสัมพันธ์กันอย่างมาก โดยเฉพาะความสามารถในการแสดงความหลากหลายของพันธุกรรมในระดับอัลลีล (high allelic diversity) ที่สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ เนื่องจาก SSR จัดเป็นตัวระบุตำแหน่งประเภท co-dominant ที่ซึ่งตรงกับความต้องการของแผนการปรับปรุงพันธุ์พืชและพันธุศาสตร์ประชากร โดยระบบนี้จะให้รูปแบบของ DNA ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะอ้อยแต่ละพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การใช้เพียง microsatellite เดียว จะไม่สามารถจำแนกต้นพืชได้อย่างเด่นชัดและสมบูรณ์ แต่การใช้ร่วมกันหลาย microsatellites จะสามารถสร้างกลุ่มของ fingerprints เดียวๆ ที่จำแนกพันธุ์พืชที่เฉพาะเจาะจงได้ (Cunningham, et al, 2000)

2.4.6 การวิเคราะห์พันธุกรรมในคลอโรพลาสต์ของพืช

Mcdade and Moody (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Acanthaceae จากลำดับเบสดีเอ็นเอส่วนของ intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* ที่สกัดจากคลอโรพลาสต์ พบว่าลำดับเบสในส่วน of intron และ spacer ของยีน *trnL-trnF* มีความคล้ายคลึงในประชากรที่เป็นสกุลเดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันในประชากรต่างสกุลกัน และยังบ่งชี้ว่าพืชสกุลต่างๆ ที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพืชในสกุล

Eritraria มากกว่าพืชสกุล *Thumbergia* และ *Mendoncia* ตามลำดับ และสามารถแบ่งกลุ่มของพืชวงศ์ Acanthaceae ออกเป็น 4 กลุ่มที่สำคัญ คือ *Acanthus*, *Barleria*, *Ruellia* และ *Justicia* ต่อมา Moylan et al. (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลฮ่อมจากลำดับเบสดีเอ็นเอของส่วน internal transcribed spacer nuclear DNA (ITS nrDNA) ที่แยกจากนิวเคลียส และ *trnL-trnF* ที่แยกจากคลอโรพลาสต์ พบว่าลำดับเบสดีเอ็นเอ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์แยกเผ่าย่อย Strobilantheae ออกเป็นหนึ่งกลุ่มใหญ่ และไม่สามารถแยกเผ่าย่อย Strobilantheae ออกเป็นแต่ละสกุลได้ ในขณะที่ลำดับเบส ดีเอ็นเอของส่วน ITS nrDNA ที่แยกได้จากนิวเคลียสสามารถแยกเผ่าย่อย Strobilantheae ออกเป็น 3 สกุล คือ *Hemigraphis*, *Sericocalyx* และ *Strobilanthes*

2.5 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์พันธุกรรมของพืช

ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงใดช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอ (a section of DNA) ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (a wide range of taxa) นั้น เรียกว่า "universal primers" ซึ่งนิยมใช้กันมากในงานวิจัยด้าน molecular systematic โดยมีเหตุผลของการใช้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primers นี้ว่า สิ่งมีชีวิตที่ยังไม่เคยใช้เป็นสิ่งทดลองด้านอนุพันธุศาสตร์นั้น จะไม่ทราบว่าจะใช้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primers นี้ว่า สิ่งมีชีวิตที่ยังไม่เคยใช้เป็นสิ่งทดลองด้านอนุพันธุศาสตร์นั้น จะไม่ทราบว่าจะใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสใด จึงจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ universal primers และที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ ไพรเมอร์สำหรับ mitochondria (mt DNA) ของสัตว์, chloroplast DNA (cp DNA) และ nuclear ribosomal RNA genes (nr DNA) สิ่งที่ต้องพิจารณาในการออกแบบไพรเมอร์มีดังนี้

2.5.1 ความยาวของไพรเมอร์ (Primer Length)

ความยาวของไพรเมอร์มีความยาวตั้งแต่ 10 เบส (ใช้สำหรับ RAPD-PCR) ถึง 80 เบส โดยทั่วไปจะใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 18-24 เบส การใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดยาวนั้น จะต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้นในขั้นตอนการจับระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ รวมทั้งการใช้ไพรเมอร์ยาวและไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแล้ว ปัญหาที่เกิดขึ้น คือ จะเกิด non-specific primer products ในสารละลายไพรเมอร์ (primer mixture) ที่เตรียมได้ (ปรีชา ประเทพา, 2551)

2.5.2 นิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ (Nucleotide Composition)

ไพรเมอร์นั้นจะมีลำดับเบสใดๆ ก็ได้ แต่มีข้อพึงระวัง คือ พยายามอย่าให้ไพรเมอร์มีโอกาสเกิด self-priming อันมีสาเหตุมาจากมีลำดับเบสซ้ำๆ กัน ที่เรียกว่า internal repeats หรือ

selfsimilarity ตัวอย่างเช่น ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส AAATTTAATTT เมื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาจจะเกิดการ self-priming ที่มีการจับกันของเบส T และ A ระหว่างปลายทั้งสองด้าน และก่อให้เกิด primerdimer products (ปรีชา ประเทพ, 2551) เช่น การออกแบบไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณยีนกำหนดการสร้างโปรตีนโพรลามีนขนาด 10 กิโลดาลตัน ในข้าว (10 kDa prolamin gene) ขนาดของยีนนี้คือ 405 คู่เบส

Forward primer

ATGGCAGCATACACCAGCAAGATCTTTGCCCTGTTTGCCTTAATTGCTCTTTCT
GCAAGTGCCACTACTGAATCACCACATGCAACATGGCCCCTGTCAACTTCCAACCTCT
CTTCCTGTGGTTGTTG

ลำดับเบสที่เป็น Forward primer จะเป็นลำดับเบสตามลำดับเบสที่ปรากฏในยีนใดๆ ที่มีสะสมไว้ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nih.gov/> ซึ่งในแต่ละยีนหรือลำดับเบสของดีเอ็นเอจะมีรหัสเฉพาะ (Accession number) จากลำดับเบสของยีนนี้ออกแบบไพรเมอร์ที่เป็น forward primer ได้ดังนี้

5'-ATGGCAGCATACACCAGCAAGATCTT-3' ส่วน reverse primer มีลำดับเบส 5'-AACC ปฏิบัติการใดๆ สังเคราะห์ไพรเมอร์ดังกล่าวได้ แล้วนำมาใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป นอกจากนี้การออกแบบไพรเมอร์สามารถออกแบบได้โดยผ่านเว็บไซต์ที่ใช้โปรแกรมที่ให้บริการออกแบบไพรเมอร์ผ่านเว็บไซต์ ได้แก่ <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/> (ปรีชา ประเทพา, 2551)

2.5.3 การจับกันระหว่างดีเอ็นเอไพรเมอร์กับแม่พิมพ์ (Primer-Template Match)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากเทคนิค PCR จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อบริเวณของดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นเกิดได้เนื่องจากลำดับเบสที่มีความสอดคล้องกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ซึ่งความสอดคล้องกันนี้จะดีที่สุดเมื่อทั้งสองสิ่งนี้อยู่ในสภาวะ "perfect similarity" คือ เบสจะเป็นคู่กันตลอดแนวของไพรเมอร์ที่จับกับแม่พิมพ์ (A = T หรือ G-C) อย่างไรก็ตาม ถ้าไพรเมอร์ไม่จับกับแม่พิมพ์ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากเบสไม่สอดคล้องกันเพียง 1 เบส ก็ไม่ส่งผลต่อการเกิด PCR products แต่อย่างใด แต่มีข้อแม้ว่าลำดับเบสของไพรเมอร์ต้องยาว และเบสที่สอดคล้องกันระหว่างไพรเมอร์กับแม่พิมพ์ต้องมีจำนวน 6-10 เบส ในแต่ละด้านของไพรเมอร์จะส่งผลอย่างมากต่อการเกิด PCR products ซึ่งถ้าทางด้าน 3-OH ของไพรเมอร์ที่ไม่สอดคล้องกับแม่พิมพ์นั้น ถ้าเป็น A:G, G:A หรือ C:C จะส่งผลต่อการเกิด PCR products โดยประสิทธิภาพจะ

ลดลง ประมาณ 100 เท่า ขณะที่ A:A mismatches จะลดลง 20 เท่า ส่วน T:T, T:C, T:T นั้นจะจับกับเบสอื่นๆ ได้ดี ไม่มีปัญหาใดๆ ต่อการเกิด PCR products

ข้อแนะนำสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ คือ ให้พิจารณาว่าเบสที่อยู่ใกล้ด้าน 3-OH ของไพรเมอร์ ซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์พอลิเมอเรสเข้าจับนั้น ไพรเมอร์ตรงบริเวณนี้ต้องจับกับแม่พิมพ์อย่างแข็งแรง เพื่อให้เอนไซม์พอลิเมอเรสเข้าจับได้ดี (ปรีชา ประเทพา, 2551)

2.6 การแยกขนาดของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อให้สนามไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วย อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น และกระแสไฟฟ้า ในการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจล (Gel Electrophoresis) มีหลายชนิดดังนี้

2.6.1 แบบคอลัมน์ (Column Gel Electrophoresis) เจลถูกทำให้แข็งตัวในคอลัมน์และนำไปจุ่มอยู่ใน buffer ทั้งปลายบน และปลายล่าง สารผสมที่ต้องการแยกถูก ปล่อยลงบนผิวหน้าของเจลที่อยู่ปลายบน เมื่อให้สนามไฟฟ้าสารผสมจะแยกออกจากกันเป็นแถบ บัฟเฟอร์ที่ใช้ทั้งในตัวกลางเจลและในอ่างมี pH ประมาณ 9 ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบจึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก

2.6.2 Slab Gel Electrophoresis การทำ electrophoresis เหมือนกับ แบบคอลัมน์ แต่มีข้อดีกว่า คือ สามารถแยก และวิเคราะห์สารได้พร้อมกัน เป็นจำนวนมาก ในเจลแผ่นเดียวกันทั้ง column และ slab gel สารผสมที่ต้องการแยก ต้องใส่กลีเซอรอลหรือน้ำตาลซูโครสเพื่อเพิ่มความหนาแน่น ทำให้ไม่เกิดการแพร่กระจายของสารผสมใน บัฟเฟอร์ และต้องใส่ ประจุบวกที่ละลายน้ำหรือ สีดติดตามประจุลบด้วย สีย้อมนี้เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ประจุขนาดใหญ่ ส่วนใหญ่จึงทำให้ เห็นการเคลื่อนที่ระหว่างการทำจนสีย้อมเคลื่อนที่มาถึงปลายสุดของแผ่นเจลจึงจะสิ้นสุดการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและทำการย้อมเจลด้วยสีที่จับกับสารจะได้ แถบของสารที่ต้องการ

2.6.3 Agarose Gel Electrophoresis agarose เป็นสายพอลิเมอร์ ของ D-galactose และ 3,6-anhydro-L-galactose เมื่อเตรียมแผ่นเจล โดยต้มสารละลาย agarose ในบัฟเฟอร์แล้วเทลงในถาดเตรียมเพื่อให้แข็งตัวเมื่อเย็น จะได้เจลที่มีรูพรุนใหญ่ จึงใช้แยกสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก ซึ่งขนาดรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของ agarose (เมื่อความเข้มข้นสูงรูพรุนจะเล็กลง) เมื่อให้สนามไฟฟ้าที่ neutral pH โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะมีประจุลบและ เคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก

ด้วยความเร็วที่ขึ้นกับขนาดโมเลกุล (molecular size) และโครงรูป (conformation) เมื่อ charge/mass ratio ของกรดนิวคลีอิก = 1 ทำให้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่แปรผกผันกับ $\log_{10}$ ของน้ำหนักโมเลกุลของมัน กรดนิวคลีอิกขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่ และถ้าขนาดเท่ากันแต่มีรูปร่าง ต่างกันจะมีอัตราเร็วต่างกัน โดยลำดับของความเร็วในการเคลื่อนที่ของแต่ละรูปแบบของกรดนิวคลีอิก พบว่า supercoiled DNA > linear double stranded DNA > circular DNA Buffers ที่ใช้ คือ Tris acetate (TAE) Tris borate (TBE) และ Tris phosphate (TPE) ที่ความเข้มข้น 50 mM pH 7.5-8.0 และมี EDTA เพื่อยับยั้ง activity ของ DNase ส่วนสีที่ใช้ย้อมเป็น fluorescent compound (aromatic cation) ที่จับกับ double stranded DNA โดยเข้าไปแทรกตัว (intercalate) อยู่ระหว่าง base pair ที่ซ้อนกัน เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เมื่อฉายแสง UV จะให้ fluorescence มองเห็นเป็น band ของ DNA เรืองแสง (สารานุกรมเสรี, 2552)

2.6.4 ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อ การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ได้แก่ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของอะกาโรส โครงแบบของดีเอ็นเอ ความต่างศักย์ที่ใช้ องค์ประกอบของเบสและอุณหภูมิ การมีสีย้อมที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอ องค์ประกอบของอิเล็กโตรฟอรีซิสบัฟเฟอร์ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ สายคู่ที่อยู่ในแนวเส้น เคลื่อนที่ผ่านเจลเมทริกซ์ (gel matrices) ด้วยอัตราที่เป็นอัตราส่วนผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบส โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ไปได้ช้าเพราะมีแรงเสียดทานที่สูงกว่า และเคลื่อนที่ผ่านรูของเจลได้มีประสิทธิภาพน้อยกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าความเข้มข้นของอะกาโรส ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเชิงเส้น ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันจะเคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่างกันด้วยอัตราที่ไม่เท่ากัน (สารานุกรมเสรี, 2552) ดังตารางที่ 2.1

โครงแบบของดีเอ็นเอมีหลายแบบแตกต่างกัน เช่น ดีเอ็นเอที่เป็นวงซูเปอร์เฮลิคัล (superhelical circular) หรือฟอร์ม I ดีเอ็นเอที่เป็นวงที่มีรอยแยกหรือนิค (nicked circular) หรือฟอร์ม II และดีเอ็นเอเชิงเส้นหรือฟอร์ม III ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันมีโครงแบบแตกต่างกันได้ อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอทั้งสามรูปแบบนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล อิทธิพลของความเข้มข้นของกระแสที่ใช้ ความเข้มข้นของไอออนิกของบัฟเฟอร์ที่ใช้และความหนาแน่นของการปิดของซูเปอร์เฮลิคัลในดีเอ็นเอฟอร์ม I ภายใต้สภาวะบางประการ ดีเอ็นเอฟอร์ม I เคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอฟอร์ม III ภายใต้สภาวะอื่นลำดับอาจย้อนกลับได้

ตารางที่ 2.1 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้อะกาโรสเจลที่มีปริมาณอะกาโรสที่แตกต่างกัน

ปริมาณอะกาโรสในเจล (% w/v)	ช่วงการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอเชิงเส้นที่มีประสิทธิภาพ (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

ที่มา : อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545

ความต่างศักย์เป็นโวลต์ที่ใช้มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของดีเอ็นเอ อัตราการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเชิงเส้นเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ที่ใช้ ขณะที่ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้น การเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้น ดังนั้นขณะที่ความต่างศักย์เพิ่มขึ้นขอบเขตการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลลดลง เพื่อให้ได้อำนาจจำแนกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 kb สูงสุดจะต้องรันอะกาโรสเจลไม่เกิน 5 โวลต์/ซม.

