



รายงานการวิจัย

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
ข้าวพื้นเมืองด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

Identification and Genetic Relationship Analysis of
Varieties Local Rice Using RAPD Technique.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2559

รหัสโครงการสัญญาเลขที่ PCRU_2559_N035

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
ข้าวพื้นเมืองด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

Identification and Genetic Relationship Analysis of
Varieties Local Rice Using RAPD Technique.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เบญจพร ศรีสุวรรณ

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดยงบประมาณแผ่นดินที่พิจารณาโดยผ่านความเห็นชอบจาก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ชื่อโครงงานวิจัย	การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ ข้าวพื้นเมืองด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี
ผู้วิจัย	สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง
ผู้ร่วมวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณาศ
สาขาวิชา	ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. 2559

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวโดยใช้เทคนิค RAPD เพื่อใช้จำแนกพันธุ์ข้าว 10 พันธุ์ สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม PhotocapMW และ SPSS จากการทดลอง พบว่า ข้าวถูกจัดกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่มมีดัชนีความเหมือนเมื่อเทียบกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อยู่ที่ 0.632 และเมื่อเทียบกลุ่มที่ 3 กับกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อยู่ที่ 0.472 และ 0.525 ตามลำดับ ซึ่งเป็นการจำแนกข้าวออกเป็นกลุ่มนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

คำสำคัญ ข้าว, พันธุกรรม, เทคนิค RAPD

Surachest Aiumsumang. 2016. Identification and Genetic Relationship Analysis of Varieties Local Rice Using RAPD Technique, Phetchabun Rajabhat University.

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the relationship of rice using RAPD technique to identify 10 rice varieties. DNA extraction by DNA extraction kits and genetic relationship analysis by RAPD technique with using random primer. The analyzing by the PhotocapMW and SPSS programs, the rice samples were grouped into 3 groups with a similarity index for group 1 and group 2 for 0.632 in respectively, and group 3 compare for group 1 and group 2 is 0.472 and 0.525, respectively. This classifies in rice groups for use in breeding.

Keywords: rice (*Oryza sativa*), Genetic, RAPD Technique.

กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่เอื้อเฟื้อวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง

1 มีนาคม 2560

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อ	ข
ภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1	บทนำ
	1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
	2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
	3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
	4. ขอบเขตของการวิจัย 2
	5. ขอบเขตระยะเวลา 2
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
	1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับข้าว 3
	2. การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล 7
	3. เครื่องหมายทางพันธุกรรม 9
	4. เทคนิคอาร์เอฟดี 11
	5. การเกิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด 15
	6. การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 15
	7. การจัดจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล 16
	8. การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA 16
	9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม 19
	10. ซิวสารสนเทศ 20
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย 22
	1. การสกัดแยกอาร์เอ็นเอ 22
	2. การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ 24
	3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 24
	4. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล 27

	5. การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)	28
บทที่ 4	ผลการวิจัย	29
	1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ	29
	2. ผลการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	31
	3. การวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	32
	4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการด้วยเทคนิค RAPD	33
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง		37
ภาคผนวก		41
	ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมี	42
	ภาคผนวก ข. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี	46
ประวัตินักวิจัย		51

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1	ส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์
ตารางที่ 3.2	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
ตารางที่ 4.1	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/μl)
ตารางที่ 4.2	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A260/A280 ของใบข้าว
ตารางที่ 4.3	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
ตารางที่ 4.4	ค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากข้อมูลเทคนิค RAPD

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	ลักษณะเมล็ดข้าวตัดตามขวาง 4
ภาพที่ 2.2	ลักษณะและส่วนประกอบต่างๆของช่อดอกข้าว 6
ภาพที่ 4.1	ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว บน agarose gel 1.0 % 31
ภาพที่ 4.2	ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์จากดีเอ็นเอข้าว บน 1.5 % agarose gel 32
ภาพที่ 4.3	แผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 10 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิค RAPD 34
ภาพที่ ผ1	เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ 47
ภาพที่ ผ2	ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK) 47
ภาพที่ ผ3	เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System) 48
ภาพที่ ผ4	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700) 48
ภาพที่ ผ5	สารละลายต้นตอที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB 49
ภาพที่ ผ6	Agarose gel (Invitrogen™) ViVaantis) 49
ภาพที่ ผ7	DNA Marker หรือ DNA Ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis) 49
ภาพที่ ผ8	ชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC bioscience DNA plant kit 50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชอาหารสำคัญชนิดหนึ่งของโลกที่ให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูง โดยเฉพาะประชากรในภูมิภาคเอเซียนั้นนิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารหลักประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆ การผลิต การบริโภค และการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงมีศูนย์กลางอยู่ในทวีปเอเชีย แต่ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคของประชากรในพื้นที่แหล่งผลิต อย่างไรก็ตามประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าวคือประเทศไทย รองลงมา คือ อินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ตามลำดับ (กรมเจรจา การค้าระหว่างประเทศ, 2556)

ประเทศไทยเป็นแหล่งอารยธรรมของข้าว โดยมีหลักฐานว่ามีการปลูกข้าวมากกว่า 5,500 ปีแล้วในแหลมสุวรรณภูมิ (กรมวิชาการเกษตร, 2543) บรรพบุรุษของไทยได้สะสมภูมิปัญญาเกี่ยวกับพันธุ์ข้าวมายาวนาน ทำให้เกิดพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมกับพื้นที่และคุณภาพการบริโภคที่หลากหลาย การพัฒนาพันธุ์ข้าวของไทยซึ่งเริ่มตั้งแต่ยุคปฏิวัติเขียวเมื่อประมาณกว่า 4 ทศวรรษที่ผ่านมาเน้นการพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิต มากกว่าจะคำนึงถึงคุณค่าทางโภชนาการของพันธุ์ข้าวระบบการส่งเสริมการปลูกข้าวสมัยใหม่ที่เน้นการปลูกข้าวเชิงเดี่ยวโดยใช้สายพันธุ์ข้าวหลักๆ เพียงไม่กี่สายพันธุ์ยังได้ทำให้พันธุ์ข้าวพื้นบ้านเป็นจำนวนมากหายไปจากผืนนา ทั้งๆ ที่พันธุ์ข้าวพื้นบ้านนั้น มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าพันธุ์ข้าวทั่วไปที่เรารู้จักหลายเท่า ยกตัวอย่างเช่น ข้าวสีซึ่งในประเทศไทยมีหลายชนิด ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมคำสุโขทัย 2 ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่ จากลักษณะข้าวดังกล่าว บางชนิดมีเมล็ดคล้ายคลึงกันมากและแยกได้ยากด้วยการใช้เพียงลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของข้าวมีสีสำหรับการใช้จำแนกพันธุ์ข้าวมีสี ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวและปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, randomly amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งทำได้สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยและประหยัด โดยทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดีใช้อุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) 35-42 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังมีเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - randomly amplified polymorphic DNA) ซึ่งได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46-62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนมากขึ้น

และมีประสิทธิภาพในการทำซ้ำสูงขึ้น (Anantala-bhochai *et al.*, 2000) ด้วยเหตุนี้ การศึกษาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหวังที่จะใช้เทคนิคดังกล่าวในการจำแนกข้าวพันธุ์พื้นเมืองและทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ต่างๆ เพื่อใช้เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีคุณสมบัติเด่นในด้านต่างๆ ให้สามารถให้ผลผลิตได้ดียิ่งขึ้น และสามารถเป็นต้นแบบของลำดับเบสบนยีนที่เกี่ยวข้องกับสารหอม สารต้านอนุมูลอิสระ และยีนในการทนแล้งเพื่อใช้เป็น marker ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีความสามารถในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระรวมถึงความสามารถในการทนต่อความแห้งแล้งได้ดียิ่งขึ้นและเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองอย่างยั่งยืนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอาร์เอฟดีในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว 10 พันธุ์ และใช้เป็นตัวจำแนกพันธุ์ข้าวได้
2. พัฒนาหลักการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอฟดีกับข้าวเพื่อนำไปสู่การเรียนการสอนในรายวิชาทางชีววิทยา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์ข้าวพื้นเมือง สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ถึงระดับโมเลกุล
2. ได้เผยแพร่ผลงานวิจัยซึ่งเป็นประโยชน์ด้านวิชาการและเป็นส่วนหนึ่งในการร่วมกันพัฒนาผลงานวิจัยให้มีความเจริญก้าวหน้ามากขึ้น

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้ข้าว 10 พันธุ์ปลูก คือ ข้าวเก่า ข้าวสันป่าตอง ข้าวเขี้ยววง ข้าวพญาสิมแกง ข้าวลิ้มผัว ข้าวหอมแดงสุโขทัย ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวหอมนิล ข้าวมันปู และข้าวไรซ์เบอร์รี่
2. การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง
3. คัดเลือกไพรเมอร์จากการออกแบบด้วยโปรแกรม primer3 ร่วมกับการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์จากงานวิจัยที่ผ่านมา
4. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอฟดีด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
5. วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Bioedit

1.5 ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2559

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับข้าว

ชนิดและการจำแนกประเภทของข้าว

ข้าวจัดอยู่ในพืชล้มลุกวงศ์หญ้า (Gramineae หรือ Poaceae) สกุล *Oryza* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับหญ้า สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น สามารถปลูกได้เป็นบริเวณกว้างตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 53 องศาเหนือ ถึง 35 องศาใต้ และจากระดับน้ำทะเลปานกลางจนถึงระดับความสูง 2,500 เมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะปลูกอยู่ระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส ข้าวที่ใช้เพื่อการบริโภคในปัจจุบันมีอยู่ 2 ชนิดคือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* L.) และข้าวแอฟริกา (*O. glaberrima* Steud) ข้าวที่ปลูกทั่วไปนี้มีจำนวนโครโมโซม 24 แท่ง ($2n = 24$) (สถาบันวิจัยข้าว, 2538)

ข้าว *O. sativa* สามารถจำแนกได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ indica เป็นข้าวลักษณะเมล็ดเรียวยาว ปลูกมากในเขตร้อนตั้งแต่ประเทศจีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดีย และศรีลังกา สายพันธุ์ japonica เป็นข้าวลักษณะเมล็ดป้อม ปลูกมากในเขตอบอุ่นจากบริเวณแม่น้ำเหลืองของจีนไปจนถึงเกาหลีและญี่ปุ่น และสายพันธุ์ javanica หรือ ข้าวชวา เป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่าง ข้าว indica และ japonica ลักษณะเมล็ดป้อม ปลูกในประเทศอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจากให้ผลผลิตต่ำ (มูลนิธิข้าวไทย, 2554)

จากอดีต ถึงปัจจุบัน สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ได้ดำเนินงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวมาอย่างต่อเนื่องจนได้ข้าวพันธุ์รับรอง พันธุ์แนะนำ และพันธุ์ทั่วไป ให้เกษตรกรปลูกในระบบนิเวศน์ต่างๆ ซึ่งมีทั้งพันธุ์ข้าวนาสวน ข้าวไร่ ข้าวขึ้นน้ำ ข้าวน้ำลึก ข้าวญี่ปุ่น และธัญพืชเมืองหนาว จำนวน 118 พันธุ์ พันธุ์ข้าวส่วนหนึ่งที่เคยมีอยู่แต่เดิมได้สูญหายไปมากมาย พื้นที่ เนื่องจากสภาพการทำนาเพื่อตอบสนองต่อตลาดทำให้เกษตรกรต้องหันมาปลูกข้าวจำนวนไม่กี่สายพันธุ์ตามที่ตลาดต้องการ พันธุ์ข้าวที่มีการเก็บรวบรวมและจำแนกไว้แล้วโดยหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรมีประมาณ 5,000 กว่าสายพันธุ์ พันธุ์ข้าวมีการจำแนกออกในหลายลักษณะ

1. ข้าวไร่ เป็นข้าวที่ปลูกโดยอาศัยสภาพน้ำฝนตามธรรมชาติในพื้นที่ไร่หรือพื้นที่ดอน ไม่มีการเก็บกักน้ำในแปลงนา ใช้การปลูกโดยการหยอดหรือโรยเมล็ดข้าวแห้ง พันธุ์ข้าวไร่ส่วนมากจะทนต่อความแห้งแล้งได้ดี