ทิศทางของสนามไฟฟ้ามีผลต่อทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของดีเอ็นเอ ถ้าทิศทางของสนามไฟฟ้าคงที่ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 50-100 kb เคลื่อนที่ผ่าน อะกาโรสเจลในอัตราเดียวกัน แต่ถ้าทิศทางของสนามไฟฟ้าเปลี่ยนเป็นช่วงๆ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ถูกบังคับให้เปลี่ยนทิศทางเนื่องจากโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่ใช้เวลาในการวิ่งตัวเองในทิศทางใหม่ของสนามไฟฟ้า

องค์ประกอบของเบสของดีเอ็นเอและอุณหภูมิไม่ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรม อิเล็กโตรฟอริซิสของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล โดยทั่วไปจะรันอะกาโรสเจลที่อุณหภูมิห้อง สีย้อมเอทิเดียมโบรไมด์ ซึ่งเป็นสีย้อมเรืองแสงที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอในอะกาโรส สีที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอ การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เป็นสายในอิเล็กโตรฟอริซิสลง 15% สีย้อมแทรกเข้าไประหว่างชั้นของคู่เบส ทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอเชิงเส้นและโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นวงมีความยาวเพิ่มขึ้น เอทิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ฉะนั้นการจับถือต้องทำด้วยความระมัดระวัง และต้องทำการลดการปนเปื้อนของสารละลายที่มีเอทิเดียมโบรไมด์ก่อนทิ้ง

องค์ประกอบและความเข้มข้นของไอออนิกของอิเล็กโตรฟอรีซิสบัฟเฟอร์ ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอิเล็กโตรฟอรีซิส ในกรณีที่ไม่มีไอออนการนำไฟฟ้าต่ำสุดและดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้ามาก ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นไอออนิกสูง เช่นใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่าแทน 1 เท่าซึ่งอาจเกิดจากความพลั่งผลของการนำไฟฟ้ามีประสิทธิภาพมาก สำหรับอิเล็กโตรฟอรีซิสของดีเอ็นเอสายคู่ บัฟเฟอร์จะประกอบด้วย EDTA pH 8 ทริสแอซิเตตรต (Tris-acetate =TAE) ทริสโบเรต (Tris-borate = TBE) หรือทริสฟอสเฟต (Tris-phosphate) ปกติแล้วอิเล็กโตรฟอรีซิสบัฟเฟอร์จะถูกเตรียมในรูปสารละลายที่เข้มข้นเป็นสารละลายสต็อกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (สารานุกรมเสรี, 2552)

2.7 เทคนิคอาร์เอฟพีดีกับการนำไปใช้ประโยชน์

เทคนิคอาร์เอฟพีดีมีความสะดวกรวดเร็วและใช้เวลาน้อยและใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก คือ 10-400 ng เท่านั้นจึงสามารถศึกษาได้ด้วยตัวอย่างพืชคราวละมากๆ ได้ นอกจากนี้ในกระบวนการยังไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นสารกัมมันตรังสีอีกด้วย เทคนิคนี้เรียกว่า PCR with arbitrary primer (AP-PCR) หรือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) หลักการของเทคนิค RAPD จะใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นๆ นิยมใช้ 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mer primer) ที่มี GC content ค่อนข้างสูงประมาณ 60-70% (ต่ำสุด 50%) ไพรเมอร์เหล่านี้เป็นไพรเมอร์ที่มีการจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์เป็นแบบสุ่ม มีการสุ่มหาลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ที่กระจายอยู่ใน genomic DNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ การจับกัน (annealing) ระหว่างไพรเมอร์กับลำดับเบสเป้าหมายนี้มี 2 กรณี คือ จับกันได้ 100% (100% homology) และจับได้บางส่วนของดีเอ็นเอ หลังจากที่มีการจับกันแล้วจะมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเรียกว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่จนขั้นตอนสุดท้ายจะได้ PCR products และนำไปแยกชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรฟอรีซิส ซึ่งอาจใช้ SDS-PAGE หรืออะกาโรสก็ได้ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือแถบดีเอ็นเอใดๆ นั้นเราไม่ทราบลำดับเบสเลย (anonymous DNA sequence) การปรากฏ (presence) และการไม่ปรากฏ (absence) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอใดๆ นั้นเราสามารถเปรียบเทียบระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษาที่อาจจะเป็นสปีชีส์เดียวกันจากคนละประชากร จะได้ข้อมูลในการที่จะประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ หรือในบางกรณีอาจจะใช้เป็นข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ (fingerprint-like pattern) การเกิดชิ้นดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่ นั้นเกิดจากลำดับเบสเป้าหมาย 2 แห่งที่อยู่บนดีเอ็นเอคนละสาย ในทิศทางตรงกันข้ามกันและระยะห่างระหว่าง 2 จุดที่ไพรเมอร์จับควรห่างกันน้อยกว่า 1 kb (kilobase) ดังนั้นดีเอ็นเอชิ้นเล็กจึงค่อนข้างจะสังเคราะห์ได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอชิ้นใหญ่ (มีความยาวมากกว่า) จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นนั้นสามารถคาดคะเนได้จากทฤษฎีที่ใช้เพียง 1 ไพรเมอร์ และมีการจับกับลำดับเบสเป้าหมายได้

สมบูรณ์ (100% homology) ซึ่งสามารถคำนวณจากความยาวไพรเมอร์ (primer length) และความซับซ้อนของจีโนมที่ศึกษา สมมติว่าปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลองมีสัดส่วนเท่ากัน ซึ่ง Williams *et al.* (1990) ได้เสนอสมการไว้ดังนี้ $b = (2000 \times 4^{2n} \times C)$ เมื่อ b คือ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่คาดหวังต่อไพรเมอร์นั้นๆ, n คือ ความยาวของไพรเมอร์ (คิดเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์) และ C คือ ความซับซ้อนของสิ่งมีชีวิต (ขนาดของจีโนมเป็น base pair ต่อ haploid genome) จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากทำปฏิกิริยา PCR นั้น ในแต่ละครั้งจะขึ้นอยู่กับสิ่งต่างๆ เหล่านี้ คือ ลำดับเบสของไพรเมอร์, ลำดับเบสของดีเอ็นเอ และ ขนาดของจีโนม (ปรีชา ประเทพา, 2551)

การศึกษา polymorphic ในสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิค RAPD นี้ ตามทฤษฎีแล้วมีเหตุการณ์ต่างๆ มักเกิดขึ้นเสมอ ดังนี้ เมื่อเกิดการ annealing site 2 จุด มีระยะห่างกันพอสมควรจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่มีขนาดใหญ่พอสมควร ถ้าดีเอ็นเอบางส่วนขาดหายไป ซึ่งเป็นบริเวณที่ไพรเมอร์จับ อาจพบว่าไม่มี band เกิดขึ้นนั่นหมายความว่าปฏิกิริยาลูกโซ่ล้มเหลวโดยสิ้นเชิง กรณีเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ไปจากเดิม การแทรกเข้ามา (insertion) หรือการขาดหายไป (deletion) ของชิ้นดีเอ็นเอเล็กๆ ตรงบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จะได้ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดเล็กหรือใหญ่ขึ้นตามลำดับ ซึ่งในทางปฏิบัติ การที่จะสังเกตเห็นเป็นไปได้อย่าง ข้อมูลที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD-PCR การตรวจสอบระดับของความแปรผันทางพันธุกรรมและการกระจายของความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากร และระหว่างประชากรของพืชหายากนั้นนับว่าเป็นหัวใจของพันธุศาสตร์เชิงอนุรักษ์ เทคนิค RAPD อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในบรรดาเทคโนโลยีดีเอ็นเอทั้งหลาย เพราะว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบระดับความแปรผันได้ดี เทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาโครงสร้างประชากรของพืชที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน (clone) โดยมีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ศึกษาเพื่อทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับประชากรของสิ่งมีชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและการแพร่กระจายออกไปเป็นประชากรย่อยๆ โดยเทคนิค RAPD จะประยุกต์ใช้เพื่อหาข้อมูลว่าประชากรใหม่ๆ นั้นเกิดจากประชากรเดิมจริงหรือไม่ (ปรีชา ประเทพา, 2551)

ปรีชา, (2551) ได้เสนอความคิดเห็นว่ามีข้อสังเกตอยู่ 2 ประการในการเลือกใช้เทคนิค RAPD markers ประยุกต์ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ การใช้ RAPDs ในกรณีนี้เพื่อเป็นเทคนิคที่เชื่อมโยงกับเทคนิคอื่นๆ โดยอาจจะเปรียบเทียบระหว่างอัลโลไซม์และ RAPDs ควบคู่กันไป ในกรณีที่จำนวนหน่วยของสิ่งมีชีวิตมีจำนวนน้อย อาทิ พืช หรือ สัตว์ที่เป็นชนิดหายาก (rare species) ซึ่งอัลโลไซม์ตรวจสอบไม่พบความหลากหลาย ควรที่จะใช้เทคนิค RAPD และเทคนิค RAPD ซึ่งเหมาะสมในการศึกษาการสร้างลูกผสม การวิเคราะห์ความเป็นพ่อแม่

แม้ การประเมินการผสมข้าม และการประเมินโครงสร้างประชากรในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมเหมือนกันและเทคนิค RAPD ยังสามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ภายในหรือระหว่างประชากร

2.7.1 ใช้ในการประเมินความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช

ข้อมูลที่ได้จากการประเมินความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และการจัดจำแนกพืชได้ (Tingey and Tufo, 1993) Galgaro และคณะ (1998) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วลิสงจำนวน 21 เลขหมาย ที่อยู่ในกลุ่ม *Arachis*, *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Heteranthae* และ *Triseminatae* ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วลิสงแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน และแบ่งถั่วลิสงออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยถั่วลิสงกลุ่ม *Extranervosae*, กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยถั่วลิสงกลุ่ม *Caulorrhizae*, *Heteranthae* และ *Triseminatae* และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยถั่วลิสงกลุ่ม *Arachis* นอกจากนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังระบุว่าถั่วลิสงชนิด *A. pietrarellii* มีความใกล้ชิดกับถั่วลิสงชนิด *A. villosulicarpa* Li and Nelson (2002) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก และถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (*Glycine soja*) ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบถั่วเหลืองพันธุ์ป่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก Harvy and Botha (1996) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์อ้อย (*Saccharum*) ลูกผสม พบอ้อยลูกผสมที่ผสมย้อนกลับสายพันธุ์พ่อหรือแม่ประมาณ 5-6 ชั่วโมง มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงกว่า 84% นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคอาร์เอพีดีวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชอื่นอีก เช่น มะเขือเทศ (Villand *et al.*, 1998)

2.7.2 ใช้ในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมพืช

การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่ผ่านมา Eajay และคณะ (1997) ได้สร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบเครื่องหมายอาร์เอพีดีจำนวน 28 เครื่องหมาย แบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม และมีระยะทางทั้งหมด 206 เซนติโมแกน Menendez *et al.* (1997) สร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของถั่วพุ่มด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบเครื่องหมายอาร์เอพีดีจำนวน 133 เครื่องหมาย แบ่งออกเป็น 12 กลุ่ม และมีระยะทางทั้งหมด 972 เซนติโมแกน นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมในพืชอื่นอีกหลายชนิดเช่น ถั่วลิสง (*Arachis*) (Garcia *et al.*, 1995) ถั่วอาหารสัตว์ หรือถั่ว

alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Yu and Pauls, 1993) และแตงโม (Hashizume *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของพืชด้วยการนำลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างพืชสายพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่าที่เป็นบรรพบุรุษของสายพันธุ์ปลูก ทำให้ประชากรลูกผสมที่เกิด recombination หรือการเรียงตัวของแท่งโครโมโซมที่ทำให้การกระจายตัวของยีนผิดปกติแบบ (Ford and Taylor, 2003) และมีข้อมูลน้อยในการประเมินระยะทางของพันธุกรรม (Tingey and Tufo, 1993) ดังนั้นจึงควรสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมจากลูกผสมที่ได้จากการผสมภายในชนิดและระหว่างสายพันธุ์ของพืช ซึ่งจะช่วยลดจำนวนประชากรลูกผสมที่เกิดจาก recombination หรือการเรียงตัวของแท่งโครโมโซมที่ทำให้การกระจายตัวของยีนผิดปกติแบบ เนื่องจากเครื่องหมายอาร์เอพีดีเป็น dominant marker ไม่สามารถแยกลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัสออกจากเฮเทอโรไซกัสได้ ทำให้การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของลักษณะพืชที่ถูกควบคุมด้วยหลายยีน ซึ่งเป็นลักษณะทางปริมาณนั้นจะทำได้ยาก (Waugh and Powell, 1992) เพราะเมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของยีนในลูกรุ่น F_2 ยีนจะถูกแยกออกไปอยู่โครโมโซมต่างแท่งกัน จึงทำให้มีข้อมูลไม่เพียงพอในการประเมินระยะทางของพันธุกรรม จำเป็นต้องคัดเลือกเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่เชื่อมอยู่ด้วยกันเป็นคู่ (coupling) เมื่อเกิดการกระจายตัวของยีนในลูกรุ่น F_2 เครื่องหมายดีเอ็นเอจะไปเชื่อมอยู่กับยีนบนตำแหน่งของโครโมโซมแท่งเดียวกัน ทำให้ตรวจสอบได้ในประชากรลูกผสมที่เกิด recombination หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะแฮพลอยด์ (haploid) หรือแกมีโตไฟต์ (gametophyte) (Tingey and Tufo, 1993)

2.7.3 ใช้ในการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมอยู่กับลักษณะหรือยีนที่สำคัญ

การประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมอยู่กับลักษณะหรือยีนที่สำคัญโดยการวิเคราะห์จากสายพันธุ์พืชที่เป็น near-isogenic line (NILs) สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมอยู่กับลักษณะที่ต้องการหรือยีนที่สนใจได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ (Waugh and Powell, 1992) และยังใช้คัดเลือกหรือระบุตำแหน่งยีนที่นำเข้าหรือผสมกับพืช 2 สายพันธุ์ที่เป็น NILs ได้ Paran และคณะ (1991) ประสบความสำเร็จในการคัดเลือกเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่เชื่อมอยู่กับยีนที่ควบคุมลักษณะการต้านทานต่อเชื้อรา (downy mildew: *Dm*) ประกอบด้วยยีน *Dm1*, *Dm3* และ *Dm11* ในผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) โดยใช้สายพันธุ์ผักกาดหอมที่เป็น NILs พบเครื่องหมายอาร์เอพีดีจำนวน 4 เครื่องหมาย เชื่อมอยู่กับยีน *Dm1* และ *Dm3* และ 6 เครื่องหมายเชื่อมอยู่กับยีน *Dm11* อย่างไรก็ตามเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่ใช้วิเคราะห์พืชที่เป็น NILs มีข้อเสีย คือ การคัดเลือกลักษณะหรือยีนที่อยู่ในพืชที่เป็น NILs นั้นทำได้ยาก และการสร้าง near-isogenic line ต้องมีการผสมกลับหลายชั่วรุ่นและยีนบางส่วนของของ

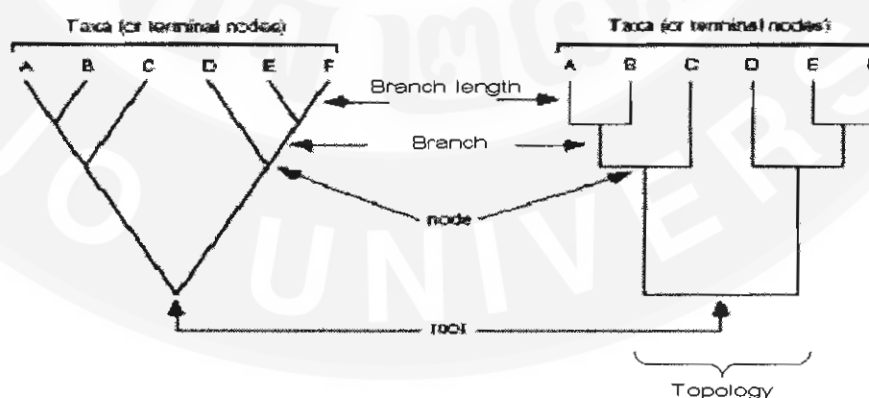
จีโนมพอ-แมไม่ได้อยู่ในสายพันธุ์ NILs ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้จาก NILs ไม่ได้เชื่อมอยู่กับลักษณะหรือยีนที่เราต้องการ (Tingey and Tufo, 1993) จึงมีการประยุกต์วิธีการของเทคนิคอาร์เอพีดีมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอรวม (bulk segregant analysis: BSA) เป็นวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ และรวดเร็วจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ จากการเปรียบเทียบตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม ที่มีการกระจายตัวอย่างจำเพาะ Michelmore และคณะ (1991) คัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมอยู่กับยีนที่ต้านทานต่อเชื้อราจำนวน 5 ยีน คือ *Dm1*, *Dm3*, *Dm4*, *Dm5/8*, *Dm7* และ *Dm13* ในผักกาดหอมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยการวิเคราะห์ผลแบบ bulk segregant analysis พบเครื่องหมายอาร์เอพีดีจำนวน 3 เครื่องหมาย เชื่อมอยู่กับยีน *Dm5/8* บนแผนที่ทางพันธุกรรมของผักกาดหอม Garcia และคณะ (1996) คัดเลือกเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่เชื่อมอยู่กับยีนที่ต้านทานต่อโรคไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne aranaria*) ในถั่วลิสงจำนวน 2 ยีน ประกอบด้วยยีนที่ต้านทานต่อโรคไส้เดือนฝอยในช่วงการสร้างไข่ คือ *Mae* และยีนที่ต้านทานต่อโรคไส้เดือนฝอยในช่วงการสร้างปม คือ *Mag* จากการผสมระหว่างถั่วลิสง *A. duranensis* กับถั่วลิสงพันธุ์ปลูก โดยวิธีการ bulk segregant analysis พบเครื่องหมายอาร์เอพีดี Z3/265 เชื่อมอยู่กับยีน *Mae* กับ *Mag* ที่ระยะทาง 10 และ 14 เซนติโมแกน ตามลำดับ

2.8 การสร้างสายวิวัฒนาการแบบต้นไม้

ปริชา (2551) รายงานว่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นสามารถใช้ข้อมูลจากการเปรียบเทียบ "orthologous genes" หรือโปรตีนที่กำหนดการสร้างโดยยีนเดียวกันและสร้างเป็น "phylogenetic tree" ซึ่งแบ่งออกเป็น "molecular phylogenetic tree" ที่อธิบายการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนในระหว่างการเกิดการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการและ "species phylogenetic tree" ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาคำว่า "ทรี (tree)" หมายถึง แผนภูมิแบบต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ในธรรมชาติ สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างหรือคล้ายคลึงระหว่างกันและกันอยู่แล้ว ถ้าจะมีการศึกษาการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตโดยใช้หลักเกณฑ์ต่างๆ ที่มนุษย์ตั้งขึ้น ทำให้เกิดศาสตร์ใหม่เรียกศาสตร์นี้ว่า ซิสเต็มมาติกส์ (systematic study) นักชีววิทยาที่สนใจศาสตร์นี้มีความคุ้นเคยกับแผนภูมิหรือเดนโดแกรม (Dendrogram) หรือไฟโลเจเนติกทรี (phylogenetic tree) หรือ กิ่งไม้วิวัฒนาการ ที่เกิดจากการวิเคราะห์ข้อมูลที่เป็นตัวเลขโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้กับคอมพิวเตอร์ เดนโดแกรมเป็นคำที่ใช้เรียกแผนภูมิที่แสดงถึงความสัมพันธ์ในเชิงพันธุกรรม แผนภูมินี้เป็นสิ่งสะท้อนให้เห็นภาพรวมๆ ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างกันและกันมากน้อยเท่าใด หรือสะท้อนให้เห็นประวัติความเป็นมาในทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษาในระดับวงศ์ ระดับวงศ์

ย่อย หรือ ระดับสกุล เป็นต้น ระเบียบวิธีการสำหรับใช้ในการศึกษาการจัดระบบของสิ่งมีชีวิต โดยการสร้างแผนภูมิในลักษณะเช่นนี้สามารถแบ่งออกเป็นวิธีหลักๆ สองวิธีคือ “Phenetic approach” และ “Cladistic approach” โดยหลักการพื้นฐานแล้ววิธีแรกนั้นจะมองภาพรวมความเหมือนกันของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษาว่ามีความเหมือนกันมากน้อยจากข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือข้อมูลของยีนหรือดีเอ็นเอ ในขณะที่วิธีหลังนั้นจะมีการพิจารณาถึงข้อมูลทั้งสองแบบนั้น (สัณฐานวิทยาและยีนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ) ในบริบทของสถานภาพของลักษณะ หรือ เรียกว่า “character state” ของแต่ละลักษณะที่ศึกษาว่าลักษณะที่ปรากฏให้เห็นในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษานั้นเป็นแบบดั้งเดิม (primitive) หรือเป็นแบบที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมแล้ว (derived character) นับว่าเป็นวิธีที่ค่อนข้างจะซับซ้อนมากกว่าวิธีแรก ในกระบวนการ “จัดการข้อมูล” ก่อนจะนำไปสู่การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางพันธุกรรมเพื่อสร้างเป็นแผนภูมิที่เป็นผลลัพธ์ออกมาใช้ในการแปลผลเพื่อใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ที่ปรากฏตามแผนภูมิ

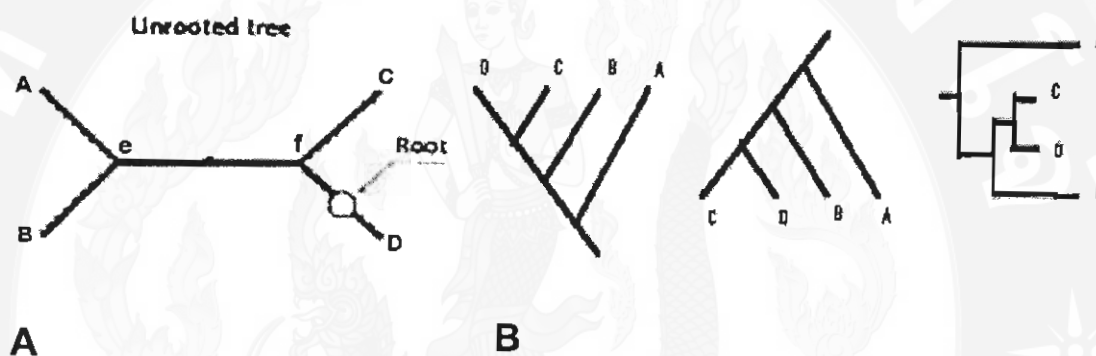
อรุณรัตน์ (2547) กล่าวว่า phylogenetic tree หมายถึงแบบแผนที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างหน่วยอนุกรมวิธานจะทำให้เกิดความเข้าใจถึงประวัติของสิ่งมีชีวิตนั้น แต่คำว่าประวัตินั้นคือสิ่งที่เกิดขึ้นและผ่านมาแล้วทั้งไว้แต่เพียงร่องรอยที่เป็นเครื่องบ่งบอกว่ามีเหตุการณ์เช่นนั้นเกิดขึ้นจริง นักวิทยาศาสตร์จึงนำร่องรอยที่เป็นเครื่องบ่งชี้เหล่านี้มาสร้างสมมติฐานซึ่งเป็นรูปแบบเฉพาะของประวัติสิ่งมีชีวิต เรียกว่า Phylogenetic tree นั่นเอง ซึ่งเป็นรูปแบบหรือสัญลักษณ์ที่ทำให้มองเห็นความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตนั้นได้



ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงส่วนประกอบของแผนภูมิกิ่งไม้

ที่มา : เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545

Topology	หมายถึงแผนภูมิกิ่งไม้ที่ไม่มีการแตกกิ่งออกไป
Root	หมายถึงบรรพบุรุษร่วมกันของหน่วยอนุกรมวิธานใน topology นั้น
Nodes	คือหน่วยอนุกรมวิธานซึ่งอาจจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่ยังมีชีวิตอยู่หรือเป็น บรรพบุรุษ
Branch	หมายถึงตัวที่กำหนดความสัมพันธ์ระหว่างหน่วยอนุกรมวิธานในรูปของลูกหลาน หรือ บรรพบุรุษ
Branch length	แทนจำนวนของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นใน branch



ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงลักษณะของ phylogenetic tree A = Unrooted tree B = Rooted tree

ที่มา : เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545

Unrooted tree (A) เป็นแผนภูมิที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต A B C และ D เท่านั้น ไม่ได้บอกถึงลำดับเหตุการณ์ของวิวัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงมาของยีน A B C และ D แผนภูมินี้ยังบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีน 4 ชนิดที่ฮอโมโลกัสกัน topology ประกอบด้วย 4 external nodes (A B C และ D) แต่ละ node เป็นตัวแทนของยีน 4 ชนิด และมี 2 internal node (e และ f) ซึ่งเป็นตัวแทนบรรพบุรุษของทั้งสี่ยีน ส่วน branch lengths บ่งบอกถึงระดับของความแตกต่างทางวิวัฒนาการระหว่างยีนทั้งสี่นี้

Rooted tree (B) เป็นแผนภูมิที่บอกถึงลำดับเหตุการณ์ของวิวัฒนาการที่สรุปได้จากข้อมูลที่นำมาศึกษาและอาจจะไม่ใช่แผนภูมิที่ถูกต้องก็ได้ หรือเป็นแผนภูมิที่บอกถึงลำดับเหตุการณ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นจริง phylogenetic analysis นี้ต้องมี out group อย่างน้อย 1 group

ความแตกต่างของ gene tree และ species tree คือเมื่อใช้ข้อมูลระดับโมเลกุลมาสร้าง gene tree จะได้แผนภูมิที่ถูกต้องกว่า species tree ซึ่งใช้ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยา gene tree ไม่ใช่ species tree แต่ก็อธิบายได้ว่า internal node ใน gene tree บ่งบอกถึงความแตกต่างของยีน บรรพบุรุษที่แยกออกไปเป็น 2 ยีนซึ่งมี DNA sequence แตกต่าง กันโดยมักเป็นผลมาจากมิวเทชัน internal node ส่วน species tree จะแสดงให้เห็นถึงเหตุการณ์ที่เกิดสปีชีส์ใหม่ (speciation event) คือ บริเวณที่ประชากรของ ancestral species แยกออกไป เป็นสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้อีก



บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ครุภัณฑ์และสารเคมี

3.1.1 ครุภัณฑ์

ชื่อครุภัณฑ์

ตู้เย็น (Refrigerator)

หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

เครื่องชั่ง (Balance)

เครื่องเซนตริฟิวจ์

เครื่องพีซีอาร์

เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวนอน

เตาไมโครเวฟ (Microwave oven)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ

เครื่องเขย่าผสมสาร

ยี่ห้อ/รุ่น

Tochiba

Hirayama รุ่น HVE 50

Denver รุ่น SI-234

Hettich zentrifugen (Universal 32R)

Thermo hybaid PCR Express

Bio Rad

Sharp

Water bath รุ่น GFL 1083

Vortex-Genie2

3.1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี

Agarose,

Boric acid,

1 kb DNA ladder

Ethanol

Ethidium bromide,

Ethylene diamine tetraacetic acid

Liquid nitrogen

Plant Genomic DNA Mini Kits

Potassium hydroxide

Taq DNA polymerase

Tris base,

เกรดสารเคมี

Molecular Biology

Analytical grade

Molecular biology

Analytical grade

Molecular Biology

Biotechnology

Molecular Biology

Analytical grade

Molecular Biology

Analytical

3.2 การเก็บตัวอย่างพืชสกุลส้ม

นำตัวอย่างพืชสกุลส้มทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ที่พบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยจำนวนชนิดและสถานที่เก็บตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นนำมาการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อเปรียบเทียบลักษณะที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 3.1 ชนิดและสถานที่เก็บตัวอย่างของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่เก็บตัวอย่างพืช
1	<i>Strobilanthes Cusia</i> BCM	สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่
2	<i>Strobilanthes Cusia</i> KPH	บ้านนาคูหา จังหวัดแพร่
3	<i>Strobilanthes Cusia</i> NPH	บ้านนาตอง จังหวัดแพร่
4	<i>Strobilanthes Cusia</i> HPH	บ้านห้วยส้ม จังหวัดแพร่
5	<i>Strobilanthes</i> sp.1 BCM	สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่
6	<i>Strobilanthes</i> sp.2 BCM	สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่
7	<i>Strobilanthes</i> sp.3 BCM	สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่
8	<i>Strobilanthes</i> sp.4 KLP	อุทยานแห่งชาติขุนตาล จังหวัดลำปาง
9	<i>Strobilanthes</i> sp.5 HCM	ห้วยน้ำดัง จังหวัดเชียงใหม่
10	<i>Strobilanthes</i> sp.6 HCM	ห้วยน้ำดัง จังหวัดเชียงใหม่
11	<i>Strobilanthes</i> sp.8 KLP	อุทยานแห่งชาติขุนตาล จังหวัดลำปาง
12	<i>Strobilanthes</i> sp.9 PCM	โครงการหลวงผามอนล่อง จังหวัดเชียงใหม่