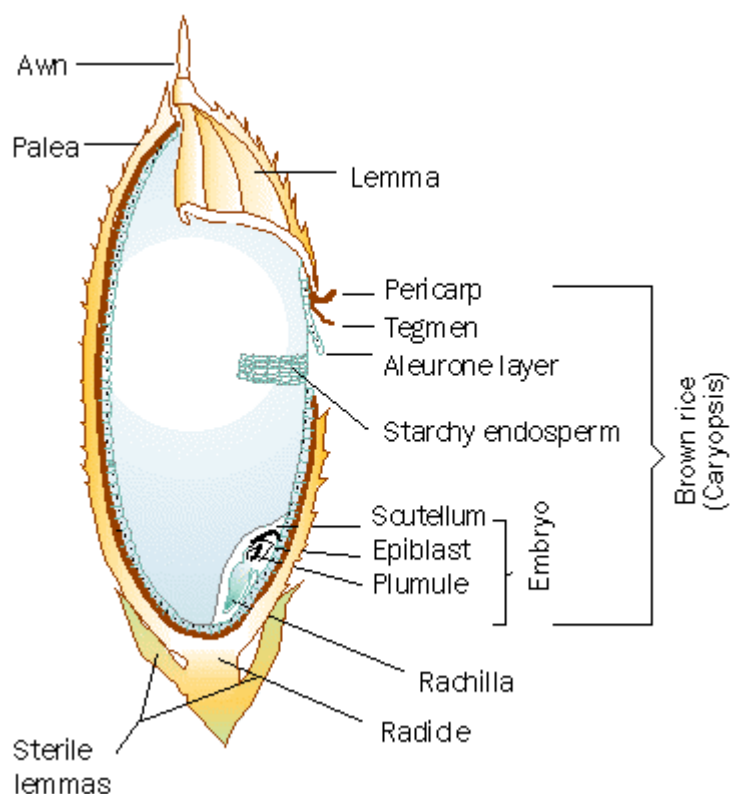
2. ข้าวนาเมือง ข้าวขึ้นน้ำ หรือข้าวฟางลอย เป็นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปี พันธุ์ข้าวส่วนมากเป็นพันธุ์พื้นเมืองสามารถยืดปล้องตามระดับน้ำได้ มีการแตกแขนงและรากที่ข้อ ทนต่อสภาพน้ำท่วมขังเป็นเวลานาน รวมทั้งสภาพแห้งแล้งได้ดี แต่ผลผลิตจะต่ำกว่านาฝน

3. ข้าวนาสวน เป็นข้าวที่ปลูกกันทั่วไปในพื้นที่ที่มีน้ำขัง มีการเก็บกักน้ำไว้ในแปลงนา ปลูกได้ที่ระดับน้ำลึก 1 เซนติเมตร แต่ไม่เกิน 50 เซนติเมตร

ลักษณะที่สำคัญของข้าว

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้าที่มีการเจริญในเขตร้อน แต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้ในเขตอบอุ่นเช่นกัน สามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ตลอดทั้งปี ข้าวที่เจริญเต็มวัยจะมีส่วนของลำต้นหลักและมีการแตกกอของลำต้นเพิ่มขึ้น แม้ภายหลังการเก็บเกี่ยวแล้วยังสามารถแตกหน่อได้ มีความสูงของลำต้นตั้งแต่ 0.4-5.0 เมตรขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม การเจริญของข้าวสามารถแบ่งออกเป็นระยะได้แก่ ระยะการงอก ระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้า และระยะการสืบพันธุ์ (Maclean et al., 2002)

เมล็ดข้าว คือ ส่วนที่ใช้สะสมอาหารและเป็นส่วนที่เจริญเติบโตเป็นต้นข้าวต้นใหม่ มีส่วนที่เป็นแป้งเรียกว่า เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) ซึ่งเป็นส่วนสะสมอาหารที่มนุษย์ใช้บริโภค และส่วนที่เรียกว่า คัพพะ (embryo) เป็นส่วนที่มีชีวิตและเจริญเป็นต้นข้าว ถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเปลือกนอกใหญ่สองชั้น (ภาพที่ 2.1) เมล็ดข้าวหนึ่งเมล็ด จะมีน้ำหนักตั้งแต่ 10 - 45 มิลลิกรัม



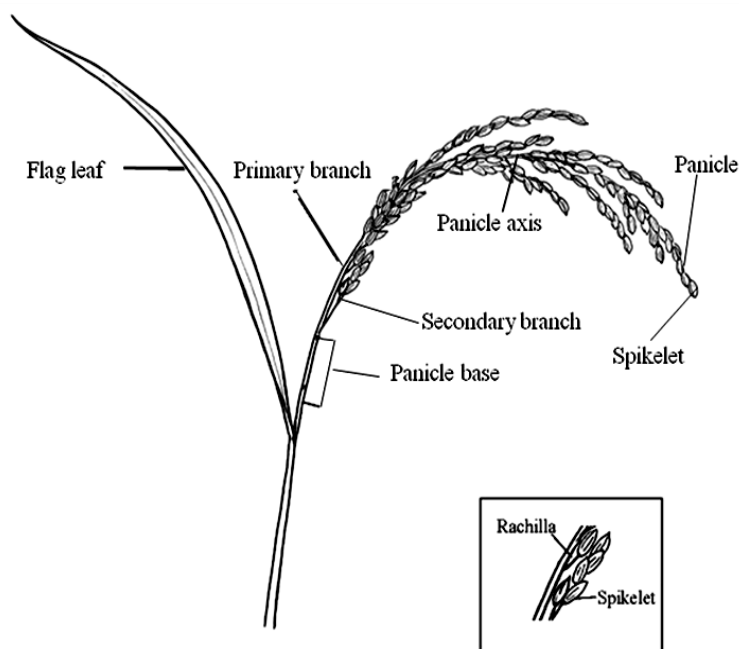
ภาพที่ 2.1 ลักษณะเมล็ดข้าวตัดตามขวาง (Maclean et al., 2002)

การงอกของเมล็ดจะเริ่มขึ้นเมื่อเมล็ดได้รับความชื้นที่เพียงพอ ภายหลังจากผ่านระยะพักตัวของเมล็ด (15-30 วัน) รากจะโผล่พ้นรอยแตกของเมล็ดออกมา ภายใต้อากาศที่มีอากาศ รากส่วนที่เป็น

seminal root จะเป็นส่วนที่โผล่ออกมาเป็น coleorhiza จากส่วนจมูกข้าวและตามด้วยส่วนกาบหุ้มยอดอ่อน ในทางตรงกันข้าม ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ กาบหุ้มยอดอ่อนจะเป็นส่วนแรกที่โผล่พ้นรอยแตกของเมล็ดออกมาก่อนส่วนอื่นและจะมีการพัฒนารากเมื่อมีการสัมผัสกับอากาศ เมล็ดที่มีการเจริญในที่มืด เช่น เมล็ดที่อยู่ใต้ผิวดินจะมีการพัฒนา short stem (mesocotyl) ซึ่งเป็นส่วนของลำต้นที่ยึดตัวให้ต้นข้าวโผล่พ้นผิวดิน เมื่อส่วนกาบหุ้มยอดอ่อนโผล่พ้นผิวดิน ยอดอ่อนจะงอกออกมาและพัฒนาเป็นใบปฐมภูมิ (primary leaf) (Maclean et al., 2002)

เมื่อต้นข้าวมีการเจริญเติบโตจนถึงระยะการแตกกอ บริเวณลำต้นมีลักษณะเป็นโพรงตรงกลาง แบ่งออกเป็นปล้องๆ (internode) มีส่วนต้นเรียกว่า แขนข้อ (nodal septum) และส่วนข้อ (node) กั้นระหว่างปล้อง โดยแต่ละข้อเป็นบริเวณที่มีการสร้างใบและตาซึ่งเจริญเป็นหน่อใหม่ได้ ปล้องที่อยู่ติดโคนจะเป็นปล้องที่สั้นและหนาที่สุด ต้นข้าวมีจำนวนข้อประมาณ 13-16 ข้อ และสามารถยืดยาวออกได้เมื่อระดับน้ำเพิ่มสูงขึ้น ข้าวมีการแตกกอโดยแต่ละกอมีจำนวนหน่อตั้งแต่ 4-80 หน่อ การแตกกอจะเกิดขึ้นในระยะต้นกล้าและสิ้นสุดเมื่อข้าวเริ่มออกช่อดอก ลักษณะลำต้นของข้าวจะถูกห่อด้วยกาบใบ (leaf sheath)

เมื่อถึงระยะเจริญพันธุ์ ข้าวจะมีการสร้างดอกที่มีลักษณะเป็นช่อดอกแบบ panicle หรือที่เรียกว่ารวงข้าว ประกอบด้วยฐานรวง (panicle base) แกนกลางช่อดอก (panicle axis) ระแงะปฐมภูมิ (primary branches) บนระแงะปฐมภูมิจะแตกกิ่งเล็กๆ ออกมามากมาย เรียกว่าระแงะทุติยภูมิ (secondary branch) ก้านดอก (panicle) และดอกข้าว (spikelet) โดยที่บริเวณฐานของช่อดอกจะมีใบข้าวที่เรียกว่า ใบธง (flag leaf) ซึ่งเป็นใบที่อยู่ปลายยอดและกาบของใบธงมีส่วนสำคัญในการปกป้องบริเวณที่จะเจริญเป็นรวงข้าว (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะและส่วนประกอบต่างๆ ของช่อดอกข้าว หรือรวงข้าว (Polato, N. 2007)

ดอกข้าว (spikelet) มีลักษณะเป็นเปลือกนอกสองแผ่นประสานกันเพื่อห่อหุ้มส่วนที่อยู่ภายใน ประกอบด้วยเปลือกนอกแผ่นใหญ่ (lemma) และเปลือกนอกแผ่นเล็ก (pelea) ที่ปลายสุดของ lemma มีลักษณะเป็นปลายแหลมยื่นออกมา เรียกว่า หาง (awn) เปลือกทั้งสองจะตั้งอยู่บนก้านสั้น ๆ ที่เรียกว่า ชั่วดอก (rachilla) ทำหน้าที่ควบคุมให้เปลือกทั้งสองเปิดปิดได้ และมีเปลือกบางๆ ประกบสองข้างเรียกว่า กลีบรองดอก (sterile lemma) และส่วนล่างสุดคือ ก้านดอก (pedicel) ซึ่งติดอยู่กับกระแฉ่ง ทูติยภูมิของรวงข้าว ดอกข้าวเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้ (stamen) ที่มีอับเกสรเพศผู้ (anther) 6 อันตั้งอยู่บนก้านอับเกสร (filament) และเกสรตัวเมีย (pistil) มีผู้รับละอองเกสร (stigma) 2 อัน และรังไข่ (ovary) 1 รัง ดอกข้าวมีลักษณะการผสมพันธุ์แบบผสมตัวเอง (self-pollinated plant) และดอกจะบานจากดอกด้านบนลงสู่ด้านล่าง (กรมการข้าว, 2554)

การเจริญเติบโตของข้าวในเขตร้อนจะใช้เวลาประมาณ 120 วัน แบ่งออกเป็น ระยะการเจริญเติบโตของลำต้นและใบ 60 วัน ระยะการเจริญของดอก 30 วัน และระยะการเจริญและการสุกของเมล็ดอีก 30 วัน (Maclean et al., 2002)

คุณสมบัติของเมล็ดข้าวจะประกอบด้วยแป้งส่วนใหญ่ 2 ชนิดคือ

ข้าวที่ใช้เพื่อการบริโภคสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ข้าวเจ้า และ ข้าวเหนียว ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันเกือบทุกประการ แต่มีความแตกต่างกันตรงที่เนื้อแข็งในเมล็ด เมล็ดข้าวเจ้าประกอบด้วยแป้งอะไมโลส (Amylose) ประมาณร้อยละ 15-30 ในขณะที่เมล็ดข้าวเหนียวประกอบ

ด้วยแป้งอะไมโลเพคติน (Amylopectin) เป็นส่วนใหญ่และมีแป้งอะไมโลส (Amylose) ประมาณร้อยละ 5-7 (วิกิพีเดีย, 2554) ตัวอย่างข้าวเจ้าพันธุ์ดีที่ทางการแนะนำได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105 ขาวตาแห้ง 17 เหลืองประทิว 123 กำผาย 41 กข. 1 กข. 5 กข.7 ฯลฯ ส่วนพันธุ์ข้าวเหนียวที่ทางการแนะนำ ได้แก่ เหนียวสันป่าตอง กข. 2 กข. 4 กข. 6 กข. 8 และ กข. 10

ข้าวพันธุ์ไวต่อช่วงแสง (photoperiod sensitive varieties) หมายถึง ข้าวที่มีช่วงเวลาของการออกดอกที่แน่นอน เป็นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปีเท่านั้น เป็นพันธุ์ข้าวที่จะออกดอกได้ในช่วงวันสั้น (น้อยกว่า 12 ชั่วโมง) ในประเทศไทยจะอยู่ในช่วงเดือนกันยายน-ธันวาคมข้าวจะออกดอกในช่วงที่เวลากลางวันสั้นกว่ากลางคืน จึงต้องปลูกในฤดูฝนเพื่อให้ออกดอกช่วงฤดูหนาว ข้าวพันธุ์ไวต่อช่วงแสงนี้จะปลูกได้เฉพาะ นาปี ถ้าปลูกในนาปรังจะไม่ออกดอก พันธุ์ไวต่อช่วงแสงนี้ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองทั่วไป และ พันธุ์ กข. ที่ไวต่อช่วงแสงได้ กข. 5 กข. 6 กข. 8 กข. 13 กข. 15 กข. 19 และ กข. 17

ข้าวพันธุ์ไมไวต่อช่วงแสง (photoperiod insensitive varieties) หมายถึง ข้าวที่ออกดอกตามอายุเก็บเกี่ยวของข้าวโดยไม่ขึ้นอยู่กับช่วงแสง เป็นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปรัง สามารถปลูกได้ตลอดปี ถ้ามีน้ำเพียงพอ และปลูกได้ดีในฤดูร้อนเพราะมีช่วงแสงมากกว่าฤดูอื่น อายุการปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 110-150 วัน พันธุ์ข้าวจำพวกนี้จะออกดอกได้โดยไม่ขึ้นกับความยาวของช่วงวันจะขึ้นอยู่กับการอายุเก็บเกี่ยวที่ค่อนข้างแน่นอน และใช้เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกในนาปรัง ซึ่งต้องอาศัยน้ำชลประทาน พันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ กข. 1 กข. 2 กข. 3 กข. 4 กข. 7 กข. 9 กข. 10 กข. 11 กข. 17 กข. 21 กข. 23 และ กข. 25 ส่วนพันธุ์พื้นเมืองมีอยู่พันธุ์เดียว คือ พันธุ์เหลืองทอง

2.2 การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

ในปัจจุบัน การบ่งชี้ชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสิ่งมีชีวิตมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างไม่จำกัด การให้ผลผลิตทางการเกษตรจึงต้องคำนึงถึงลักษณะทางพันธุกรรมเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากการระบุชนิดของพืชโดยใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธาน มักให้ความแม่นยำได้ในวงจำกัด ดังนั้นการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุลจึงมีบทบาทสำคัญในการจำแนกหรือระบุความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำกว่า

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม

DNA barcode เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบกับนั้น อาจเป็นบริเวณเดียวหรือ 2-3 บริเวณ แต่ต้องมีความยาวไม่มากและเป็นบริเวณเดียวกับชนิดอื่นๆ ที่ต้องการใช้เปรียบเทียบกัน วิธีการสร้างระบบ DNA barcode จะช่วยให้ระบุชื่อสิ่งมีชีวิตได้จากทุกระยะของการเจริญ รวมถึงในสภาพที่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและตัวอย่างที่ถูกรักษาสภาพไว้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักอนุกรมวิธานและบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญทางด้านอนุกรมวิธานและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา นิติวิทยาศาสตร์และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและเภสัชภัณฑ์

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางการศึกษา ลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชหลายๆ ประการ เช่น ผลผลิต และลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกัน การแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์, 2545)

เทคโนโลยีดีเอ็นเอ เป็นเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ที่กำลังมีบทบาทสำคัญในการเกษตร โดยเฉพาะในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งถือว่าเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ให้มีลักษณะตรงตามความต้องการของตลาด และมีผลผลิตสูงเป็นที่ต้องการของผู้ปลูก กระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นงานที่รวมทั้งศาสตร์และศิลป์เข้าด้วยกัน โดยอาศัยความพยายามของนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่จะรวบรวมลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นจากแหล่งต่างๆ มาสร้างพืชพันธุ์ใหม่โดยใช้กระบวนการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสม งานปรับปรุงพันธุ์พืชจึงมีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกของแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็น

เอจึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เพราะเป็นการคัดเลือกพืชจากจีโนไทป์ (genotype) โดยตรงซึ่งการศึกษาลักษณะดังกล่าวจะใช้เทคนิคที่เรียกว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมเข้าช่วย

2.3 เครื่องหมายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Markers) หมายถึง ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมและสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้นๆ ไปยังรุ่นลูกได้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีการใช้กันมานานแล้วในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การใช้ลักษณะรูปพรรณสัณฐานพืชที่มีความแตกต่างกันมาใช้เป็นเครื่องหมาย เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาด รูปร่างและสีของเมล็ด อายุวันออกดอก และวันเก็บเกี่ยว เป็นต้น โดยเรียกเครื่องหมายบ่งชี้นี้ว่า “เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา” (morphological markers) อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของ สายพันธุ์ได้ นอกจากนั้นแล้ว การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกนี้ ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิด ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาเครื่องบ่งชี้ชนิดอื่นมาประกอบ เพื่อช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของ สายพันธุ์มีความถูกต้อง ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เช่น ไอโซไซม์ (isozyme) เข้ามาช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) โดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพืชมาตรวจสอบ ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบรูปแบบขององค์ประกอบโปรตีนของเอนไซม์บางชนิดและโปรตีนที่สะสมในเมล็ดพืช เครื่องหมายโปรตีนถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์พืชในธุรกิจเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโปรตีนยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ จำนวนยีนที่ใช้ตรวจสอบยังมีไม่มากนัก และยีนที่นำมาศึกษาต้องมีการแสดงออก (gene expression) ด้วย การตรวจสอบจึงจำเป็นต้องเลือกเนื้อเยื่อพืชและระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงการแสดงออกของยีนที่ต้องการตรวจสอบ นอกจากนั้น ผลการตรวจสอบยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมอีกด้วย ทำให้โอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนมีค่าต่ำกว่าที่เป็นจริง จากข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหาและพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ มาใช้เป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าว ประกอบกับความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีดีเอ็นเอที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ได้เปิดเผยความลึกลับของรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ บ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับสารพันธุกรรม (genetic material) หรือ ดีเอ็นเอ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้

การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ นั้นเอง สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ กระบวนการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญได้แก่ การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพโดยการศึกษาความหลากหลายชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม และการติดตามการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละพื้นที่ ทั้งสองขั้นตอนสำคัญนี้ต้องเกี่ยวข้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้อง ซึ่งผู้ที่จะทำหน้าที่นี้ได้เป็นอย่างดีที่สุด คือ นักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญในการระบุสิ่งมีชีวิตเฉพาะกลุ่ม อย่างไรก็ตาม การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้องสามารถกระทำได้รวดเร็วและยังคงถูกต้องแม่นยำ แนวคิดของการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์จำเพาะต่อสปีชีส์ในการระบุชนิดเกิดขึ้นจากการเล็งเห็นประโยชน์เมื่อประยุกต์ใช้ในเชิงอนุรักษ์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) ตัวอย่างได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Tanksley *et al.*, 1989, McCouch and Tanksley, 1991, Kochert, G., 1994)

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction (PCR) technique) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (RAPD marker) (William *et al.*, 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP

marker) (Vos *et al.*, 1995) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown *et al.*, 1996, Powell *et al.*, 1996) เป็นต้น

2.4 เทคนิคอาร์เอฟดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)

อาร์เอฟดี เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า พีซีอาร์ (PCR) (Welsh และ McClean, 1990, William *et al.*, 1990) พีซีอาร์แต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม หรือ arbitrary primer (ซึ่งหมายถึงส่วนรหัสเริ่มต้นของดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบส) หากอาร์เอฟดีไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นใช้ arbitrary primer ดังนั้นไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ ดังนั้นถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือเป็นคนละชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกันทำให้ได้จำนวนและชิ้นของ ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ได้

เครื่องหมายอาร์เอฟดีถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนโครโมโซมของพืชที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นอาร์เอฟดีจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่เฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่งยีนเหมือนอาร์เอฟแอลพี และความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของอาร์เอฟดี มักเกิดในลักษณะมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการเชื่อมต่อหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ดังนั้น เครื่องหมายอาร์เอฟดีจึงจัดเป็น “dominant marker” จึงไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพวกที่เป็นโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (Waugh and Powell, 1992, Stuebgen *et al.*, 1996) แม้ว่าเทคนิคอาร์เอฟดีจะทำได้ง่าย รวดเร็วและให้ข้อมูลได้มากแต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องการทำซ้ำเพราะบางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมและปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับอาร์เอฟดี มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยา ได้แก่ การเลือกใช้ไพรเมอร์ชนิดใหม่ การปรับเปลี่ยนสภาวะของปฏิกิริยาแต่ละรอบและความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน เป็นต้น (สุรินทร์, 2545) ดังนั้น จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่

Hebert *et al.* (2003) เสนอคำว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อใช้สำหรับเรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่งๆ ในจีโนมที่มีลำดับเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ ในทำนองเดียวกันกับแถบบาร์โค้ดของสินค้าที่ระบุชนิดของสินค้า กลุ่มวิจัยนี้ได้ทดสอบใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย บริเวณยีน Cytochrome c oxidase subunit 1 (*Cox1* หรือ *COI*) ความยาว 648 คู่เบสในการระบุชนิดของสัตว์ และพบว่าเป็นเครื่องมือในการระบุชนิดของสัตว์หลายกลุ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพโครงการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต หรือ The Barcode of Life Project ได้เริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 2003 (Hebert *et al.*, 2003) และได้รับการสนับสนุนต่อเนื่องจากหน่วยงานที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือจาก Members details.htm) สมาชิกได้มีส่วนร่วมในการทดสอบใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ และพบว่าลำดับเบสของยีน *COI* ใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดสัตว์ได้ค่อนข้างดี เช่น การศึกษานกในทวีปอเมริกาเหนือ พบว่านกทุกชนิดมีลำดับเบสของยีน *COI* ที่ต่างกันอย่างชัดเจน โดยมีความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างชนิด (interspecific variation) และความแตกต่างเฉลี่ยภายในชนิด (intraspecific variation) เท่ากับ 7.9 เปอร์เซ็นต์ และ 0.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากงานวิจัยนี้ทำให้พบนกชนิดใหม่ 4 ชนิด เนื่องจากมีนก 4 ตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างออกไป จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน พฤติกรรม ร่วมกับเสียงร้องใหม่จึงทำให้จัดนกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างต่างนั้นเป็นนกชนิดใหม่ 4 ชนิด (Hebert *et al.*, 2004)

ในขณะที่การค้นหาดีเอ็นเอบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืชยังเป็นความท้าทายเนื่องจากยีน *COI* จากไมโทคอนเดรียในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ ทำให้มีความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดพืชได้ นักวิจัยจึงมุ่งความสนใจมาที่ลำดับดีเอ็นเอในพลาสติดจีโนมหลายกลุ่มวิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการระบุชนิดพืชของดีเอ็นเอบริเวณต่างๆ ในพลาสติด โดยบริเวณที่มีความเหมาะสมในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดควรมีลำดับเบสที่มีความแปรผันในต่างสปีชีส์ (interspecific variation) สูงกว่าความแปรผันภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecific variation) กลุ่มทำงานทางด้านพืช (Plant Working Group; PWG)

ใน CBOL ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอ 7 บริเวณในพลาสติดเพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ *atpF-atpH* spacer ยีน *matK* ยีน *rbcL* ยีน *rpoB* ยีน *rpoC1* *psbK-psbL* spacer และ *trnH-psbA* spacer เกณฑ์ที่ใช้ประกอบการพิจารณาความเหมาะสม คือ การได้มาซึ่งลำดับดีเอ็นเอ คุณภาพของข้อมูล และความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ จากการศึกษาครั้งนี้ PWG สรุปว่าบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชคือ *rbcL* และ *matK* โดยต้องใช้ข้อมูลจากทั้งสองยีนร่วมกันในการระบุชนิดพืช (2-locus barcode) (CBOL Plant Working Group, 2009) อย่างไรก็ตามคณะกรรมการระดับสูงของ CBOL สรุปยืนยันว่า *rbcL* และ *matK* ได้รับความเห็นชอบในการถูกกำหนดให้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชบก แต่คณะกรรมการยังคงเห็นควรว่าการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณอื่นสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะยังเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลสำรอง

สำหรับความต้องการในบางกรณีที่ต้องการข้อมูลจาก *rbcL* และไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกสปีชีส์พืชบางกลุ่ม (CBOL, 2009)