หมายเหตุ BCM = สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ KPH = บ้านนาคูหา จังหวัดแพร่

NPH = บ้านนาตอง จังหวัดแพร่

HPH = บ้านห้วยส้ม จังหวัดแพร่

KLP = อุทยานแห่งชาติขุนตาล จังหวัดลำปาง

HCM = ห้วยน้ำดัง จังหวัดเชียงใหม่

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนพืชสกุลส้ม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป

น้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ในครั้งนี้ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท ริเวอร์ดิง จำกัด ประเทศไทย ชื่อชุดน้ำยา Plant Genomic DNA Mini Kits ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอมีดังนี้

ซึ่งเนื้อเยื่อใบพืชสกุลส้มให้น้ำหนัก 0.03 กรัม เติม GPX1 buffer 600 ไมโครลิตร และ RNase A (10 mg/ml) 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นที่อุณหภูมิและนำไปปั่นในน้ำแข็ง

เป็นเวลา 3 นาที และบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดทุก 5 นาที เติมสารละลาย GP2 buffer 100 ไมโครลิตร และนำไปปั่นในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายลงใน Filter column สีม่วง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายที่อยู่ในหลอด 2 ml collection tube ใส่ลงในหลอด 1.5 ml collection tube หลอดใหม่ปรับปริมาตรให้ได้ 450 ไมโครลิตร เติมสารละลาย GP3 buffer 675 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากัน แล้วดูดสารละลายปริมาตร 650 ไมโครลิตร ในหลอด Filter column สีขาว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ในส่วน collection tube เติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน collection tube ทิ้งนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ column matrix แห้ง จากนั้นเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 เพื่อให้ matrix ดูดซึมสารละลาย Elution buffer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่าน column matrix ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องแสง อัลตราไวโอเล็ต (UV light) และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพเจล

3.4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลย้อมด้วยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

เทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลที่นำมาใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลย้อมครั้งนี้ คือ เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยทำตามวิธีการของ Williams et al., 1990 และใช้ไพรเมอร์ของบริษัท Operon Technology จากบริษัทธีระเทรตติ้ง จำกัด ประเทศไทย โดยคัดเลือกไพรเมอร์มาจากรายงานการวิจัยของการใช้เทคนิค RAPD ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในสกุลที่ใกล้เคียงกันกับพืชสกุลย้อม ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกันคือ Acanthaceae โดยคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 12 เส้น แต่ละเส้นประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 เบส และไพรเมอร์ทุกเส้นมีรายละเอียดดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่นำมาตรวจสอบ

ลำดับ	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ลำดับ	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')
1	KPA-03	AGT CAG CCA C	8	KPJ-12	GTC CCG TGG T
2	KPA-05	AGG GGT CTT G	9	KPJ-13	CCA CAC TAC C
3	KPA-16	AGC CAG CGA A	10	KPJ-20	AAG CGG CCT C
4	KPA-20	GTT GCG ATC C	11	KPW-03	GTC CGG AGT G
5	KPB-10	CTG CTG GGA C	12	KPW-09	GTG ACC GAG T
6	KPB-11	GTA GAC CCG T	13	KBC-09	CCT GCG GTT A
7	KPB-12	CCT TGA CGC A			

ในวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มด้วยปฏิกิริยาอาร์เอพีดีนั้นมีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ ตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบและความเข้มข้นหรือปริมาณสารสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตรต่อหลอด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายหรือ ปริมาณสารสุดท้าย
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	16.6	-
10x PCR buffer	2.5	1x PCR buffer
50 mM MgCl ₂	1	2 mM MgCl ₂
10 mM dNTP mix	0.5	0.05 mM dNTP mix
5 U/μl Taq DNA polymerase	1	4 U/μl Taq DNA polymerase
10 mM/μl Primer	0.4	2 mM/μl Primer
5 μg/μl genomic DNA	3	5 μg/μl genomic DNA
รวม	25	-

ผสมส่วนประกอบของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้เข้ากันในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยมีรายละเอียดของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 Predenaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

จำนวน 40 รอบ

ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

เก็บสารละลายผสมผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR products) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

3.5 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดีด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.5.1 การตรวจสอบผลด้วย 1.5% (w/v) agarose gel

ซึ่ง agarose ให้ได้น้ำหนัก 1.20 กรัม ใส่ลงใน 1X TBE buffer (ส่วนประกอบภาคผนวก ก) ในปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วต้มจนเดือด เมื่ออุณหภูมิของสารละลาย agarose ลดลงที่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย ethidium bromide 3 ไมโครลิตร นำไปเทในถาดเจลที่เตรียมไว้ และเสียบหัวเมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วถอดหัวออก วางเจลลงในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวนอน หยอดดีเอ็นเอของ 1 kb DNA ladder ที่ทราบจำนวนชิ้นและขนาดของแต่ละชิ้น และตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ลงในแต่ละร่องหัวให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพเจล

3.6 การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานและชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่าง จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยการ Take log ฐาน 10 ก็จะได้กราฟมาตรฐานของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อใช้เปรียบเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชสกุลส้มแต่ละชิ้น หลังจากที่ได้กราฟมาตรฐานแล้วก็ทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวอย่างพืชสกุลส้มแต่ละชิ้น เพื่อนำไปคำนวณหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างจากระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน เมื่อได้ค่าการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างแล้วนำค่าที่ได้ Take log ฐาน 10 กลับก็จะได้ค่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่าง

3.7 สถานที่ทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง โดยจะทำการสกัดดีเอ็นเอ ณ อาคารปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ตำบลแม่ทราย อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลห้อม

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของพืชสกุลห้อมในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าพืชสกุลห้อมมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้

4.1.1 สัณฐานวิทยาของ *Strobilanthes Cusia* BCM, KPH, NPH และ HPH

เป็นไม้พุ่ม ลำต้นสูง 26-45 เซนติเมตร มีสีน้ำตาล มี Node และข้อปล้อง ไม่มีขน ใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียวเรียงตัวตรงข้ามกัน ไม่พบหูใบ ลักษณะใบเป็นทรงกลมปลายใบทรงกลมโคนใบเรียวยาวขอบใบหยักเส้นกลางใบ ยาวประมาณ 6-10 เซนติเมตร ใบกว้าง 6-10 เซนติเมตร ก้านใบยาว 12 เซนติเมตร มีเส้นแขนงที่ใบมี 1-7 แขนง ลักษณะหน้าใบและหลังใบไม่มีขน หนึ่งต้นมี 5-20 ใบ เป็นดอกช่อ ดอกสีม่วงไม่มีขน พบบริเวณ จังหวัดแพร่

4.1.2 สัณฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 1 BCM

เป็นไม้พุ่ม ลำต้นสูง 26-45 เซนติเมตร ลำต้นสีเขียวมีข้อปล้องและ Node ไม่มีขน ใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียวเรียงตัวแบบตรงข้ามกัน มีหูใบ 20 ใบหรือมากกว่า ลักษณะใบทรงกลม ปลายใบทรงกลม โคนใบเรียวยาวขอบใบหยักก้านใบยาว 11 เซนติเมตรหรือมากกว่า เส้นกลางใบ ยาว 6-10 เซนติเมตรมีเส้นแขนงที่ใบมี 1-7 แขนงใบกว้าง 6-10 เซนติเมตร ลักษณะหน้าใบและหลังใบไม่มีขน หนึ่งต้นมีใบ 21-40 ใบ ลักษณะดอกเป็นดอกช่อสีขาวมีขน พบที่สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่

4.1.3 สัณฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 2 BCM

เป็นพืชไม้พุ่มลำต้นสูง 26-45 เซนติเมตร ลำต้นสีน้ำตาลมีข้อปล้องและ Node ใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียว และเรียงตัวตรงข้ามกันหูใบมี 6-10 ใบ ลักษณะใบเรียวยาวปลายใบแหลม โคนใบทรงกลมขอบใบหยักก้านใบยาว 11 เซนติเมตรหรือมากกว่า เส้นแขนงมี 8-14 เส้น เส้นกลางใบ ยาว 6-10 เซนติเมตรและใบกว้าง 6-10 เซนติเมตร หนึ่งต้น 5-20 ใบมีขนเฉพาะหน้าใบเท่านั้น เป็นดอกช่อมีสีขาวแกมม่วงไม่มีขน พบที่สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่

4.1.4 สัณฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 3 BCM

เป็นพืชไม้เลื้อยมีลำต้นสูง 66 เซนติเมตรหรือมากกว่านั้น มีข้อปล้องและ Node ใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียวและเรียงตัวตรงข้ามพบหูใบมี 20 ใบหรือมากกว่าลักษณะใบเรียวแหลมปลายหอกโคนใบเป็นแบบตัดและขอบใบเรียบ มีก้านใบยาว 11 เซนติเมตรโดยประมาณมีเส้นแขนงที่ใบมี 15-20 แขนงเส้นกลางใบ ยาว 6-10 เซนติเมตรใบกว้าง 6-10 เซนติเมตรซึ่งหนึ่งต้นมีใบ 41-50 ใบมีขนที่เฉพาะหน้าใบ ลักษณะดอกเป็นดอกช่อดอกมีสีม่วงไม่มีขน พบที่สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่

4.1.5 สัณฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 4 KLP

เป็นไม้พุ่มมีลำต้นสูง 26-45 เซนติเมตร มีข้อปล้องและ Node ลำต้นมีสีม่วงแดงไม่มีขน ลักษณะของใบเป็นพืชใบเลี้ยงคู่และใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียวและเรียงตัวตรงข้ามไม่พบหูใบ ใบมีลักษณะเรียวแหลมปลายใบเป็นลักษณะทรงกลมมีโคนใบเป็นทรงกลมก้านใบยาว 1-10 เซนติเมตร เส้นแขนงที่ใบมี 1-7 แขนงเส้นกลางใบ ยาว 1-5 เซนติเมตร ใบกว้าง 1-5 เซนติเมตร ขอบใบหยัก หนึ่งต้นมีใบ 5-20 ใบพบขนที่หน้าใบแต่ไม่พบที่หลังใบ ลักษณะดอกเป็นดอกช่อออกดอกเป็นสีม่วงไม่มีขน พบที่อุทยานแห่งชาติขุนตาล จังหวัดลำปาง

4.1.6 สัณฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 5 HCM

เป็นไม้พุ่มลำต้นสูง 10-25 เซนติเมตร มีข้อปล้องและ Node ลำต้นสีม่วงแดงไม่มีขน ใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียวและเรียงตัวตรงข้ามพบหูใบมี 6-10 ใบลักษณะใบเป็นทรงกลมปลายใบแหลมโคนใบเป็นเรียวยาวก้านใบยาว 12 เซนติเมตร มีเส้นแขนง 8-14 แขนงเส้นกลางใบ ยาว 11-15 เซนติเมตรใบกว้าง 6-10 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ หนึ่งต้นมีใบ 5-20 ใบไม่พบขนทั้งหน้าใบและหลังใบ ลักษณะดอกเป็นดอกช่อออกดอกเป็นสีขาวแกมม่วงไม่มีขน พบที่ห้วยน้ำดัง จังหวัดเชียงใหม่

4.1.7 สัณฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 6 HCM

เป็นไม้พุ่มลำต้นสูง 26-45 เซนติเมตร มีข้อปล้องและ Node ลำต้นสีเขียวมีขน ใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียวและเรียงตัวตรงข้ามไม่พบหูใบมีลักษณะใบเป็นทรงกลมปลายใบแหลมโคนใบเป็นเรียวยาวก้านใบยาว 11 เซนติเมตร หรือมากกว่าเส้นกลางใบ ยาว 1-5 เซนติเมตร เส้นแขนง

ที่ใบมี 1-7 แขนงใบกว้าง 6-10 เซนติเมตรขอบใบหยักมีขนทั้งหน้าใบและหลังใบ และหนึ่งต้นมีใบ 5-20 ใบ ลักษณะดอกออกเป็นช่อ ดอกมีสีม่วงมีขน พบที่ห้วยน้ำดัง จังหวัดเชียงใหม่

4.1.8 สัตว์ฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 8 KLP

เป็นไม้พุ่มลำต้นสูง 26-45 เซนติเมตร มีข้อปล้องและ Node ลำต้นสีเขียวมีขน ใบมีขนอ่อนนุ่ม และสากเล็กน้อย ใบมีสีเขียว เรียงแบบตรงข้าม และหนึ่งต้นมีใบ 5-20 ใบ ขอบใบหยัก ลำต้นมีขน บริเวณช่อดอกมีขนอ่อนสีขาว ออกดอกเป็นช่อ และกลีบดอกมีสีม่วง พบที่อุทยานแห่งชาติขุนตาล จังหวัดลำปาง

4.1.9 สัตว์ฐานวิทยาของ *Strobilanthes* sp. 9 PCM

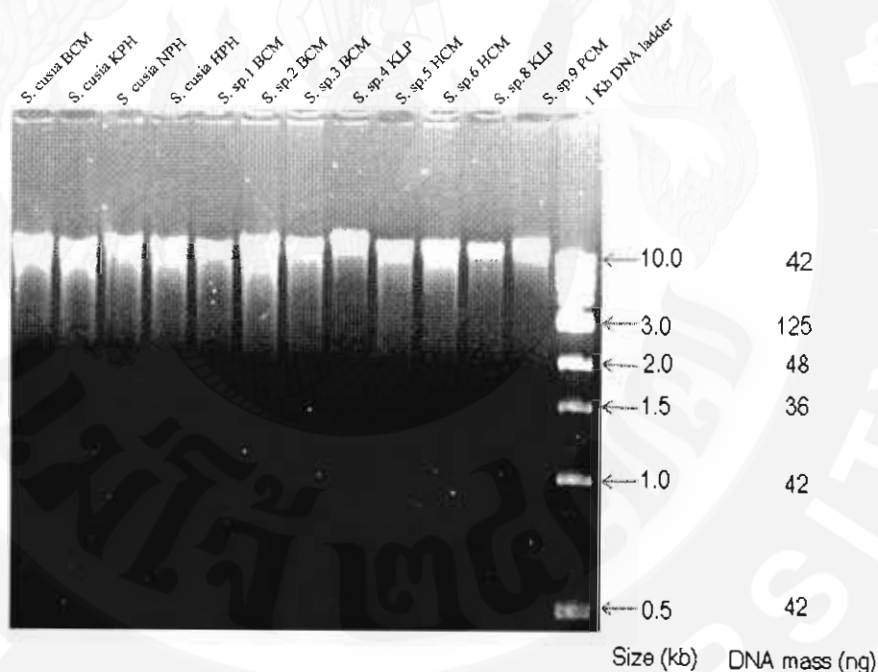
มีลักษณะเป็นไม้พุ่มลำต้นสูง 26-45 เซนติเมตร มีข้อปล้องและ Node ลำต้นสีเขียวมีขน ลักษณะของใบเป็นพืชใบเลี้ยงคู่และใบมีการเรียงตัวเพียงใบเดียวและเรียงตัวตรงข้ามไม่พบหูใบมีลักษณะใบเป็นทรงกลมปลายใบแหลมโคนใบเป็นเรียวยาวก้านใบยาว 11 เซนติเมตร หรือมากกว่าเส้นกลางใบ ยาว 1-5 เซนติเมตร เส้นแขนงที่ใบมี 1-7 แขนงใบกว้าง 6-10 เซนติเมตรขอบใบหยักมีขนทั้งหน้าใบและหลังใบ และ หนึ่งต้นมีใบ 5-20 ใบ ลักษณะดอกออกเป็นช่อ ดอกมีสีม่วงมีขน พบที่โครงการหลวงผามอนล่อง จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของพืชสกุลห่อหมกชนิดต่างๆ (ก.) *S. cusia* BCM, KPH, NPH, HPH (ข.) *S. sp.1* BCM, (ค.) *S. sp.2* BCM, (ง.) *S. sp.3* BCM, (จ.) *S. sp.4* KLP, (ฉ.) *S. sp.5* HCM, (ซ.) *S. sp.6* HCM และ *S. sp. 8* KLP (ซ.) *S. sp.9* PCM

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชสกุลส้ม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป

จากการสกัดดีเอ็นเอออกจากใบพืชสกุลส้มน้ำหนัก 0.03 กรัม ของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง คือ *S. cusia* BCM, KPH, NPH, HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6* HCM, *S. sp.8* KLP และ *S. sp.9* PCM เมื่อตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel และย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide พบลักษณะของแถบดีเอ็นเอมีลักษณะสมบูรณ์ ไม่การฉีกขาดของสายดีเอ็นเอ และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล คือประมาณ 10 กิโลเบส เมื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.2) ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Plant Genomic DNA Mini Kits มีปริมาณเพียงพอต่อการเป็นแม่แบบในการนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของพืชสกุลส้มด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี



รูปที่ 4.2 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

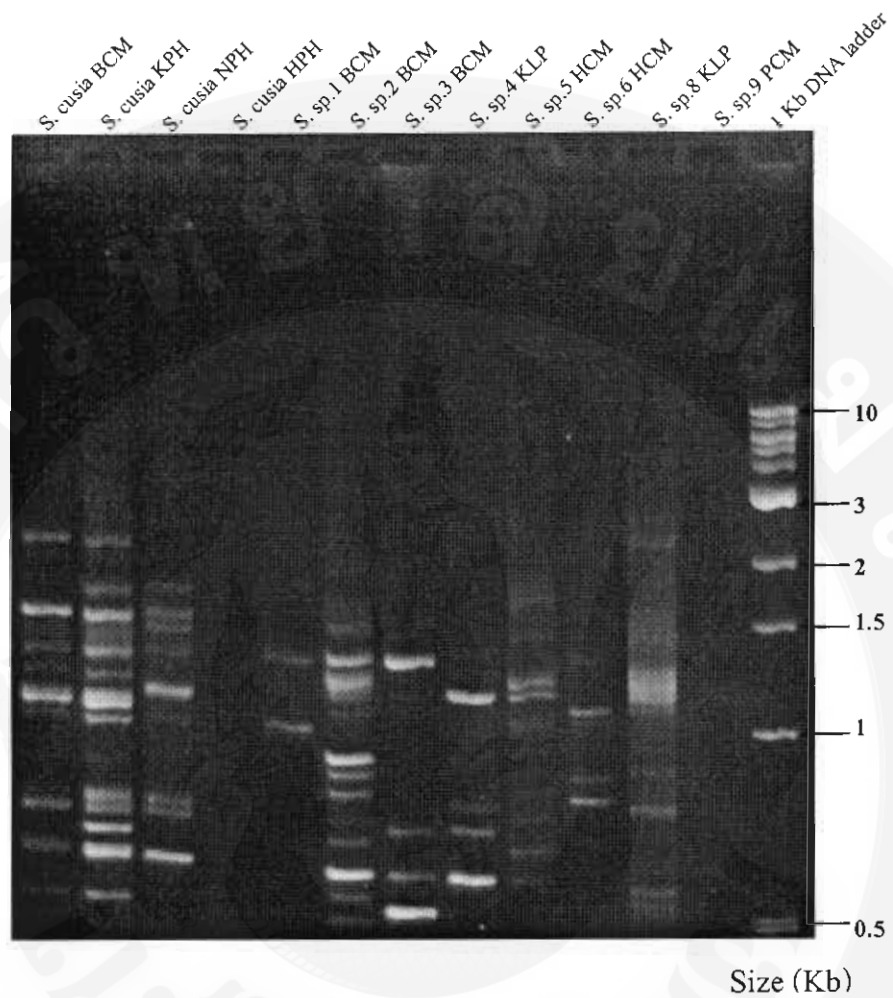
4.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มด้วยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 13 เส้น คือ KBC-09, KPA-03, KPA-05, KPA-16, KPA-20, KPB-10, KPB-11, KPB-12, KPJ-12, KPJ-13, KPJ-20, KPW-03, KPW-09 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง คือ *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH, *S. cusia* HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6*

HCM, S. sp.8 KLP และ S. sp.9 PCM ด้วยปฏิกิริยาอาร์เอพีดีตามวิธีการของ William *et al.* (1990) เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมจากการตรวจสอบผลด้วย 1.5% (w/v) agarose gel และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบไรด์ พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 6 เส้น คือ KBC-09, KPA-05, KPA-16, KPA-20, KPB-10, KPJ-20 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไม่เป็นเบสคู่สมและไม่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุลฮ่อม และมีไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น คือไพรเมอร์ KPA-03, KPB-11, KPB-12, KPJ-12, KPJ-13, KPW-03 และ KPW-09 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ ซึ่งไพรเมอร์แต่ละเส้นให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอและขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไป โดยให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 12-27 ชิ้น คือ ไพรเมอร์ KPA-03 ให้จำนวนชิ้น ดีเอ็นเอ 19 ชิ้น มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 933-3090 คู่เบส ไพรเมอร์ KPB-11 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 19 ชิ้น มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 562-10000 คู่เบส ไพรเมอร์ KPB-12 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 25 ชิ้น มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 562-8000 คู่เบส ไพรเมอร์ KPJ-12 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 12 ชิ้น มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-3020 คู่เบส ไพรเมอร์ KPJ-13 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 20 ชิ้น มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 501-3162 คู่เบส ไพรเมอร์ KPW-03 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 18 ชิ้น มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 524-2692 คู่เบสและไพรเมอร์ KPW-09 ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 18 ชิ้น มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-3090 คู่เบส ซึ่งไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 131 ชิ้น เฉลี่ย 18.71 ชิ้น/ไพรเมอร์ และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500-10000 คู่เบส ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของพืชสกุลฮ่อม จำนวน 12 ตัวอย่าง

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์(5'ไป 3')	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ	ขนาดโมเลกุล
1	KPA-03	AGT CAG CCA C	19	933-3090
2	KPB-11	GTA GAC CCG T	19	562-10000
3	KPB-12	CCT TGA CGC A	25	562-8000
4	KPJ-12	GTC CCG TGG T	12	500-3020
5	KPJ-13	CCA CAC TAC C	20	501-3162
6	KPW03	GTC CGG AGT G	18	524-2692
7	KPW-09	GTG ACC GAG T	18	500-3090



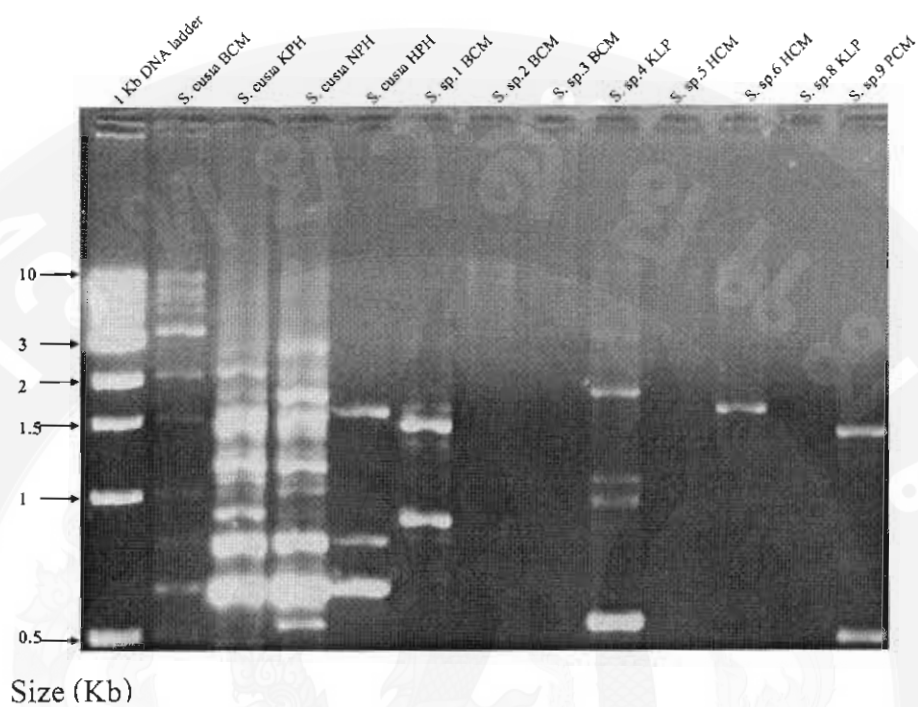
รูปที่ 4.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPA-03 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

ตารางที่ 4.2 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอ็นเอตามภาพที่ 4.3

ชั้นที่	ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอ็นเอ (คู่เบส)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	3090	3090	-	-	-	-	-	-	-	-	3090	-
2	-	2570	2570	-	-	-	-	-	2570	-	-	-
3	2512	2512	2512	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	2456	2456	-	-	2456	-	-	-	-	2456	-
5	2344	2344	2344	-	2344	2344	2344	-	-	-	2344	-
6	-	2239	-	-	-	2239	-	-	2239	-	2399	-
7	1950	1950	1950	-	-	1950	-	1950	1950	-	1950	-
8	-	1778	-	-	-	-	-	-	-	1778	1778	-
9	-	1660	-	-	1660	-	-	-	1660	1660	-	-
10	-	-	-	-	-	1514	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	1445	-	-	-	1445	1445	-
12	-	1380	-	-	-	1380	-	-	-	1380	-	-
13	1318	1318	1318	-	-	-	-	-	-	-	1318	-
14	-	1230	-	-	-	-	-	1230	1230	-	-	-
15	1175	-	-	-	-	1175	-	-	1175	-	-	-
16	-	1148	1148	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	1047	1047	1047	-	-	-	-
18	-	977	-	-	-	977	-	-	-	-	977	-
19	-	-	-	-	-	933	933	-	-	-	933	-

ตารางที่ 4.3 การแปลงซินติเอ็นเอตารางที่ 4.2 เป็นตัวเลข 0 และ 1

ชั้นที่	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของซินติเอ็นเอ (0)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
5	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
6	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
7	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0
8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
12	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
13	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
14	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
15	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
16	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
19	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0

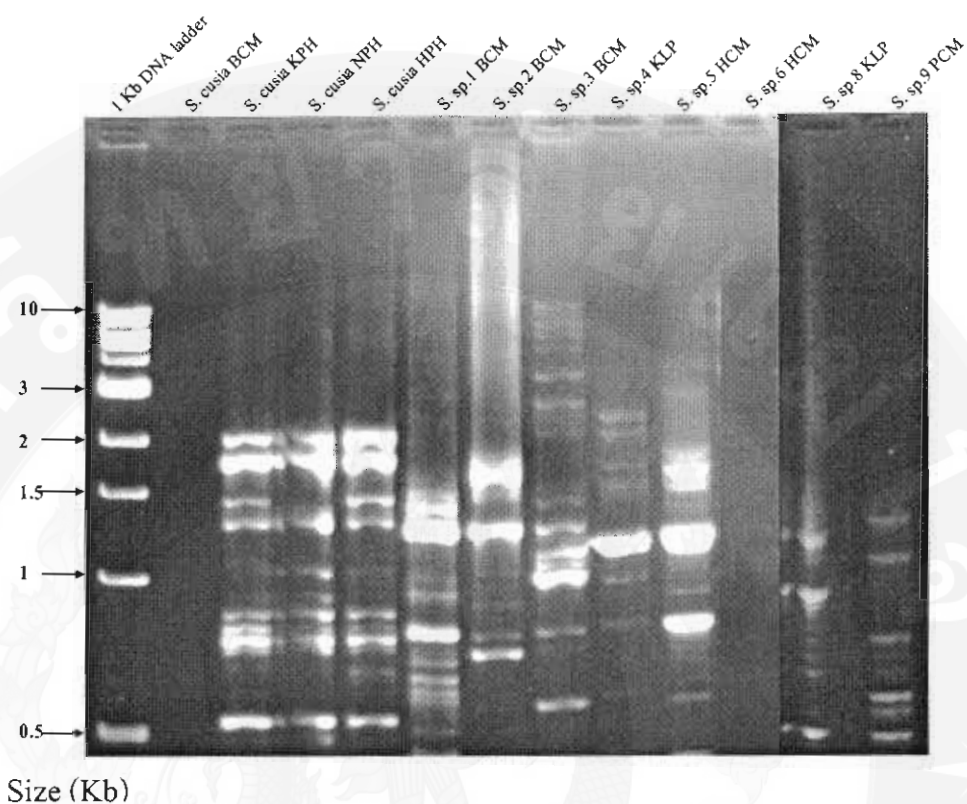


รูปที่ 4.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPB-11 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

ชั้นที่	ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอนเอ (คู่เบส)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	10000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	8000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	6000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	4000	-	-	-	-	-	-	4000	-	-	-	-
6	-	-	3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	2630	2630	2630	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	2000	-	-	-	-
9	-	1258	1258	-	-	-	-	-	1258	-	-	-
10	-	1174	1174	1174	1174	-	-	-	-	-	-	-
11	-	1071	1071	-	1071	-	-	-	-	-	-	1071
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	1348	1348	-	1348	-	-	-	-	-	-	-
14	-	1122	1122	-	-	-	-	1122	-	-	-	-
15	-	1047	1047	-	-	-	-	1047	-	-	-	-
16	-	870	-	-	870	-	-	-	-	-	-	-
17	-	831	831	831	-	-	-	-	-	-	-	-
18	676	676	676	676	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	562	-	-	-	-	562	-	-	-	562