สำหรับในกลุ่มพืชยังไม่สามารถระบุบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ได้แน่นอน ตัวอย่างการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับดีเอ็นเอที่ควรใช้เป็น DNA barcode ได้แก่ ในปี ค.ศ 1999 Hilu และ Alice ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Poaceae โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *matK* พบว่ายีนนี้ถอดรหัสให้กรดอะมิโนจำนวนไม่เท่ากันและพบการเพิ่มหรือการขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาบริเวณอื่น เช่น ยีน *rbcL* และบริเวณ ITS โดย Chase และคณะ (2005) ได้ศึกษาข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcL* และ บริเวณ ITS เป็นข้อมูลที่ดีและมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genbank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่มและพบว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcL* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่าจึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิดและน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืชแต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งานจริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในด้านการนำมาใช้เป็น DNA barcode

ณฤมล ธนานันต์ และคณะ (2554) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ตูนีเย 9 พันธุ์ ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 59 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกพุดทั้ง 9 พันธุ์ ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า สามารถจำแนกพุดสกุลการ์ตูนีเยได้เป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.81

เบญจวรรณ สิทธิเวช และคณะ (2557) ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิสของ *Phalaenopsis schilleriana* เขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornucervi*) และลูกผสมระหว่าง *P. schilleriana* x *P. cornucervi* ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี โดยลูกผสมที่ได้มีลักษณะของใบที่แตกต่างกัน 4 แบบ คือ แบบที่ 1 ใบอ่อนมีสีเขียว แบบที่ 2 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจายแบบที่ 3 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจุกตัวเป็นแถบตามขวางของแผ่นใบ และแบบที่ 4 ใบอ่อนมีปื้นสีม่วง กระจายตัวทั่วแผ่นใบ เปรียบเทียบกับพ่อและแม่ โดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอฟดี 80 ไพรเมอร์ พบว่ามี 6 ไพร

เมอร์ ได้แก่ OPA 06 OPC 02 OPC 05 OPC 06 OPG 14 และ OPN 07 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 76 แถบ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.19 ถึง 0.71 สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ ลูกผสมที่มีใบแบบที่ 1 ใบอ่อนมีสีเขียว และแบบที่ 4 ใบอ่อนมีปื้นสีม่วง กระจายตัวทั่วแผ่นใบ กลุ่มที่ 2 คือ ลูกผสมที่มีใบแบบที่ 2 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจาย และแบบที่ 3 ใบอ่อนมีจุดสีม่วง กระจุกตัวเป็นแถบตามขวางของแผ่นใบ กลุ่มที่ 3 คือ *P. cornu-cervi* และกลุ่มที่ 4 คือ *P. schilleriana* และการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูกผสมด้วยวิธี PCA ในกลุ่มลูกผสมแสดงถึงความใกล้ชิดกันในทุกกลุ่ม โดยลักษณะมีการกระจายตัวอยู่ระหว่างพ่อแม่

สุกัญญา คำหล้าและคณะ (2554) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างประชากรพันธุศาสตร์ของปลาหลดเหลือง (*Mystus nemurus*) ด้วยเทคนิค RAPD พบแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 126 แถบ จากตัวอย่างปลาหลดเหลืองที่ทำการศึกษานาน 4 ประชากรจาก 4 แหล่ง ประกอบด้วย สงขลา เชียงราย ราชบุรี และขอนแก่น รวมทั้งสิ้น 78 ตัว ด้วยไพรเมอร์ OPA04 OPA07 OPA10 OPA17 OPA19 OPB08 และ OPC02 โดยมีเปอร์เซ็นต์ของแถบที่เป็น polymorphic ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 90.48 เปอร์เซ็นต์ - 98.63 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างในทุกไพรเมอร์ คือ 0.46-0.94 นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ที่บ่งชี้ถึงความจำเพาะต่อปลาหลดเหลืองและในแต่ละประชากร โดยพบว่า ไพรเมอร์ OPA10 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ที่จำเพาะต่อปลาหลดเหลือง แถบดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบส ที่จำเพาะต่อปลาหลดเหลืองประชากรสงขลา และแถบดีเอ็นเอขนาด 1500 คู่เบส ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปลาหลดเหลืองประชากรเชียงราย ราชบุรี และขอนแก่น

สิริมา ว่องไวโรจน์และคณะ (2555) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวาน โดยในขั้นต้นได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของข้าวฟ่างหวาน 2 วิธี คือวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) และการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant II พบว่า การสกัดทั้งสองวิธีนั้นให้จีโนม ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณสูงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ จากนั้นนำจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปมาวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรมของข้าวฟ่างหวานด้วยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 4 แบบ ได้แก่ S23 (5'AGTCAGCCAC3'), S24 (5'AATCGGGCTG3') S27 (5'GAAACGGGTG3') และ S30 (5'GTGATCGCAG3') แล้วทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ มีค่าเท่ากับ 38.0 36.0 36.4 และ 36.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Image Quant TL v7.01 พบว่า ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นมีทั้งหมด 87 แถบและมีความแตกต่างกัน 73 แถบ (คิดเป็น Total number of

polymorphic bands หรือ TPB ร้อยละ 83) โดยไพรเมอร์ RAPD S24 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความหลากหลายสูงสุดถึง 24 แถบ (คิดเป็นค่า TPB ร้อยละ 93) ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 148 ถึง 1850 bp และไพรเมอร์ RAPD S23 ให้จำนวนแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์น้อยที่สุดเพียง 12 แถบ (คิดเป็นค่า TPB ร้อยละ 66) มีขนาดตั้งแต่ 285 ถึง 1763 bp

2.5 การเกิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้อธิบายไว้ว่า การทำให้เกิดรูปแบบลายศักยดีเอ็นเอมี 3 วิธี ดังนี้

1. Hybridization-based methods เป็นวิธีใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายจีโนมิกดีเอ็นเอได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ตามความจำเพาะในการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) และตรวจสอบด้วยการจับ (hybridization) กับดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe) ที่เป็น DNA คู่สม (complementary DNA) ซึ่งติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีหรือสารเคมี จะได้รูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายตำแหน่ง (multilocus band pattern) ที่มีความหลากหลาย วิธีนี้เรียกว่า RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

2. Sequencing-based methods เป็นวิธีการจำแนกชนิดของพืชโดยวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเพิ่ม (insertion) การแทนที่ (substitution) หรือการทดสอบในส่วนของยีนที่มีการใช้ในการศึกษา เช่น internal transcribed spacer (ITS) และยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น ยีน *trnK* ยีน *matK* และ ยีน *rbcl* เป็นต้น วิธีนี้เรียกว่า RAPD (Random amplify polymorphism DNA)

3. PCR-based method เป็นวิธีที่ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) หรือไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับและดำเนินปฏิกิริยา PCR สร้างดีเอ็นเอเป้าหมายขึ้นมาใหม่ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสจะได้รูปแบบหรือชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิดซึ่งสามารถใช้จำแนกความหลากหลายของพืชได้

2.6 การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้สรุปประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอไว้ดังนี้

1. เพื่อใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (Molecular Marker) ในการจำแนกพันธุ์พืช
2. เพื่อให้เห็นความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของพืช ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยการมองด้วยสายตา
3. เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้ โดย

3.1 ช่วยในการตรวจสอบ Somaclonal Variation ในกรณีที่มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 ช่วยในการตรวจสอบ linkage ระหว่าง DNA marker กับลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อพันธุ์พืช เช่น ต้านทานโรคและแมลง ฯลฯ เพื่อช่วยในการคัดเลือกและหาตำแหน่งยีนบนโครโมโซม

3.3 ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอเวลาออกดอกหรือผล

4. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืช

2.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้

2.8 การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Charm Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อยจนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

เครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้อยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือ ต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้น คือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5 - 5 ชั่วโมง

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรืออีกชื่อว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด oligonucleotide primers บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจร ลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยว ตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทางจาก 5' ไป 3' อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 °C การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ DNA Polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดตามดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่หนึ่ง เรียกว่า Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 °C

ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-23 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 °C

ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของ

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA Polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72°C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาจากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบสามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. DNA Polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ
4. PCR Buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย
5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือชิ้นส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA Thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ดีเอ็นเอ ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหา ดีเอ็นเอ ผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหา ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก ดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ ดีเอ็นเอ สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของ ดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดี

เอ็นเอ ที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งจะเห็นแถบ ดีเอ็นเอ เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

ในปัจจุบัน เทคนิคทาง molecular phylogenetics เป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการศึกษาทางชีววิทยา ในหลากหลายสาขา โดยเป็นการอาศัยองค์ความรู้สมัยใหม่ด้านวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ สิ่งมีชีวิตมา ร่วมกับการใช้ข้อมูลทางชีววิทยาเชิงโมเลกุล เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ หรือลำดับกรดอะมิโนของ สายโปรตีน ในการอธิบายความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในด้านความ หลากหลายทางชีวภาพของ สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ตลอดจนนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยทั้งด้านชีววิทยาเชิงอนุรักษ์ด้าน วิทยาศาสตร์การแพทย์ด้านเทคโนโลยีการเกษตร และอีกหลากหลายสาขาของวิทยาศาสตร์ชีวภาพ การอบรมด้าน molecular phylogenetics ในครั้งนี้จึงจะเป็นการให้ความรู้พื้นฐานและการฝึกปฏิบัติที่เกี่ยวข้องกับ molecular phylogenetics เพื่อให้ผู้เข้ารับอบรมได้เข้าใจถึงหลักการสำคัญต่างๆของ molecular phylogenetics และวิธีการในการ วิเคราะห์ข้อมูลทางด้าน molecular phylogenetics ตลอดจนสามารถสืบหาและเตรียมข้อมูลทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุล เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางด้าน molecular phylogenetics เช่น เทคนิคการวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการของ ลำดับดีเอ็นเอและโปรตีน การสร้างแผนภาพ phylogenetic tree การอนุมานแผนภาพต้นไม้ phylogenetic tree การทดสอบทางสถิติแผนภาพ phylogenetic tree ตลอดจนการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree จากเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีสารสนเทศ (Information technology) หมายถึง กระบวนการต่างๆ และระบบงานที่จัดการ ให้ได้สารสนเทศที่ต้องการ มักอยู่ในลักษณะของฐานข้อมูล เช่น ฐานข้อมูลผู้ป่วยในโรงพยาบาล ฐานข้อมูลการลงทะเบียนเรียน ของนักศึกษาในมหาวิทยาลัย เป็นต้น ลักษณะของข้อมูลดิบ ดังกล่าว เมื่อปราศจากการจัดการด้วยกระบวนการทางสารสนเทศ มักจะมีปริมาณมาก ไม่เป็นระเบียบและยากต่อการเข้าถึง ปัจจุบัน การศึกษาทางชีววิทยาปัจจุบันในระดับโมเลกุล นักวิจัยทั่วโลกที่ทำงานทางอนุชีววิทยาก็มีเป็นจำนวนมาก ทำให้ข้อมูลการวิจัย ปริมาณมหาศาลถูกผลิตขึ้นในแต่ละวัน ไม่รู้จบสิ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้ก็ต้องการวิธีการและระบบจัดการที่ดีเช่นกัน

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนจากสาย โพลีเปปไทด์หลายๆ สายของทั้งหมด หรือส่วนหนึ่งของสาย โพลีเปปไทด์ (alignment) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนาย โครงสร้างโปรตีน บริเวณที่จัดเรียงกันได้ดีที่สุดในโครงสร้าง จะมีการแสดงผลออกมาโดยการทำงานของโปรแกรมซึ่ง กำหนดค่า โดยผู้ใช้ การจัดเรียงที่ดีที่สุดนั้นมักเป็นการพยายามที่จะทำให้ ทั้งจำนวนของช่องว่างและลำดับกรดอะมิโนหรือดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) มีค่าน้อยที่สุด (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากการจัดเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ เป็นประโยชน์ต่อการทำงานทางชีวโมเลกุลมาก ทางด้านการวิเคราะห์หายีน โครงสร้างของยีน เช่น ส่วนที่ทำหน้าที่ ควบคุมการทำงานของยีน (regulatory elements) ส่วนที่จะ ทำการแปลรหัสเพื่อให้ได้โปรตีน (coding sequence) ซึ่งสามารถ ประยุกต์ใช้ได้ในการบวนการโคลนเพื่อการสร้างโปรตีนลูกผสม ใหม่ ๆ ขึ้น หรือแม้กระทั่งการจัดจำแนกและชี้เฉพาะสปีชีส์ของ สิ่งมีชีวิตโดยเทียบความคล้ายคลึงจากลำดับเบส และสร้าง แผนภาพ ต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตขึ้นมา เป็นต้น สำหรับในงานทางด้านโปรตีน มักเป็นการทำงานที่ เกี่ยวกับการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของโปรตีน วิธีการที่ง่ายที่สุดประกอบด้วย การเทียบบริเวณ หนึ่งบริเวณ หรือมากกว่าของโปรตีนเดียวกันแต่มาจากแหล่งที่มาที่ต่างกัน สามารถให้ข้อมูลที่เป็น ประโยชน์ได้