ตารางที่ 4.5 การแปลงซินติเอนเอตารางที่ 4.4 เป็นตัวเลข 0 และ 1

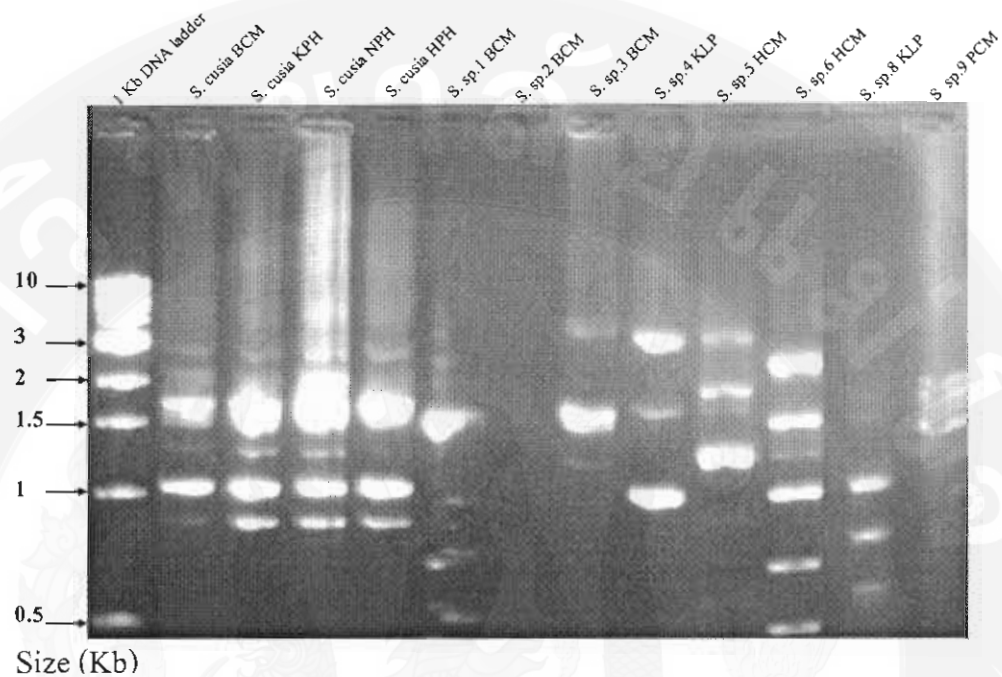
ชั้นที่	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของซินติเอนเอ (0)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
10	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
11	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
12	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
13	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
14	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
17	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
18	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1



รูปที่ 4.5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPB-12
ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

ตารางที่ 4.7 การแปลงชนิดเอ็นเอตารางที่ 4.6 เป็นตัวเลข 0 และ 1

ชนิด	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของชนิดเอ็นเอ (0)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.8</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
8	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
11	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
12	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
14	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
15	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
16	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
18	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
19	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
24	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
25	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1

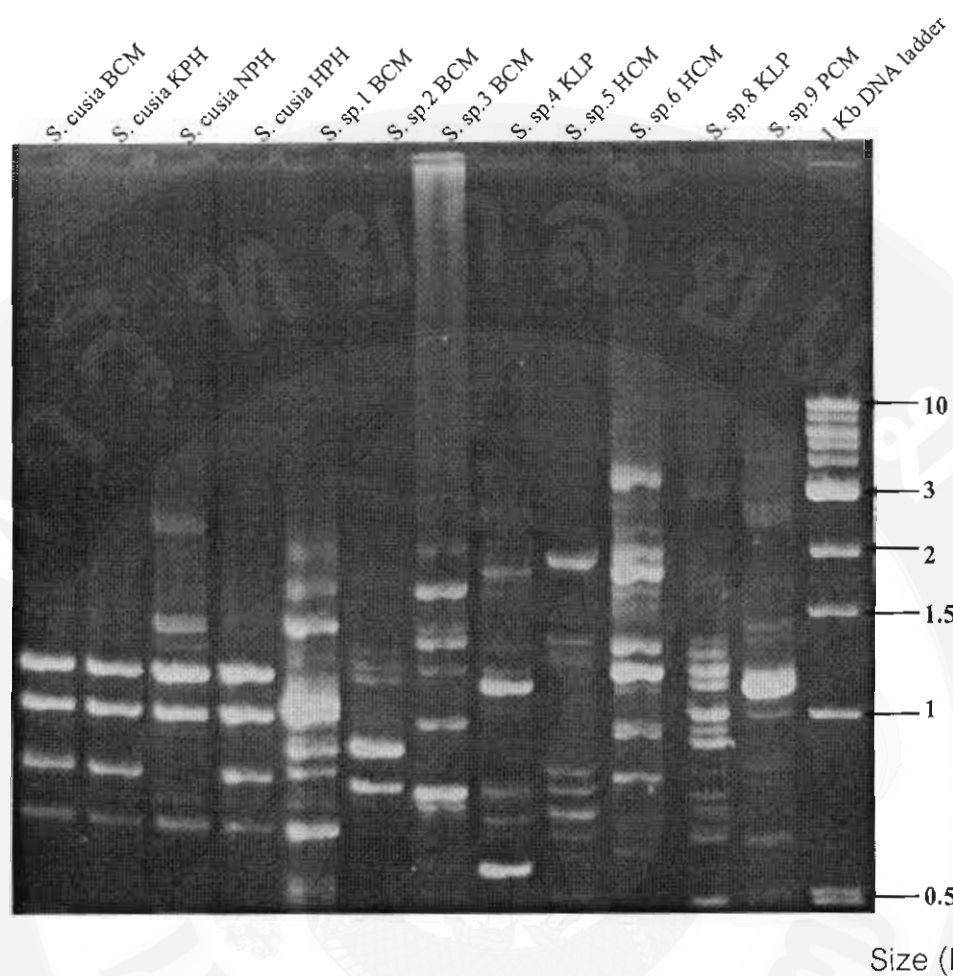


รูปที่ 4.6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPJ-12
 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

ชั้นที่	ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอนเอ (คู่เบส)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	S. sp.1 BCM	S. sp.2 BCM	S. sp.3 BCM	S. sp.4 KLP	S. sp.5 HCM	S. sp.6 HCM	S. sp.8 KLP	S. sp.9 PCM
1	-	-	-	-	-	-	3020	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	2884	2884	-	-	-
3	-	-	-	2512	-	-	-	-	-	2512	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	2090	-	-	-
5	1545	1545	1545	1545	1545	-	1545	1545	-	1545	-	-
6	-	1349	1349	-	-	-	-	-	1349	-	-	-
7	-	1000	1000	1000	-	-	-	1000	-	1000	1000	-
8	955	955	955	955	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	776	-
10	-	-	-	-	661	-	-	-	-	661	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	575	-
12	-	-	-	-	500	-	-	-	-	500	-	-

ตารางที่ 4.9 การแปลงซินติเอนเอตารางที่ 4.8 เป็นตัวเลข 0 และ 1

ชั้นที่	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของซินติเอนเอ (0)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	S. sp.1 BCM	S. sp.2 BCM	S. sp.3 BCM	S. sp.4 KLP	S. sp.5 HCM	S. sp.6 HCM	S. sp.8 KLP	S. sp.9 PCM
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
6	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
8	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0



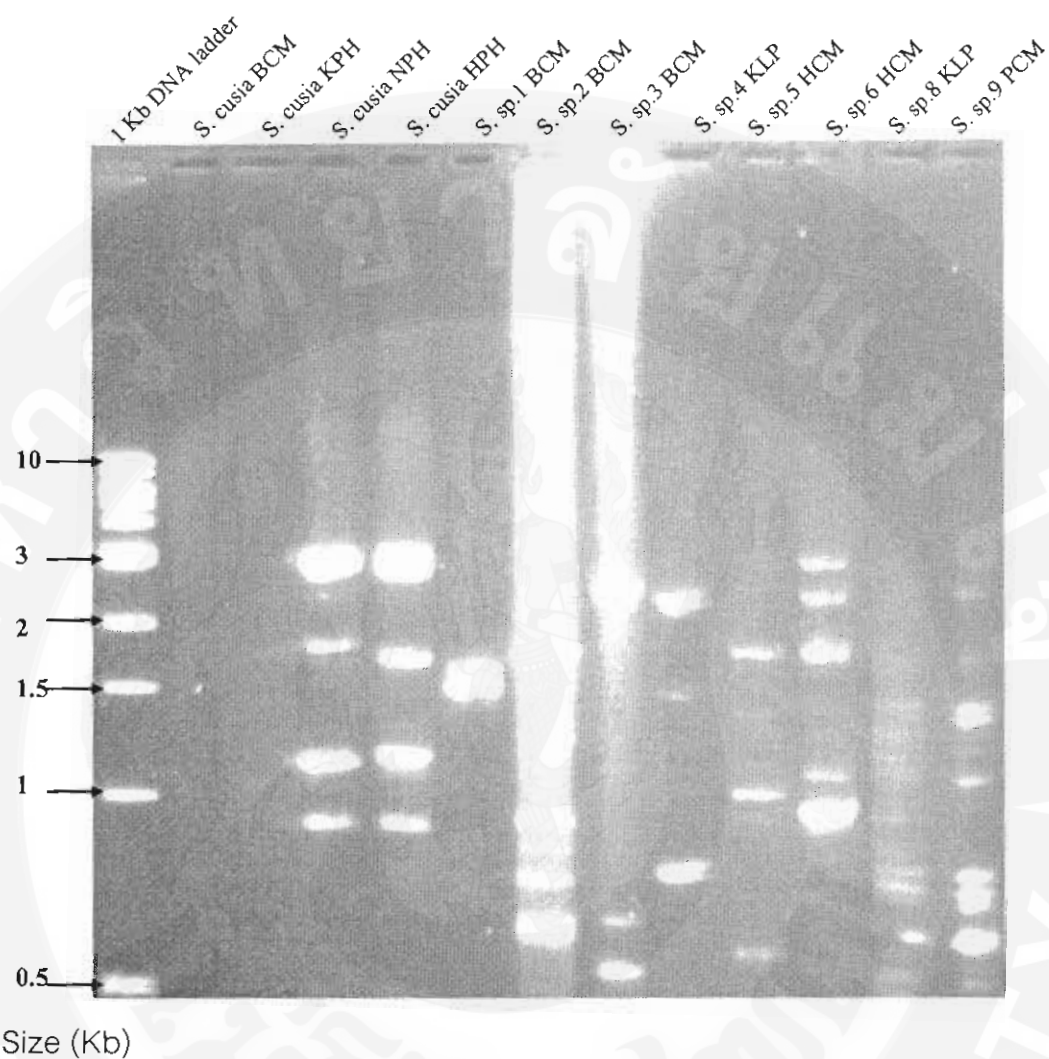
รูปที่ 4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPJ-13 ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

ตารางที่ 4.10 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอนตามภาพที่ 4.7

ชั้นที่	ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอนเอ (คู่เบส)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3162	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	2692	-	-	-	-
3	-	-	2570	-	-	-	-	-	-	2570	-	2270
4	-	-	-	-	2455	-	2455	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	2344	2344	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	1738	-	1738	-	-
7	-	-	-	-	1660	-	1660	-	-	1660	-	-
8	-	-	1585	-	1585	-	1585	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	1516	-	1516	1516	1516	-
10	1318	1318	1318	1318	-	1318	1318	-	-	1318	1318	-
11	-	-	-	-	-	-	-	1202	-	1202	1202	1202
12	1047	1047	1047	1047	1047	-	-	-	-	-	1047	1047
13	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	1000	-	-
14	-	-	-	-	870	870	-	-	-	-	870	-
15	813	813	-	813	813	-	-	813	813	813	-	-
16	-	-	-	-	776	776	776	776	776	-	-	-
17	661	661	661	-	-	-	-	661	661	-	661	-
18	-	-	-	-	603	-	-	-	-	-	603	603
19	-	-	-	-	-	-	-	525	-	-	-	-
20	-	-	-	-	501	-	-	-	501	-	501	-

ตารางที่ 4.11 การแปลงขึ้นดีเอ็นเอตารางที่ 4.10 เป็นตัวเลข 0 และ 1

ชั้นที่	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของขึ้นดีเอ็นเอ (0)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
4	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
7	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
8	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
10	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
12	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
14	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
15	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
16	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
17	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
18	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
19	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0



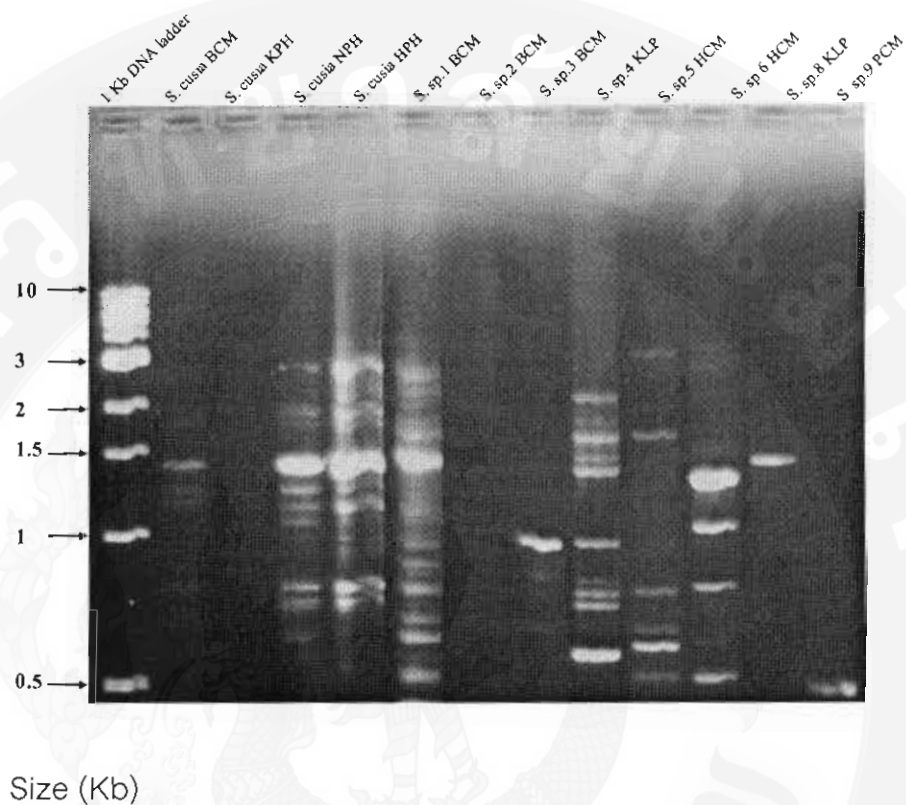
รูปที่ 4.8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPW-03 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