โปรแกรมเปรียบเทียบโครงสร้างโปรตีนคู่เหมือนส่วนใหญ่ มักถูกออกแบบเพื่อให้มาเทียบ โครงสร้างโปรตีนคู่เหมือน (homologous protein) ที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน มีโปรแกรม จำนวน มากมายและมีหลายยุทธวิธีที่ใช้กันในปัจจุบัน ในบทความนี้ จะขอยกตัวอย่างโดยสังเขป เพื่อประกอบ ความเข้าใจเท่านั้น ตัวอย่างที่ยกมานี้เป็นเพียงหลักการเบื้องต้นของการทำงานที่ นักอณูชีววิทยาใช้ใน งานวิจัย โดยส่วนใหญ่กระบวนการนี้มี สองแบบ 1. สำหรับการประยุกต์เพื่อวัตถุประสงค์เชิงวงค์วาน วิวัฒนาการหรือที่เรียกกันว่าวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogeny) จำเป็นที่จะต้องสนใจจำนวนข้อมูลที่จะ นำมาเทียบ วัตถุประสงค์ก็ เพื่อที่จะเพิ่มความเป็นไปได้ระหว่างการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ กรดอะมิโน (alignment of nucleotide or amino acid sequence) ที่ใกล้เคียงกันที่ใกล้เคียงความ จริง และเพื่อลดความ คลาดเคลื่อนทางสถิติให้มากที่สุดเช่นกัน 2. สำหรับงานที่ต้องการหาโปรตีนที่ ใกล้เคียงกับข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ นักวิทยาศาสตร์มักจะใช้โปรแกรมที่ สามารถทำการเทียบ ลำดับโดยหาบริเวณที่เหมาะสมได้โดย อัตโนมัติ โดยโปรแกรมจะทำการเลือกบริเวณการเริ่มเทียบโดย อัตโนมัติได้ทันที เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติหรือโครงสร้างของ โปรตีนที่ต้องการศึกษากับโปรตีนที่มีอยู่ ในฐานข้อมูล

2.10 ชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

เป็นศาสตร์เรียนรู้ด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงใหม่ที่จะเป็นวิชาการแขนงหนึ่งซึ่งมี ความสำคัญมากที่สุดในการศึกษาวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตในศตวรรษที่ 21 ผู้เชี่ยวชาญหลายท่าน ถึงกับกล่าวไว้ว่าศาสตร์แขนงชีววิทยาในยุคใหม่นี้จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบจาก purely lab-based science ไปเป็น information science และแนวโน้มดังกล่าวก็เริ่มปรากฏให้เห็นเป็นรูปธรรมมากขึ้น ในขณะนี้

ชีวสารสนเทศศาสตร์พัฒนามาจากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพด้านจี โนม จีโนมิกส์และโปรตีโอมิกส์ ประกอบกับพัฒนาการของวิทยาการทางด้านคอมพิวเตอร์และระบบ

ฐานข้อมูลเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตทั้งหลายไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ พืช สัตว์ และมนุษย์ ข้อมูลดังกล่าวมีอยู่มากมายมหาศาล ก่อให้เกิดการพัฒนากระบวนการเก็บข้อมูล การวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนการแปลผลจากข้อมูลโดยการผสมผสานกับงานวิจัยทางด้านคณิตศาสตร์ ด้านสถิติและวิทยาการคอมพิวเตอร์ยุคใหม่ที่พัฒนาก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน

ข้อมูลทางชีววิทยาที่เกี่ยวกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) อย่างเช่น ข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมต่างๆ, ข้อมูลลำดับรหัสของโปรตีนชนิดต่างๆ ข้อมูลปริมาณของชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ รวมถึงระดับการแสดงออกของยีน (gene) ต่างๆ อย่างพวกข้อมูลของ mRNA และโปรตีนที่ได้จากยีน(gene) นั้นๆ และข้อมูลหมายเหตุต่างๆ (annotation data) โดยจะเอาข้อมูลเหล่านี้ไปทำการจัดเรียงลำดับรหัสของโปรตีน การจัดโครงสร้างของโปรตีน การทำนายโครงสร้างของโปรตีน การค้นหาสืบค้นยีน (gene) หรือ การสร้างแบบจำลองทางวิวัฒนาการต่างๆ เป็นต้น เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้มีจำนวนมากและมีความซับซ้อนมาก หากศึกษาชีวสารสนเทศศาสตร์(Bioinformatics) จะทำให้การจัดเก็บ สืบค้น และประมวลผลข้อมูลต่างๆเหล่านี้ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอ จะสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูปของ RBC Bioscience โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและชุดสกัดสำเร็จรูปดังนี้

1.1 นำใบข้าวที่เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC

สารเคมีในชุดสกัดดีเอ็นเอ

1. GPI buffer = 25 มิลลิลิตร
2. GPXI buffer = 25 มิลลิลิตร
3. GP2 buffer = 6 มิลลิลิตร
4. GP3 buffer = 15 มิลลิลิตร เติม isopropanol 30 มิลลิลิตร หรือ propanol ลงใน

GP3 buffer

5. W1 buffer = 25 มิลลิลิตร
6. Wash buffer = 25 มิลลิลิตร เติม ethanol (96-100เปอร์เซ็นต์) 50 มิลลิลิตร ลงใน

Wash buffer

7. Elution buffer = 30 มิลลิลิตร (อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน)
8. RNase A 275 ไมโครลิตร
9. Filter column (หัวกรองสีขาว) 50 ชิ้น
10. GD column (หัวกรองสีเขียว)
11. collection tube 2 มิลลิลิตร 100 ชิ้น

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชจากชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC

1. ชั่งใบพืชสดหรือใบพืชแช่แข็ง 50-100 มิลลิกรัม (หากเป็นตัวอย่างใบแห้งใช้ 5-100 มิลลิกรัม) หั่นหรือสับเป็นชิ้นเล็กๆกับไนโตรเจนเหลว จนเป็นผงละเอียด ตักใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม GPI (หรือ GPXI) 400 ไมโครกรัม และ RNase A 5 ไมโครกรัม ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตรนำไปปั่นบน vortex

3. นำไปอุ่นใน 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (กลับหลอดทุก 5 นาที)
4. เติม GP2 100 ไมโครกรัม นำไปปั่นบน vortex
5. นำไปแช่น้ำแข็ง 3 นาที

6. ใส่ Filter column (หัวกรองสีขาว) ลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube เตรียมไว้
7. นำสารละลายจากข้อ 5 (อยู่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร) เทลงใน Filter column ที่เตรียมไว้
8. นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
9. ทิ้ง Filter column เทสารละลายที่ได้ใส่ หลอด 1.5 อันใหม่

ขั้น DNA binding

10. เติม GP3 (ซึ่งเติม isopropanol แล้ว) จำนวน 1.5 เท่าของสารที่กรองได้ เช่น สารที่กรองได้ 500 ไมโครกรัม ให้เติม GP3 จำนวน 750 ไมโครกรัม (รวมเป็น 1,250 ไมโครกรัม) เป็นต้น นำไปปั่นบน vortex เป็นเวลา 5 วินาที
11. ใส่หลอด GD column (หัวกรองสีเขียว) ลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube อันใหม่ เตรียมไว้
12. ดูดสารละลายในข้อ 10 ประมาณ 700 ไมโครกรัม ลงใน GD column ส่วนที่เหลือ (~550 ไมโครกรัม) ใช้ทำ ข้อ 15
13. นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
14. ทิ้งเฉพาะสารละลายที่อยู่ใน collection tube นำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม
15. ทำซ้ำข้อ 12-14 โดยนำสารละลายจากส่วนที่เหลือใช้ในข้อ 10 (หรือข้อ 12) (~550 ไมโครกรัม) เติมลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งเฉพาะสารที่อยู่ใน collection tube อันเดิมอีกครั้ง

ขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอ

16. เติม W1 buffer จำนวน 400 ลงใน GD column
17. นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
18. เทสารละลายใน collection tube ทิ้งลงใน collection tube อันเดิม
19. เติม Wash buffer ที่เติม ethanol แล้วจำนวน 600 ไมโครกรัม ลงใน GD column
20. นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
21. เทสารละลายใน collection ทิ้งไปนำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม
22. นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้สารลงบน GD column (ethanol 96-100 เปอร์เซ็นต์) ลงใน GD column แทน buffer)
23. นำ GD column ที่แห้งวางลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ (ต้องตัดฝาทิ้งก่อน)

ขั้น DNA Elution

24. เติม preheated Elution buffer (อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส) จำนวน 100 ไมโครกรัม ลงตรงกลางของ GD column และทำการละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา

25. ตัดทิ้งไว้ 3-5 นาที (เพื่อให้ Elution buffer ซึมซับไปทั่วกลางของ GD column และทำการละลาย DNA ออกมา) นำไปปั่น 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ GD column ไปได้สารละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา

26. ถ่ายสารละลาย DNA ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝาลงในหลอด 1.5 อันใหม่ หรือหลอด PCR ปิดฝาให้สนิท รัดด้วย Para film ให้แน่น ใส่ถุงพลาสติก ชนิดแช่แข็ง ติดฉลากให้เรียบร้อย นำไปแช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

2. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

2.1 วิธี Gel electrophoresis ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบความสว่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) 1.0 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

2.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสง วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ} = 50 \times A_{260} \times \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด (ไมโครกรัม)}}{\text{ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ (ไมโครกรัม)}}$$

ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอหาจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ควรมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่

3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ทดสอบใช้ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 10 พันธุ์โดยทดสอบจากปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ปริมาณ 50 นาโนกรัม เป็นแม่แบบ โดยเลือกไพรเมอร์ 1 เส้น เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี และนำผลผลิตของอาร์เอพีดีมาตรวจสอบผลด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์

2. ตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์มาทดสอบกับดีเอ็นเอหนึ่งตัวอย่าง เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตรต่อหลอด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. DNA templat (50 ng/ ไมโครกรัม)	1.0	50 ng
3. MgCl ₂ (50 mM)	1.5	2.5 mM
4. dNTP (10 mM)	1.0	200 µM
5. Primer (4 µM /100 ไมโครกรัม)	1.0	2.0 µM
6. Tag Master Mix	25	2x
7. ddH ₂ O ปลอดเชื้อ	20.5	-
รวม	50	-

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ให้เข้ากันในหลอดสำหรับ PCR และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยมีรายละเอียดของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ	
ขั้นที่ 2 Denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที	} จำนวน 35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	

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

เก็บสารละลายผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปตรวจสอบผลบน 1.5เปอร์เซ็นต์ agarose gel

3. นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2

4. ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ลำดับที่	ไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จาก ปลาย 5' ไปยัง 3'
1	OPD05	5' TGAGCGGACA 3'
2	OPD06	5' ACCTGAACGG 3'
3	OPD07	5' TTGGCACGGG 3'

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เตรียมสารละลายสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (KCl 50 มิลลิโมลาร์; Tris-HCl, pH 9.0 10 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 0.1 เปอร์เซ็นต์) $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ TaqDNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Swift.Maxfro.Thermal Cyclers,ESCO,Singapore) ตั้งโปรแกรม นำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

ปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. สารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร
2. คู่ไพรเมอร์ (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร
3. 2 mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร
4. 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร
5. Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 12.5 ไมโครลิตร

3.2 การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมลงในช่อง agarose gel ที่ละตัวอย่างจนครบ และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA /HindIII (บริษัท SibEnzyme, Russia) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ทราบขนาดและปริมาณที่แน่นอนเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที นำไปตรวจผลบนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วยกล้อง polaroid camera โดยทั่วไป การตรวจสอบผลจาก

ปฏิกิริยาพีซีอาร์หากชิ้นยีนมีขนาดใหญ่ 500-1,00 bp มักเตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้นที่ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากการทดลองนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 200 bp และ 246 bp การตรวจสอบจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ให้มากขึ้นเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นของ agarose gel ที่มีค่าสูง ช่องว่างระหว่างโมเลกุลในเนื้อสารจะยังมีค่าลดลง จึงทำให้ดีเอ็นเอที่ยังมีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปตามแรงดันกระแสไฟฟ้าได้ลดลง ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะยังคงสามารถเคลื่อนผ่านช่องว่างระหว่างโมเลกุลของ agarose gel ได้ ด้วยเหตุนี้ การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้ดีขึ้น

4. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (per locus heterozygosity average) ของแอลลีลที่ประกอบด้วย averaged number of alleles (N_a), effective number of alleles (A_e) และ allelic richness (R) และรวมถึงค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ทั้งค่าสังเกต (observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเน (expected heterozygosity, H_e) และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ในแต่ละประชากร โดยการวิเคราะห์ ณ แต่ละตำแหน่งที่มีความหลากหลายรูปแบบทางพันธุกรรม (polymorphic loci) ด้วยวิธี likelihood ratio test (Yeh *et al.*, 1999) และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test ตรวจสอบวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากร โดยจะปรับจีโนไทป์และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กใหม่ ณ ตำแหน่งและประชากรที่ตรวจพบ null allele คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของ Nei (1978) พร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (dendrogram) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 1.2 (Goudet, 1995) และ POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ยกเว้นการวิเคราะห์ null allele และปรับจีโนไทป์ใช้โปรแกรม Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) โดยระบุกลุ่มประชากรตามที่ปรากฏในโครงสร้างความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างให้ครอบคลุมทุกระดับที่ปรากฏในโครงสร้าง โดยตรวจสอบจากค่า F-statistics (inbreeding coefficients หรือ fixation indexes) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า P ในทุกระดับ และทุกคู่ประชากร ของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า P

ที่ 0.02 (Fu, 1997; Excoffier *et al.*, 2006) การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรทุกคู่ ใช้การวิเคราะห์ค่า P ของ F_{st} ระหว่างคู่ประชากร (PF_{st}) และวิธี exact test (P_{exact}) ภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า P ที่ได้รับการปรับโดยใช้ Bonferroni correction เพื่อความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests (Rice, 1989) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.1

5. การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit (Version 7.0.9.0)

ขั้นตอนการใช้โปรแกรม BioEdit เพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้

1. เปิดโปรแกรม BioEdit > File > New alignment
2. Open > File ข้อมูลจาก Notepad ที่มีลำดับเบสอยู่ คลุมข้อความ Edit > copy
3. เปิด File > BioEdit จะเกิดหน้าต่างโปรแกรม BioEdit ไปที่ File > import From clipboard
4. เมื่อได้ข้อมูลครบแล้ว ไปที่ Accessory > Application > clustalw Multiple alignment จะเกิดหน้าต่างแสดงค่า Minimum base overlap ขึ้น
5. คลิกที่ Run clustalw เมื่อแสดงหน้าต่างการเริ่มทำงานของการวิเคราะห์ผล ให้กด Enter
6. หากการสร้าง phylogenetic tree โดยไปที่ Accessory Application > prodist Neighbor phylogenetic tree จะเกิดหน้าต่างแสดงค่า Minimum base overlap
7. คลิกที่ Run Application เมื่อแสดงหน้าต่างการเริ่มทำงานของการวิเคราะห์ผล ให้กด Enter จะได้ผล phylogenetic tree ที่ต้องการ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบของข้าว 10 พันธุ์ ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในขั้นตอน PCR ต่อไป และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอสามารถหาค่าเข้มข้นได้ดังตารางที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l)

พันธุ์ข้าว	ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l)		
	สกัดครั้งที่		
	1	2	3
ข้าวกำแพง	583.7	561.7	631.2
ข้าวสันป่าตอง	642.2	631.5	533.5
ข้าวเขี้ยว	616.2	582.5	593.3
ข้าวพญาลิสมแก	594.6	642.2	628.4
ข้าวลิ้มผัว	552.6	612.2	619.2
ข้าวหอมแดงสุโขทัย	648.2	553.6	628.0
ข้าวหอมมะลิแดง	610.2	681.7	592.6
ข้าวหอมนิล	522.4	621.4	538.4
ข้าวมันปู	655.5	612.0	601.2
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	538.2	610.4	621.2

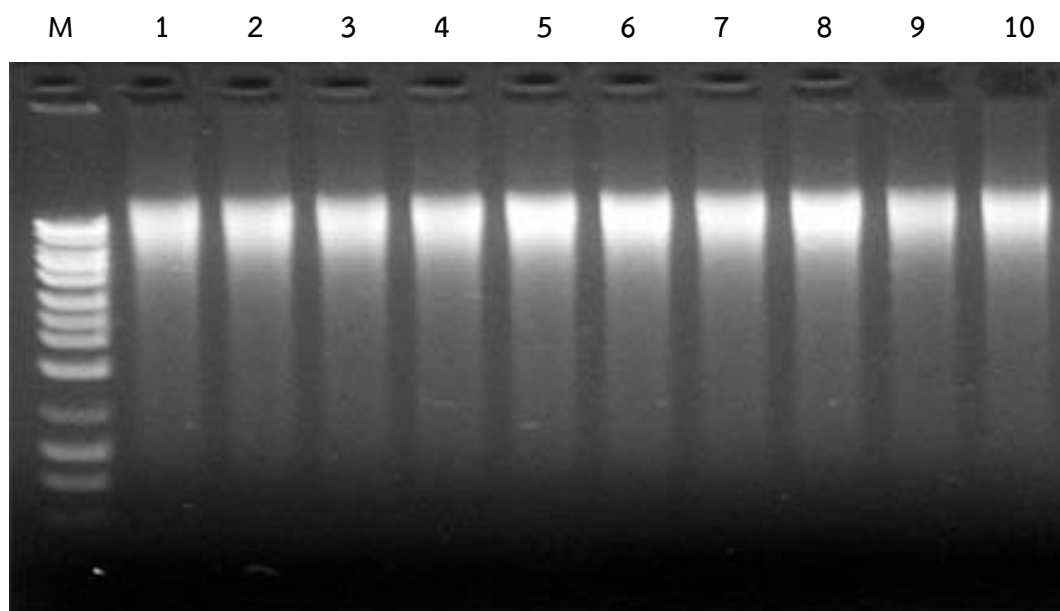
หลังจากการสกัดดีเอ็นเอ หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และหาความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) หากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจากการตรวจสอบดังกล่าวได้ค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A_{260}/A_{280} ของใบข้าว

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280})				
พันธุ์ข้าว \ ข้าที่	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1 ข้าวเก่า	1.8	2.0	1.9	1.9
2 ข้าวสันป่าตอง	1.6	2.1	1.7	1.8
3 ข้าวเขี้ยววู	1.7	1.8	1.9	1.8
4 ข้าวพญาลิ้มแกง	1.7	1.9	1.9	1.83
5 ข้าวลิ้มผัว	1.9	1.7	1.8	1.8
6 ข้าวหอมแดงสุโขทัย	1.8	1.9	1.9	1.86
7 ข้าวหอมมะลิแดง	1.9	2.0	1.8	1.9
8 ข้าวหอมนิล	1.7	2.1	1.7	1.83
9 ข้าวมันปู	1.9	1.6	1.9	1.8
10 ข้าวไรซ์เบอร์รี่	1.9	1.8	1.9	1.86

เมื่อวัดค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแล้ว นำมาตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟเรซิส และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Spectrophotometer เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ หากขึ้นจีโนมิกดีเอ็นเอมีความสมบูรณ์ ไม่แตกหักเสียหายมากนัก ดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะรวมตัวกันอยู่บริเวณด้านบนของเจลและมักไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลลงไปยังด้านล่างได้มากนัก การสกัดดีเอ็นเอของพืชควรเลือกใบอ่อนของพืช เพราะเป็นแหล่งของดีเอ็นเอที่แท้จริง และสอดคล้องกับการทดลองของ Michiels *et al.* (2003) ที่ได้ศึกษาการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบของพืชโดยการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของใบอ่อนและใบแก่ พบว่า ใบพืชอ่อนจะมีองค์ประกอบของสารประกอบประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) และพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compounds) น้อยกว่าใบแก่ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะมีผลต่อปฏิกิริยากับโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์และพอลิฟีนอลิกยังมีส่วนในการยับยั้งดีเอ็นเอในขั้นตอนการสกัดอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Lim *et al.* (1997) ภายหลังจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล พบว่า ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและอาจมีการปนเปื้อนของสารฟุติย

ภูมิ (secondary metaboliti) หรือสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีอยู่ในพืช จากดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาตรวจสอบโดยวิธีการเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาพที่ 4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว บน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์

Lane M คือ 100 bp DNA Maker

Lane ที่ 1 คือ ข้าวกำ Lane ที่ 6 คือ ข้าวหอมแดงสุโขทัย

Lane ที่ 2 คือ ข้าวสันป่าตอง Lane ที่ 7 คือ ข้าวหอมมะลิแดง

Lane ที่ 3 คือ ข้าวเขี้ยว Lane ที่ 8 คือ ข้าวหอมนิล

Lane ที่ 4 คือ ข้าวพญาลิ้มแกง Lane ที่ 9 คือ ข้าวมันปู

Lane ที่ 5 คือ ข้าวลิ้มฟัว Lane ที่ 10 คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่

2. ผลการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

2.1 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว

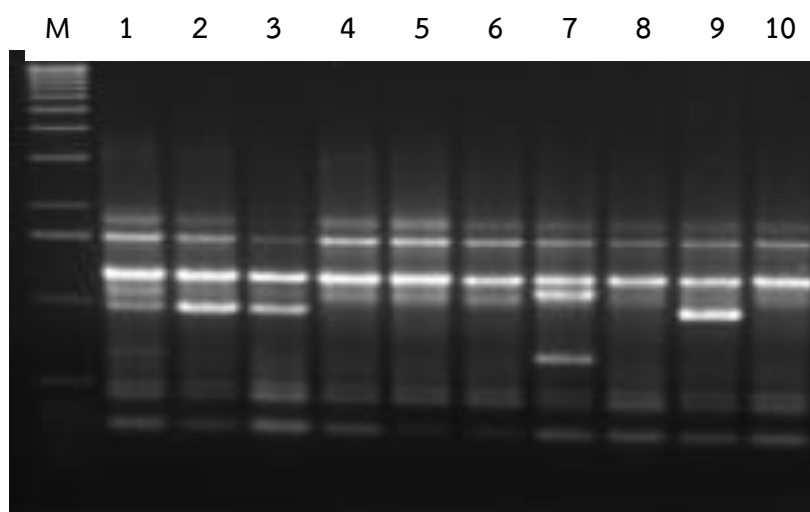
ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกันตามความสามารถของไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถเข้าจับกับจีโนมิกดีเอ็นเอของมะม่วงในแต่ละตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มีจำนวนทั้งหมด 3 คู่ ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าว

ลำดับที่	ไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จาก ปลาย 5' ไปยัง 3'
1	OPD05	TGAGCGGACA
2	OPD06	ACCTGAACGG
3	OPD07	TTGGCACGGG

3. การวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าว ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อตรวจสอบด้วย agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบไพรเมอร์ทุกเส้นที่ใช้ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวจากไพรเมอร์แต่ละเส้นมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกัันดังแสดงในภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์จากดีเอ็นเอข้าว บน agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์