ตารางที่ 4.12 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชนิดเอ็นเอตามภาพที่ 4.8

ชั้นที่	ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชนิดเอ็นเอ (คู่เบส)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	-	-	2692	2692	-	-	-	-	-	2692	-	-
2	-	-	-	-	-	-	2511	2511	-	2511	-	2511
3	-	-	1862	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	1778	-	1778	-	-	1778	1778	-	-
5	-	-	-	-	1500	-	-	1500	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1318	1318
7	-	-	-	-	-	1258	-	-	-	-	-	1258
8	-	-	1122	1122	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1047	-	1047
10	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
11	-	-	891	891	-	891	-	-	-	891	-	-
12	-	-	-	-	-	794	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	758	-	758	-	-	758	758
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	707
15	-	-	-	-	-	-	660	-	-	-	-	660
16	-	-	-	-	-	630	-	-	-	-	630	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	562	-	-	562
18	-	-	-	-	-	-	524	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.13 การแปลงชนิดเอ็นเอตารางที่ 4.12 เป็นตัวเลข 0 และ 1

ชั้นที่	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของชนิดเอ็นเอ (0)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
5	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
8	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
18	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0



รูปที่ 4.9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ KPW-09 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

ตารางที่ 4.14 จำนวนและขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอนเอตามภาพที่ 4.9

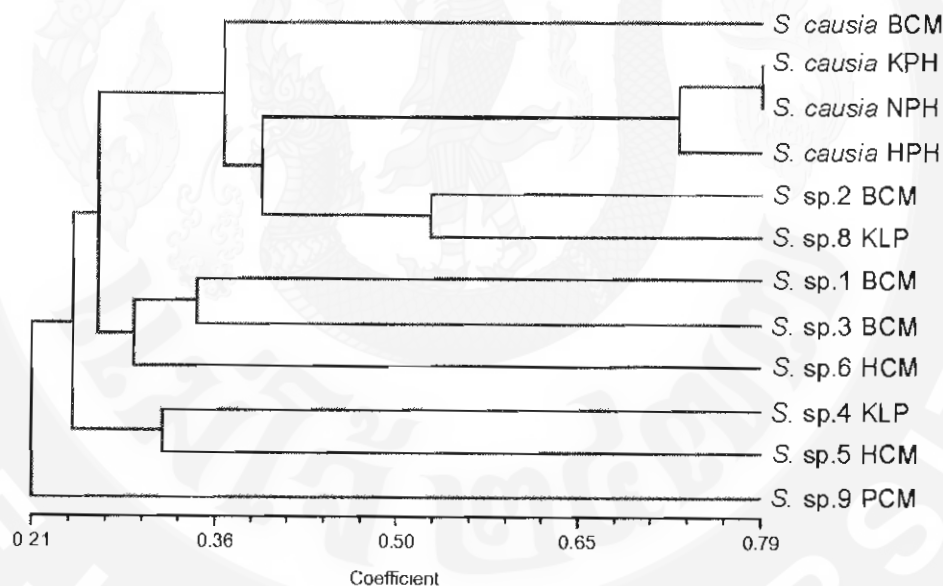
ซินติ	ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของซินติเอนเอ (คู่เบส)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	-	-	-	-	-	-	-	-	3090	-	-	-
2	-	-	2570	2570	2570	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	2399	2399	-	-	2399	-	-	-	-
4	-	-	-	1820	1820	-	-	1820	1820	-	-	-
5	1549	-	1549	1549	1549	-	-	1549	-	-	1549	-
6	-	-	1413	1413	-	-	-	-	-	1413	-	-
7	-	-	1318	1318	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	1148	1148	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	1000	1000	-	1000	1000	-	-	-	-
10	-	-	-	-	933	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	912	912	912	-	-	912	912	912	-	-
12	-	-	708	708	-	-	-	708	-	-	-	-
13	-	-	-	-	661	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	603	-	-	-	603	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	589	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	575	-	-	-	-
17	-	-	-	-	501	-	-	-	501	507	-	-

ตารางที่ 4.15 การแปลงซินติเอนเอตารางที่ 4.14 เป็นตัวเลข 0 และ 1

ซินติ	การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของซินติเอนเอ (0)											
	<i>S. cusia</i> BCM	<i>S. cusia</i> KPH	<i>S. cusia</i> NPH	<i>S. cusia</i> HPH	<i>S. sp.1</i> BCM	<i>S. sp.2</i> BCM	<i>S. sp.3</i> BCM	<i>S. sp.4</i> KLP	<i>S. sp.5</i> HCM	<i>S. sp.6</i> HCM	<i>S. sp.8</i> KLP	<i>S. sp.9</i> PCM
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
5	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0
6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
7	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
12	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
17	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0

4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลฮ่อม

จากการนำขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น มาแปลงเป็นข้อมูลค่าคะแนน 0 และ 1 มาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชสกุลฮ่อมจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยวิธี UPGMA ของ Dice ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYpc version 2.10X ได้เดนโดแกรมที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมประมาณ 0.30 สามารถแบ่งพืชสกุลฮ่อมออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH และ *S. cusia* HPH ซึ่งเป็นพืชชนิดเดียวกันและมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน และในกลุ่มนี้ยังประกอบด้วยฮ่อมชนิด *S. sp.2* BCM และ *S. sp.8* KLP กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยฮ่อมชนิด *S. sp.1* BCM, *S. sp.3* BCM และ *S. sp.6*, กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยฮ่อมชนิด *S. sp.4* KLP และ *S. sp.5* HCM และ กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 1 ชนิด คือ *S. sp.9* PCM (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลฮ่อมจำนวน 12 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYpc version 2.10X

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชสกุลส้ม

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลสัณฐานวิทยาของพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH, *S. cusia* HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6* HCM, *S. sp.8* KLP และ *S. sp.9* PCM โดยสัณฐานวิทยาของพืชสกุลส้มโดยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรงสูงประมาณ 50 - 100 เซนติเมตร มีกิ่งก้านสาขา ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงกันข้าม มีรูปร่างรี ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยละเอียด ดอกออกเป็นช่อที่ซอกใบมีดอกย่อยหลายดอกสีดอกมีทั้งสีขาว สีม่วงและสีขาวแกมม่วง ซึ่งสอดคล้องกัน (Bennett *et al.*, 2551) ว่าความหลากหลายทางตรงกับรายงานของ (อรุณรัตน์, 2547) ว่าปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมีบทบาทสำคัญที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกพืช และบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชได้ จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันและมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน อย่างไรก็ตาม นันทวรรณ (2550) ได้กล่าวว่าปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมและสัณฐานวิทยาไม่ได้ มีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรม เพราะพันธุกรรมมีสภาพความคงตัวสูง จึงส่งผลให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ดังนั้นการศึกษาดีเอ็นเอจึงสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ดีที่สุด

จากผลการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าลักษณะของพืชสกุลส้มที่แตกต่างกันไปนั้น ขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง มีสภาพอากาศ และ สภาพแวดล้อมที่พืชอาศัยอยู่แตกต่างกัน หรืออาจมีการกลายพันธุ์หรือเกิดการผสมข้ามชนิดหรือสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะเป็นการปรับตัวของพืชสกุลส้มให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในบริเวณนั้นจึงก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ทางด้านลักษณะภายนอก หรืออาจเป็นไปได้ว่าเป็นส้มสายพันธุ์เดียวกัน แต่ลักษณะภายในยังคงเดิม เหมือน ว่าความหลากหลายทางต้นสัณฐานวิทยาขึ้นอยู่กับพื้นที่และธรรมชาติที่อยู่บริเวณนั้นจะทำให้เกิดความแตกต่างทางสายพันธุ์ และก็ได้กล่าวอีกว่าปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมีบทบาทสำคัญที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกพืช และบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชได้

5.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชสกุลส้ม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชสกุลส้มจำนวน 12 ตัวอย่าง คือ *S. cusia* BCM, KPH, NPH, HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6* HCM, *S. sp.8* KLP และ *S. sp.9* PCM พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนมีลักษณะที่สมบูรณ์ และมี

คุณภาพ โดยให้ขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูง คือ ประมาณ 10 กิโลเบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วมีปริมาณดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างที่สกัดได้มีผลใกล้เคียงกันประมาณ 125 นาโนกรัม เนื่องจากมีความเข้มข้นและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน และเนื้อเยื่อพืชที่นำมาสกัดดีเอ็นเอในครั้งนี้นี้ยังมีอายุน้อย ทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมาก และดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะของดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ สิ่งจำเป็นที่ควรคำนึงถึงในการสกัดดีเอ็นเอ คือ อายุของเนื้อเยื่อตัวอย่างพืชที่นำมาสกัด ควรใช้ใบอ่อนที่มีอายุน้อย และอยู่ในระยะการเจริญเติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อยประกอบด้วยเซลล์ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นสูง มีจำนวนเซลล์มาก และมีการสะสมของสารประกอบพวกโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกอยู่ น้อย ทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากและคุณภาพดี (Shaw, 1988; Staub *et al.*, 1996)

5.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มด้วยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

จากผลการทดลองไพรเมอร์จำนวน 13 เส้น คือไพรเมอร์ KPA-03, KPA-05, KPB-10, KPB-11, KPB-12, KPJ-11, KPJ-12, KPJ-13, KPJ-20, KPW-03 และ KPW-09 พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 6 เส้น คือ KBC-09, KPA-05, KPA-16, KPA-20, KPB-10 และ KPJ-20 ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เพราะลำดับเบสของไพรเมอร์ไม่เป็นเบสคู่สมกับลำดับเบสในจีโนมของพืชสกุลส้ม ส่วนไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น คือไพรเมอร์ KPA-03, KPB-11, KPB-12, KPJ-12, KPJ-13, KPW-03 และ KPW-09 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มได้จำนวนขึ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 131 ขึ้น เฉลี่ย 18.71 ขึ้น/ไพรเมอร์ และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของขึ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500-10000 คู่เบส แสดงว่าไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น มีตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สมกับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในพืชสกุลส้มประมาณ 131 ตำแหน่ง มีตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สม (complementary) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในจีโนมของพืชสกุลส้ม ทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับตำแหน่งของเบสบนสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ใน 2 ทิศทางตรงข้ามกัน จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นมา (Tengy and Tufo, 1993, Waugh and Powell, 1992) นอกจากนี้ Tengy and Tufo (1993) และ Yu และคณะ (1993) ที่กล่าวไว้ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นมาจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี จะมีจำนวนขึ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มแต่ละไพรเมอร์จะให้แบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเนื่องจากพืชสกุลส้มแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละชนิดที่แตกต่างกันไป และขนาดน้ำหนักโมเลกุลของขึ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเทคนิคอาร์เอพีดีจะถูกจำกัดขนาดด้วยสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ นอกจากนี้การแยกขนาดขึ้นดีเอ็นเอด้วยเจลต่างชนิดกันยังให้จำนวนและขนาดของขึ้นดีเอ็นเอต่างกันด้วย ถ้าแยกขึ้นดีเอ็น

เอด้วย agarose gel จะได้ชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 1-10 ชิ้น/ไพรเมอร์ ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 100-3,000 คู่เบส แต่ถ้าแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel จะได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวนมากกว่า คือ อยู่ระหว่าง 40-100 ชิ้น ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 6-1,000 คู่เบส

โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิคอาร์เอพีดีซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบน้อย Yu และคณะ (1933) รายงานว่าปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดีจะมีผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นมา ถ้ามีปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบน้อยเกินไปทำให้เกิดความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอน้อย และ อาจมีชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นหายไป ส่วนการใช้ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่มากเกินไปจะลดประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ทำให้มีชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นหายไป และ ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดียังขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนมพืชที่ใช้ศึกษา นอกจากดีเอ็นเอแม่แบบจะมีผลโดยตรงต่อจำนวนและความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอ สารละลายอื่นๆ ที่เป็นส่วนประกอบในปฏิกิริยาอาร์เอพีดีเช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase, ความเข้มข้นของ dNTP, ความเข้มข้นของ $MgCl_2$, เปรอร์เซ็นต์เบส G และ C ของไพรเมอร์ และ สภาพของอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ก็มีผลต่อจำนวนและความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอเช่นกัน (Jones and Sutton, 1997, Yu *et al.*, 1933) ซึ่ง Staub และคณะ (1996) รายงานว่าสารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี เช่น สารละลาย 10x PCR buffer ถ้ามีปริมาณมากเกินไป จะมีผลต่อการจับสายดีเอ็นเอแม่แบบของไพรเมอร์ ส่วนสารละลาย $MgCl_2$ ซึ่งประกอบด้วย ไอออนของ Mg จะมีผลต่อความเข้มข้นของชิ้นดีเอ็นเอ

5.4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลฮ่อม

เดนโดรแกรมของพืชสกุลฮ่อมที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมประมาณ 0.30 สามารถแบ่งพืชสกุลฮ่อมเป็น 4 กลุ่ม คือ คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH และ *S. cusia* HPH ซึ่งเป็นพืชชนิดเดียวกันและมีพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน และในกลุ่มนี้ยังประกอบด้วยฮ่อมชนิด *S. sp.2* BCM และ *S. sp.8* KLP กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยฮ่อมชนิด *S. sp.1* BCM, *S. sp.3* BCM และ *S. sp.6*, กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยฮ่อมชนิด *S. sp.4* KLP และ *S. sp.5* HCM และ กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 1 ชนิด คือ *S. sp.9* PCM ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าฮ่อมทั้ง 12 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงในลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ แสดงว่าพืชสกุลฮ่อมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง แต่ในขณะที่กลุ่มที่ 1 ที่ประกอบด้วยชนิด *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH และ *S. cusia* HPH ซึ่งเป็นพืชสกุลฮ่อมที่เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งก็พบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน

เนื่องจากถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูง โดย Wetton และคณะ (1987) รายงานว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตจะมีค่าตั้งแต่ 0-1 ซึ่งถ้ามีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าสายพันธุ์ที่ศึกษาไม่มีชั้นดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันเลย บ่งชี้ว่าจีโนมมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันมาก แต่เมื่อมีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่ามีชั้นดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน บ่งชี้ว่าจีโนมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันมาก Bohn และคณะ (1999) รายงานว่าการประเมินค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมประเมินจากจำนวนชั้นดีเอ็นเอที่ปรากฏซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่ได้บ่งบอกการมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ และตำแหน่งยีนที่เหมือนกันในจีโนมของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ทวรณ (2550) ยังได้กล่าวว่าปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมและฐานฐานวิทยาไม่ได้ มีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรม เพราะพันธุกรรมมีสภาพความคงตัวสูง จึงส่งผลให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ดังนั้นการศึกษาดีเอ็นเอจึงสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ดีที่สุด

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลฮ่อม

จากการเก็บรวบรวมข้อมูลสัณฐานวิทยาของพืชสกุลฮ่อมจำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH, *S. cusia* HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6* HCM, *S. sp.8* KLP และ *S. sp.9* PCM โดยสัณฐานวิทยาของพืชสกุลฮ่อมโดยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรงสูงประมาณ 50 - 100 เซนติเมตร มีกิ่งก้านสาขา ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงกันข้าม มีรูปร่างรี ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยละเอียด ดอกออกเป็นช่อที่ซอกใบมีดอกย่อยหลายดอกสีดอกมีทั้งสีขาว สีม่วงและสีขาวแกมม่วง

6.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชสกุลฮ่อม ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป

จากการสกัดดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมจำนวน 12 ตัวอย่าง คือ *S. cusia* BCM, KPH, NPH, HPH, *S. sp.1* BCM, *S. sp.2* BCM, *S. sp.3* BCM, *S. sp.4* KLP, *S. sp.5* HCM, *S. sp.6* HCM, *S. sp.8* KLP และ *S. sp.9* PCM พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนมีลักษณะที่สมบูรณ์ และมีคุณภาพ โดยให้ขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูง คือ ประมาณ 10 กิโลเบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานแล้วมีปริมาณดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างที่สกัดได้มีผลใกล้เคียงกันประมาณ 125 นาโนกรัม เนื่องจากมีความเข้มข้นและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน

6.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากผลการทดลองไพรเมอร์จำนวน 13 เส้น คือไพรเมอร์ KPA-03, KPA-05, KPB-10, KPB-11, KPB-12, KPJ-11, KPJ-12, KPJ-13, KPJ-20, KPW-03 และ KPW-09 พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 6 เส้น คือ KBC-09, KPA-05, KPA-16, KPA-20, KPB-10 และ KPJ-20 ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เพราะลำดับเบสของไพรเมอร์ไม่เป็นเบสคู่สมกับลำดับเบสในจีโนมของพืชสกุลฮ่อม ส่วนไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น คือไพรเมอร์ KPA-03, KPB-11, KPB-12, KPJ-12, KPJ-13, KPW-03 และ KPW-09 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลฮ่อมได้จำนวนขึ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 131 ขึ้นเฉลี่ย 18.71 ขึ้น/ไพรเมอร์ และมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของขึ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 500-10000 คู่เบส แสดงว่าไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น มีตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สมกับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในพืชสกุลฮ่อมประมาณ 131 ตำแหน่ง และให้แบบแผนของขึ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปตามชนิดของพืชสกุลฮ่อม และไพรเมอร์จำนวน 7 เส้น นั้นมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สมกับ

นิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในจีโนมของพืชสกุลส้มอยู่ระหว่าง 12-25 ตำแหน่งทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับตำแหน่งของเบสบนสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ใน 2 ทิศทางตรงข้ามกันจึงทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นมา

6.4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม

เดนโดรแกรมของพืชสกุลส้มที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมประมาณ 0.30 สามารถแบ่งพืชสกุลส้มเป็น 4 กลุ่ม คือ คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *S. cusia* BCM, *S. cusia* KPH, *S. cusia* NPH และ *S. cusia* HPH ซึ่งเป็นพืชชนิดเดียวกันและมีพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน และในกลุ่มนี้ยังประกอบด้วยส้มชนิด *S. sp.2* BCM และ *S. sp.8* KLP กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยส้มชนิด *S. sp.1* BCM, *S. sp.3* BCM และ *S. sp.6*, กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยส้มชนิด *S. sp.4* KLP และ *S. sp.5* HCM และ กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 1 ชนิด คือ *S. sp.9* PCM จากกลุ่มของพืชสกุลส้มที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันและมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน พืชสกุลส้มแต่ละชนิดที่ศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในแต่ละกลุ่มมีค่าต่ำ

6.5 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในเทคนิคอื่นๆ เช่น AFLP, Microsatellite เพื่อที่จะได้บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชสกุลส้มได้ดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

- กระทรวงวิทย์. 2549. (ฮ่อม)ห่อม และคราม สีมี่ชีวิต [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล:
<http://www.vcharkarn.com> (วันที่ค้นข้อมูล: 2 กันยายน 2552).
- โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช. (มปป). [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล:
http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/use/color7-03.htm (วันที่ค้นข้อมูล: 28 สิงหาคม 2552).
- เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2547. วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล (Molecular Phylogenetics) อนุกรมวิธาน ระบบวิทยา และวงศ์วานวิวัฒนาการ. จุลสารพันธุศาสตร์ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 หน้า18-23.
- เต็ม สิมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.
- นันทวรรณ คนะวาปี. 2550. เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการระบุพืชสกุล *Phyllanthus* L. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปรีชา ประเทพา. 2551. การวิจัยยีนแนวคิดและกระบวนการวิจัยในเชิงประชากร. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาสารคาม: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- วุฒิไกร. (2550). "ต้นห่อม" [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล :
http://www.212cafe.com/freeguestbook/viewcomment.php?glD=512041&user=p_hana. (วันที่ค้นข้อมูล: 28 สิงหาคม 2552).
- สารานุกรมเสรี. อเล็กโดรโฟริซิส. 2009. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล:
<http://th.wikipedia.org> (วันที่ค้นข้อมูล: 2 กันยายน 2552).
- สุรินทร์ ปิยะโชติคนากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรุณรัตน์ จีวีราช. 2547. Plant Taxonomy and Cladistics. พิมพ์ครั้งที่ 1 ขอนแก่น: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เอกพล ขำชื่น. 2551. หลักการและเทคนิคที่ใช้ใน recombinant DNA technology. คณะสหเวชศาสตร์ เทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 2. พิษณุโลก: โรงพิมพ์ตระกูลไทย.
- Allan, H.R. 1983. Systematic studies of the genus *Siphonoglossa sensu lato* (Acanthaceae).

- Ph. D. dissertation, The University of Texas at Austin.
- Bennett, R. J., Woo, R. I. J. and Scotland, W. R. 2008. Uncorrelated variation in widespread species : species delimitation in *Strobilanthes echinata* Nees (Acanthaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. 156(7): 131 -141.
- Bohn, M., Utz, F. H. and Melchinger, A. E. 1999. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. **Crop Science**. 39: 228-237. .
- Carine, M.A. and Scotlant, R.W. 2002. Classification of Strobilantheae (Acanthaceae): trying to classify the unclassifiable?. **Taxon**. 51: 259-279.
- Cunningham, William G. & Cordeiro, Paula A. 2000. *Educational Administration : A Problem-Based Approach*. Massachusetts : Allyn & Bacon.
- Ensermu, K. 1990. *Juusticia* sect. *Ansellia* (Acanthaceae). Ph. D. dissertation, Uppsala University.
- Eujay, I., Baum, M., Erskine, W., Pehu, E. and Muehlbauer, F. J. 1997. The use of RAPD markers for lentil genetic mapping and the evaluation of distorted F₂ segregation. **Euphytica**. 96: 405-412.
- Ford, R. and Taylor, P. W. J. 2003. Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Len culinaris* ssp. *culinaris*). **Theoretical and Applied Genetics**. 107: 910-916.
- Galgaro, L., Lopes, C. R., Gimenes, M., Valls, J. F. M. and Kochert, G. 1998. Genetic variation between several species of section *Extranervosae*, *Caulorrhizae*, *Heteranthae*, and *Triseminatae* (genus *Arachis*) estimated by DNA polymorphism. **Genome**. 41: 445-454.
- Garcia, G. M., Stalker, H. T. and Kochert, G. 1995. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. **Genome**. 38: 166-176.
- Garcia, G. M., Stalker, H. T., Shroeder, E. and Kochert, G. 1996. Identification of RAPD, SCAR, RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. **Genome**. 39: 836-845.

- Gimenes, M. A., Lopes, C. R. and Valls, F. M. 2002. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. **Genetics and Molecular Biology**. 25: 349-353.
- Harvey, M. and Botha, F. C. 1996. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. **Euphytica**. 89: 257-265.
- Hashizume, T., Shimamoto, I., Harushima, Y., Yui, M., Sato, T., Imai, T. and Hirai, M. 1996. Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Euphytica**. 90: 265-273.
- Ismail, M., Manickam, E., Danial, A.M., Rahmat, A. and Yahaya, A. 2000. Chemical composition and antioxidant activity of *Strobilanthes crispus* leaf extract. **Journal Nutrition Biochemistry**. 11: 536-542.
- Jones, P. G. and Sutton, J. M. 1997. **Plant Molecular Biology: essential techniques**. John Wiley & Sons, Guildford.
- Li, Z. and Nelson, R. L. 2002. RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accessions from four Chinese provinces. **Crop Science**. 42: 1737-1744.
- Li, L., Liang, H.Q., Liao, S.X., Qiao, C.Z., Yang, G.J. and Dong, T.Y. 1993. Chemical studies of *Strobilanthes cusia*. **Acta Pharmaceutica Sinica**. 28(3): 238-240.
- Liau, B.C., Jong, T.T., Lee, M.R. and Chen, S.S. 2006. LC-APCI-MS method for detection and analysis of tryptanthrin, indigo, and indirubin in Daqingye and Banlangen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. In press.
- Mariette, M. 1996. *Phaulopsis* (Acanthaceae) : A monograph. Ph. D. dissertation, Uppsala University.
- Mcdade, L.A. and Moody, M.L. 1999. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding trnL-trnF Chloroplast DNA sequences. **American Journal of Botany**. 86(1): 70-80.
- Meister, J., Hubaishan, M.A., Kilian, N. and Oberprieler, C. 2005. Chloroplast DNA variation in the shrub *Justicia areysiana* (Acanthaceae) endemic to the monsoon affected coastal mountains of the southern Arabian Peninsula.

- Botanical Journal of the Linnean Society. 148: 437-444.
- Menendez, C. M., Hall, A. E. and Gepts, P. 1997. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 1210-1217.
- Michelmore, R. W., Paran I. and Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance gene by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*. 88: 9828-9832
- Mikael Bo Christer, H. 1989. *Justicia* sect. *Harnieria* (Acanthaceae) in tropical Africa. Ph. D. dissertation, Uppsala Universitet.
- Moylan, E.C., Bennett, J.R., Carine, M.A., Olmstead, R.G. and Scotland, W. 2004. Phylogenetic relationships among *Strobilanthes* S.L. (Acanthaceae): evidence from ITS nrDNA, trnL-F cpDNA and Morphology. *American Journal of Botany*. 91(5): 724-735.
- Paran, I., Kesseli, R. and Michelmore, R. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome*. 34: 1021-1027.
- Shaw, C. H. 1988. *Plant molecular biology: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Staub, J., Bacher, J. and Poetter, K. 1996. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in Cucumber. *HortScience*. 31(2): 262-266.
- Tingey, S. V. and Tufo, J. P. D. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology*. 101: 349-352.
- Villand, J., Skroch, P. W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C. G. and Nienhuis, J. 1998. Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. *Crop Science*. 38: 1339-1347.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA

- fingerprinting. **Nucleic Acid Research**. 23: 4407-4414.
- Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. **Trends in Biotechnology**. 10: 186-191.
- Wetton, J. H., Carter, R. E., Parkin, D. T. and Walters, D. 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. **Nature**. 327: 147-149.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. 18: 7213-7218.
- Williams, J. G. K., Kublek, A. R., Livak, W. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18: 6531-6535.
- Xie, H., Wei, H., Yashikawa, M., Xia, N. and Wei, X. 2005. Benzoxazinoid glucosides from *Baphicacanthus cusia*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 33: 551-554.
- Yu, K. F., Deynze, A. V. and Pauls, K. P. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. Glick, B. R. and Thomson, J. E. (eds), pp 287-301. CRC Press, Florida.
- Yu, K. F. and Pauls, K. P. 1993. Segregation of random amplified polymorphic DNA markers and strategies for molecular mapping in tetraploid alfalfa. **Genome**. 36: 844-85



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.1 การเตรียม 1X TBE buffer

Tris-base	10.8	กรัม
boric acid	5.5	กรัม
5 M EDTA	4	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียม 10X TBE buffer

Tris-base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	40	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรนำไปนิ่งมาเพื่อที่

อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.3 การเตรียม 1.2% (w/v) agarose gel

agarose	1.2	กรัม
1X TBE	80	มิลลิลิตร

ละลาย agarose ใน 1X TBE buffer ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยไมโครเวฟ แล้วนำไปผ่านน้ำพ้ออุ่น เทลงในภาตเจลแล้วเสียบหัว 20 รอยจนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

1.4 การเตรียม 1X loading buffer

0.25% bromophenol blue	0.041	กรัม
0.25% xylene cyanol FF	0.041	กรัม
30% glycerol	500	ไมโครลิตร

ละลายสารละลายต่างๆ ตามลำดับให้เข้ากัน

1.5 การเตรียม 1M EDTA

EDTA	372.24	กรัม
------	--------	------

ชั่งสารละลาย EDTA แล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น

นำไปปรับ pH ด้วย NaOH จนได้ pH 8.0

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

โปรแกรมที่ใช้

วิธีวิเคราะห์โปรแกรม NTSYSpc21 VERSION 2

วิธีวิเคราะห์โปรแกรม NTSYSPC VERSION 2.10X

1. เข้าสู่โปรแกรม
2. เลือก File
3. Edit File
4. เลือก File งาน
 - File งานจะต้องใส่ 4 ช่อง ด้านบนเป็นเลข 1, row, Colum, missing (-999) และแถวแรกใส่เลข 1, 2,.....
5. Open
6. File ไปที่ save File as
7. Similarity
8. Qualitative data
 - ใส่ช่อง input file (double click) เลือกไฟล์งานที่ save ไว้ open ช่อง coefficient เป็น Dice ช่อง cut put file (double click) เลือกไฟล์งานที่ save ไว้เพิ่มชื่อไฟล์เป็น Dice Save
 - เลือก Compute คลิกตารางที่ว่าง
9. เลือก Clustering
 - ไปที่ SAHN ใส่ช่อง input เลือกไฟล์งาน ไปที่ open ช่อง out put tree file เพิ่มชื่อเป็น SAHN, save ช่อง In case of lies เปลี่ยนเป็น FIND ไปที่ compute
10. Graphics ไปที่Tree plot ช่อง input file เลือกไฟล์ open ไปที่ compute
11. จะได้รูปภาพการแบ่งกลุ่ม
 - open ไปที่plot option OTUS/page เลือกให้เป็นจำนวนเท่าตัวอย่าง
 - ไปที่ OK Save