Lane M คือ 100 bp DNA Maker

Lane ที่ 1 คือ ข้าวเก่า Lane ที่ 6 คือ ข้าวหอมแดงสุโขทัย

Lane ที่ 2 คือ ข้าวสันป่าตอง Lane ที่ 7 คือ ข้าวหอมมะลิแดง

Lane ที่ 3 คือ ข้าวเขี้ยววง Lane ที่ 8 คือ ข้าวหอมนิล

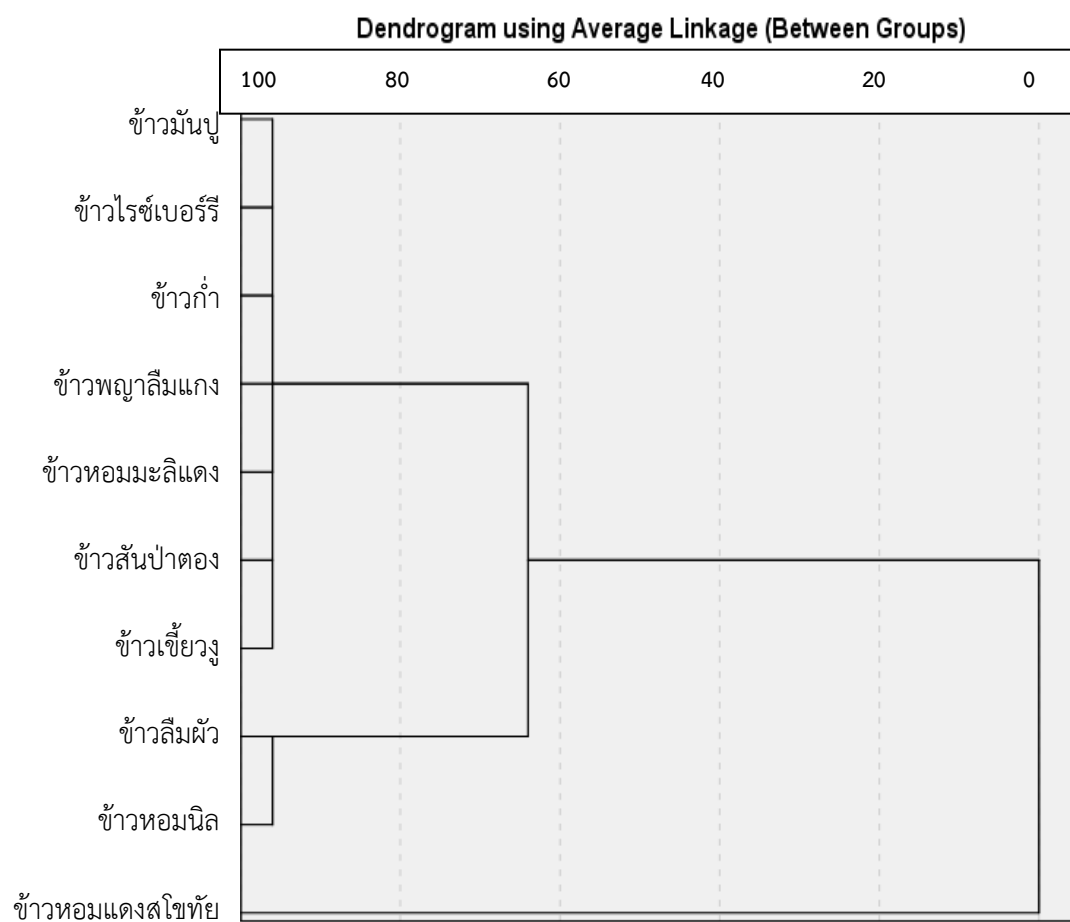
Lane ที่ 4 คือ ข้าวพญาลิมา Lane ที่ 9 คือ ข้าวมันปู

Lane ที่ 5 คือ ข้าวลิ้มผัว Lane ที่ 10 คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่

4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการด้วยเทคนิค RAPD

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่นำมาคำนวณทั้งสิ้น 45 แถบ เมื่อวิเคราะห์ dendrogram แล้วพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มข้าวออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ตัวอย่างข้าวมันปู ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเก่า ข้าวพญาลิ้มแกง ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวสันป่าตอง และข้าวเขี้ยววง ภายในกลุ่มตัวอย่างนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและมีค่าดัชนีความเหมือน 0.945 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตัวอย่างข้าวลิ้มผัว และข้าวหอมนิล ภายในกลุ่มตัวอย่างนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและมีค่าดัชนีความเหมือน 0.962 และกลุ่มที่ 3 มีตัวอย่างข้าว 1 ตัวอย่าง คือ ข้าวหอมแดงสุโขทัย โดยมีดัชนีความเหมือนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อยู่ที่ 0.472 และ 0.525 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อยู่ 0.632 เมื่อพิจารณาดัชนีความเหมือนที่ค่อนข้างสูง แสดงถึงความแตกต่างของข้าวแต่ละชนิดเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (กมลวรรณ, 2545)

เมื่อพิจารณา dendrogram แล้วจะพบว่าข้าวลิ้มผัว และข้าวหอมนิล มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่ากลุ่มอื่น โดยมีดัชนีความเหมือน 0.962 ส่วนชยันนาทจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับข้าวกลุ่มอื่นมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนทั้ง 2 กลุ่มจะมีดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.632 ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรและมีการกระจายตัวไปในที่ต่างๆ ซึ่งสภาพภูมิประเทศไม่เหมือนกัน ดังนั้นพืชจึงต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ดังรายงานของ Miyashita *et al.* (1999) ศึกษาใน *Arabidopsis thaliana* ด้วยเทคนิค AFLP อธิบายว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประชากรอาจเกิดการกระจายตัวไปในที่ต่างๆ ที่ห่างไกลกัน ต่อมามีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและถูกจำกัดอยู่ในภาวะนั้น การเคลื่อนย้ายยีนไปสู่อีกประชากรจึงลดลงและมีการผสมกันภายในประชากร จึงทำให้ประชากรแต่ละประชากรมีความแตกต่างทางพันธุกรรม



ตารางที่ 4.4 แสดงค่าดัชนีความเหมือนที่ได้จากข้อมูลเทคนิค RAPD

	Squared Euclidean Distance									
	ข้าวเก่า	ข้าวสันป่าตอง	ข้าวเขี้ยววู	ข้าวพญาลิ้มแกง	ข้าวลิ้มผิว	ข้าวหอมแดงสุโขทัย	ข้าวหอมมะลิแดง	ข้าวหอมนิล	ข้าวมันปู	ข้าวไรซ์เบอร์รี่
ข้าวเก่า	0.000									
ข้าวสันป่าตอง	0.000	0.000								
ข้าวเขี้ยววู	0.000	0.000	0.000							
ข้าวพญาลิ้มแกง	0.000	0.000	0.000	0.000						
ข้าวลิ้มผิว	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000					
ข้าวหอมแดงสุโขทัย	3.000	3.000	3.000	3.000	2.000	0.000				
ข้าวหอมมะลิแดง	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	3.000	0.000			
ข้าวหอมนิล	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	2.000	1.000	0.000		
ข้าวมันปู	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	3.000	0.000	1.000	0.000	
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	3.000	0.000	1.000	0.000	0.000

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวจำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวมันปู ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเก่า ข้าวพญาลิ้มแกง ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวสันป่าตอง ข้าวเขี้ยววง ข้าวลิ้มผิว ข้าวหอมนิล และข้าวหอมแดงสุโขทัย และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์รหัส OPD05 OPD06 และ OPD07 (Rahman *et al.*, 2006) วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD ด้วยโปรแกรม PhotoCaptMw จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสร้างเป็น dendrogram และตาราง metrix จากโปรแกรม SPSS ซึ่งจากการวิเคราะห์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่นำมาคำนวณทั้งสิ้น 45 แถบ เมื่อวิเคราะห์ dendrogram แล้วพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มข้าวออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างข้าวมันปู ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเก่า ข้าวพญาลิ้มแกง ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวสันป่าตอง และข้าวเขี้ยววงภายในกลุ่มตัวอย่างนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและมีค่าดัชนีความเหมือน 0.945 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างข้าวลิ้มผิว และข้าวหอมนิล ภายในกลุ่มตัวอย่างนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและมีค่าดัชนีความเหมือน 0.962 และกลุ่มที่ 3 มีตัวอย่างข้าว 1 ตัวอย่าง คือ ข้าวหอมแดงสุโขทัย โดยมีดัชนีความเหมือนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อยู่ที่ 0.472 และเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อยู่ระหว่าง 0.632

สำหรับในกลุ่มพืช ยังไม่สามารถระบุบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ได้แน่นอน ตัวอย่างการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับดีเอ็นเอที่ควรใช้เป็น DNA barcode ได้แก่ ในปี ค.ศ 1999 Hilu และ Alice ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Poaceae โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *matK* พบว่ายีนนี้ถอดรหัสให้กรดอะมิโนจำนวนไม่เท่ากันใน และพบการเพิ่มหรือการขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาบริเวณอื่น เช่น ยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS โดย Chase และคณะ (2005) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ถึงแม้ว่าข้อมูลจากแผนที่ยีนที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD จะเป็นข้อมูลที่ดี แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณเพียงบางบริเวณแบบสุ่ม ซึ่งหากใช้ไพรเมอร์จำนวนคู่ที่เพิ่มขึ้น ก็มักให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะหลากหลายมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายดีเอ็นเอยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ตำแหน่งยีนและการสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กมลวรรณ ไกรทองสุข. 2545. การใช้เทคนิค FISH และ AFLP ในการศึกษาอีโนมของข้าวป่า (*Oryza spp.*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นฤมล ธนาคันต์, รุจิเรข นพเกษร และ ชีระชัย ธนาคันต์. 2554. การใช้เทคนิคอาร์เอฟดีศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการดีเนี่ย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 16 (1): 41-46.
- เบญจวรรณ สิทธิเวช, วีณัน บัณฑิตย์ และ ณัฐา โพธารณณ์. 2557. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลฟาแลนอปซิสด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี. วารสารแก่นเกษตร 42 (3). 513 – 517.
- สิริมา ว่องไวโรจน์, พชณี แสงทอง, คมสัน อำนวยสิทธิ์ และ สุภาวดี ศรีแย้ม. 2555. การจำแนกสายพันธุ์ของข้าวฟ่างหวานที่ปลูกในเขตภาคเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิค RAPD. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 35 (1).
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5 (2) : 37-58.
- สุกัญญา คำหล้า, นิสันต์ สัตยาศัย, สมพงษ์ ดุลจินดาขบพร และ รุ่งลาวัลย์ สุดมูล. 2554. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลากดเหลือง *Mystus nemurus* (C&V) ด้วยเทคนิค RAPD. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 12 มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Brown, G., W. N. Frost, and P. A. Getting. 1996. Habituation and iterative enhancement Of multiple components of the *Tritonia* swim response. *Behav. Neurosci.* 110 : 478–485.
- Chase, W. M., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, M.J, Kesanakurthi, P. R., Haidar, N. And Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1889-1895.
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K. M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T. A. j., Conrad, F., Salazar, G. A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M. L., Barraclough, T. G., Kelly, L. and Wilkinson, M. J. 2007. A

- proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295-299.
- CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 106: 12794-12797.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities Of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ebihara, A., Nitta, J.H. & Ito, M. 2010. Molecular species identification with rich floristic sampling:DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan. *PLoS ONE* 5: e15136.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2006) Arlequin ver. 3.11: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne: Berne, Switzerland.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmastwer, S. G., Husband, B. C.,Percy, D. M., Hajibabaei, M. and Barrett, S. C. H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3: e2802.
- Ford, C. S., Ayres, K. L., Toomey, N., Haider, N.,Stahl, J. V. A., Kelly, L. J., Wikström, N., Hollingsworth, P. M., Duff, R. J., Hoot, S. B., Cowan, R. S., Chase, M. W. and Wilkinson, M. J. 2009. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 1-11.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gonzalez, M.A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S.A.,Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C. & Chave, J. 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PloS ONE* 4: e7483.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313-321.
- Hebert P.D.N., Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNABarcodes. *PLoS Biol* 2(10): e312.

- Hilu, K. W. and L. A. Alice. 1999. Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae. Amer. J. Bot. 86: 1735-1741.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in Plant systematics. American Journal of Botany 84: 830-839.
- Kochert, G. 1994. RFLP technology. In DNA-based markers in plants. Phillips, R.L. and I.K. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. Pp.8-38.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. PLoS ONE 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Papulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2923-2928.
- McCouch, S. and S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic. In. Rice biotechnology. Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. (eds.) CAB International. Wallingford. Oxon, UK. Pp. 109-133.
- Miyashita N. T., A. Kawabe, H. Innan, 1998 Intra- and interspecific DNA variation and codon bias of the alcohol dehydrogenase (*Adh*) locus region in *Arabis* and *Arabidopsis* species Mol. Biol. Evol. 13:433-436.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., Steeves, R. A. D. and Janovec, J. 2007. Testing Candidates plant barcode regions in the Myristicaceae. Molecular Ecology Resources 8: 480-490.
- Plunkett, G.M., Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1997, Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *matK* and *rbcl* sequence data, Amer. J. Bot. 84: 565-580.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci 1:215-222.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.M. and Specht, C.D. 2007. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding makers for species identification of cycads. PLoS ONE 2: e1154.

- Seberg, O. and Petersen, G. 2009. How many loci does it take to DNA barcode a crocus? PLoS ONE 4: e4598.
- Rahman S N, Islam M S, Alam M S & Nasiruddin K M. 2006. Genetic polymorphism in rice (*Oryza sativa* L.) thorough RAPD analysis. Indian Journal of Biotechnology 6: 224-229.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for Phylogenetic analysis. In: Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing. D.E., Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle (Eds.), pp.1-42. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Patterson, A. H., and Bonierbale, M. W, 1989, RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science, Bio/Technology 7:257.
- The Royal Botanic Gardens, Kew. 2007. Phase 2 Update. DNA barcoding Available Source: <http://www.kew.org/barcoding/update.html>. June 21, 2007.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM and Shipley PF (2004) MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4:535-538.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23: 4407–4414
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531–6535.
- Yeh Francis C., Yang R.-C., Boyle Timothy B. J., Ye Z.-H. and Mao Judy X. 1999 POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายต้นต่อ CTAB buffer

1.1 CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ (50 มิลลิลิตร)

ชั่ง CTAB	5.0	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

1.2 Tris-HCl 1 โมลาร์ (25 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris base	3.03	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร

1.3 EDTA 1 โมลาร์ (20 มิลลิลิตร)

ชั่ง EDTA	7.44	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

1.4 NaCl 3 โมลาร์ (50 มิลลิลิตร)

ชั่ง NaCl	8.77	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

2. การเตรียมเอนไซม์ Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง Proteinase K	10	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่น	986.7	ไมโครลิตร
Tris-HCl 1 โมลาร์ (pH 7.5)	10	ไมโครลิตร
NaCl 3 โมลาร์	3.3	
ไมโครลิตร		

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเอนไซม์ RNase A (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง RNase-A	1	มิลลิกรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4. TE buffer (250 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris base	0.303	กรัม
----------------	-------	------

EDTA	0.093	กรัม
เติมน้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 8 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส		
5. TBE ความเข้มข้น 10 เท่า (1000 มิลลิลิตร)		
Tris base (hydroxyl methyl,aminomethane)	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
EDTA 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)	40	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
6. เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (70 มิลลิลิตร)		
ซัง อะกาโรส	0.7	กรัม
ปรับปริมาตรด้วย TBE buffer เข้มข้น 1 เท่า	70	มิลลิลิตร
ต้มจนละลายด้วย hot plate หรือ ไมโครเวฟ		
7. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิลิตร)		
เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์	95	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร
8. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิลิตร)		
เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์	70	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร
9. คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (100 มิลลิลิตร)		
เติมคลอโรฟอร์ม	96	มิลลิลิตร
ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์	4	มิลลิลิตร
เก็บไว้ในขวดสีชา		

10. การเตรียม CTAB buffer สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (800 ไมโครลิตร)

สารละลายต้นต่อ CTAB buffer	ความเข้มข้นที่ต้องการ	ปริมาณต่อตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
CTAB 10 เปอร์เซ็นต์	2 เปอร์เซ็นต์	160.00
Tris-HCl 1 โมลาร์	100 มิลลิโมลาร์	80.00
EDTA 1 โมลาร์	20 มิลลิโมลาร์	16.00
NaCl 3 โมลาร์	1.4 โมลาร์	373.33
β -mercaptoethanol	1.2 เปอร์เซ็นต์	1.60
Proteinase-K 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	8.00
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	-	161.07
รวม	-	800

หมายเหตุ เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

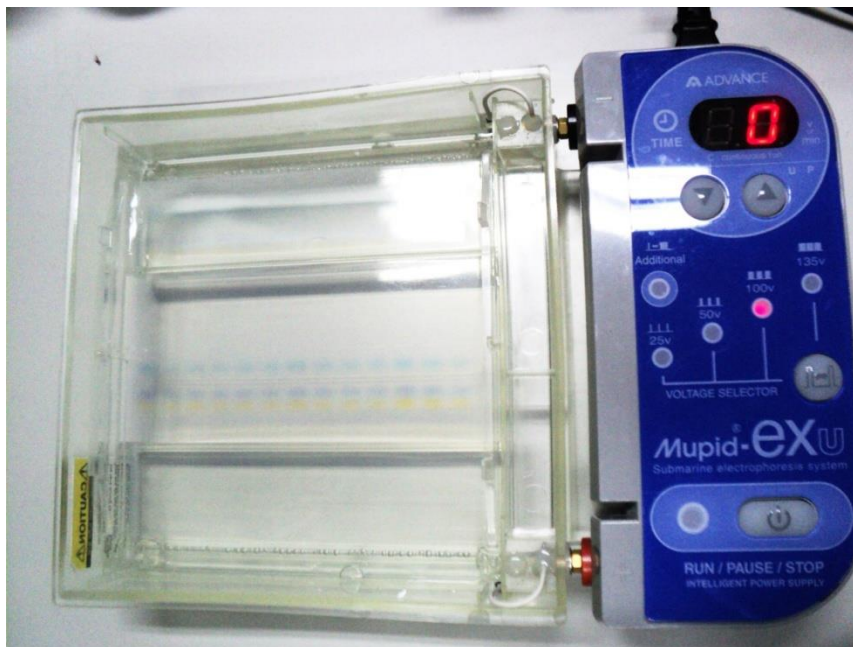
ภาคผนวก ข



ภาพที่ ผ1 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)



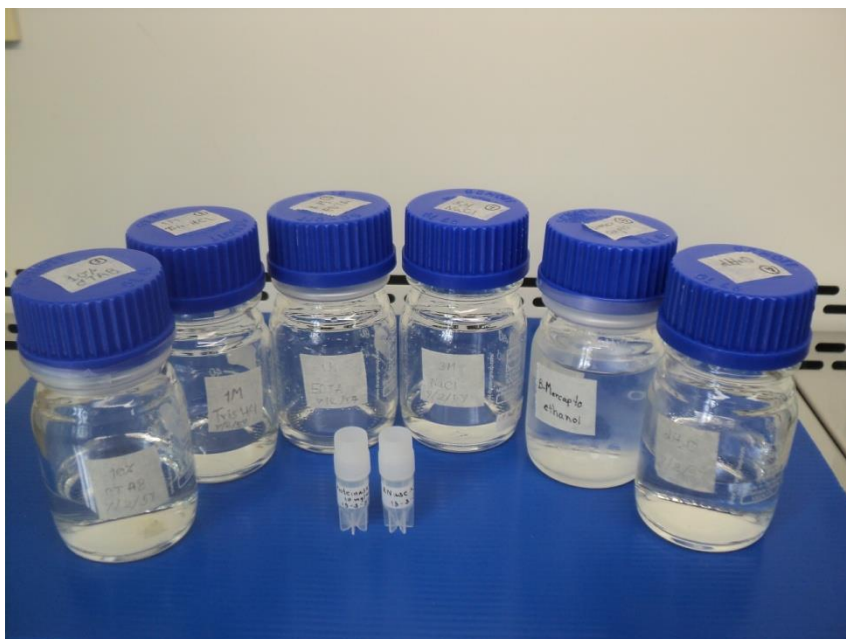
ภาพที่ ผ2 ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)



ภาพที่ ผ3 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System)



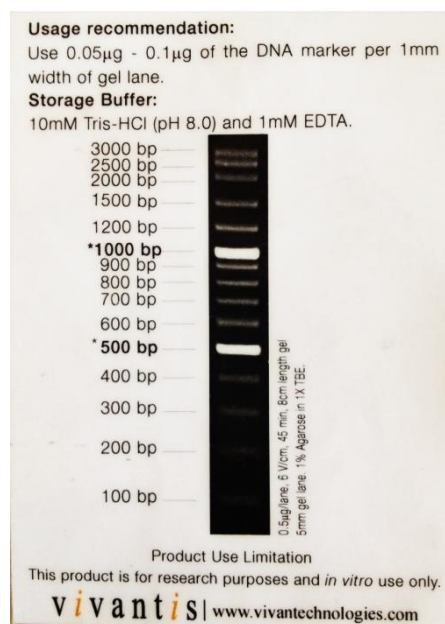
ภาพที่ ผ4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)



ภาพที่ ๕ สารละลายต้นตอที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB



ภาพที่ ๖ Agarose gel (Invitrogen™)



ภาพที่ ๗ DNA Marker หรือ DNA Ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)



ภาพที่ ผ8 ชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC bioscience DNA plant kit

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล

นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

Mr. Surachest Aiumsumang

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3679800097588

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์ มือถือ 0899612694

e-mail : toptthesun@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ จากคณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา สาขาย่อย ชีววิทยา
โมเลกุล)

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีววิทยาโมเลกุล พันธุศาสตร์โมเลกุล

งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และดวงกมล แม้นศิริ. (2554). การใช้วิตามินซีในการส่งเสริมความทนต่อ
สภาวะเครียดเกลือในมะขาม (*Oryza sativa* L.). ใน: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย
ระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 12 (สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ). หน้า 544 – 553. บัณฑิต
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ เบญจพร ศรีสุรมาศ. (2557). การแสดงออกของยีนไคตินเนสในการ
ต้านทานโรคราในมะขาม. ในการประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่
1 สานพลังปัญญา เพื่อพัฒนาสุขภาพ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้สังคมพหุ
วัฒนธรรม. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ เบญจพร ศรีสุวรรณาศ. 2558. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มะขาม 10 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการใช้ยีน *rbcl*. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ภายใต้หัวข้อ “วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีก้าวไกลสู่ประชาคมอาเซียน (Science and Technology Towards ASEAN)”. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2558. การใช้สื่อมัลติมีเดียในการเพิ่มศักยภาพการเรียนรู้การสอนเรื่อง การแพร่และกระบวนการออสโมซิสในสิ่งมีชีวิต. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ภายใต้หัวข้อ “วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีก้าวไกลสู่ประชาคมอาเซียน (Science and Technology Towards ASEAN)”. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์.

ฉัตรพร แก้วสาร, สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2558. ผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa* L.) Blume) ในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2 "งานวิจัยเพื่อพัฒนาท้องถิ่น". มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณาศ, สมพงษ์ แสนเสนยา และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2558. การตรวจสอบเพื่อระบุข้าวพันธุ์ปลูกพื้นเมืองเพชรบูรณ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*. การประชุมวิชาการจีโนมิกส์ ชีวสารสนเทศศาสตร์ และชีววิทยาเชิงระบบ. สมาคมพันธุศาสตร์ไทย. 10-11 พฤศจิกายน 2558 ณ ไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

กาญจน์ คุ่มทรัพย์, สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง, อาตุลย์ จงรักษ์ และอาทิตย์ หุ้เต็ม. 2558. ความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศเกษตรที่สูง กรณีศึกษา ชุมชน ตำบลเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์. ประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา “การวิจัยเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน”

Artit Huteam and Surachest Iamsamang. 2014. Correlation Function of Gaussian-Sine Asymmetric Potential by Shooting Method. Advance Studies in Theoretical Physics; Vol. 8, 2014, no 19, 825 – 830.

Benchaporn Srisuvoramas, Sompong Sansenya, Surachest Aiumsamang, Lertharong Sripanom and Thep Piamalung. 2015. DNA Barcodes for cultivar identification of Thailand *Tamarindus indica* L., The International Conference on Science and Technology 2015, RMUTT. ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ระหว่างวันที่ 4-6 พฤศจิกายน 2558.

ประวัติผู้วิจัยร่วม

ชื่อ และนามสกุล

รศ. ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ

Assoc. Prof. DR.BENCHAPORN SRISUVORAMAS

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3101600210787

ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

การศึกษาสูงสุด Ph.D สาขาวิชา Horticulture (spect. in Tissue Culture and Genetics)

มหาวิทยาลัย UP LOSBANOS ปีที่จบ พ.ศ.2542

สถานที่ติดต่อ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์

รหัสไปรษณีย์ 67000 โทรศัพท์ 0-5671- 7100 ต่อ 1706 โทรสาร 0-5671-7110

งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และจินตนา สนามชัยสกุล.2552. ศึกษาช่วงเวลาการติดเชื้อราและผลของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สารสกัดสมุนไพรรสจืดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ ที่มีต่อเชื้อราจากมะขามหวานพันธุ์ประกายทองในห้องปฏิบัติการ. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปีการศึกษา 2552.

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาตุลย์ จงรักษ์ นิคม จันทรมังกร และอนุพงษ์ ทิมอุบล. 2552. **ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรรพญาวานร(ฮวานจ็อก)** Proceeding.งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 โรงแรมเดอะไฮด์รีสอร์ท (หาดบางแสน)จังหวัดชลบุรี 15-17 ตุลาคม 2552

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาตุลย์ จงรักษ์ ประยูร ลิ้มสุข และ กฤษฎีพันธ์ พรณรัตน์ชัย. 2551.

The production of high nutritive *Amaranthus* spp. by hydroponic method for the business protocol.Proceeding . ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The International Workshop and Symposium on Science and Technology 2008(I-SEEC 2008) 15-16 ธันวาคม 2551 ณ โรงแรมรอยัลแม่โขงหนองคาย ประเทศไทย

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2551.การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรรพญาวานรโดยการมีส่วนร่วมของผู้ใช้สมุนไพรร เพชรบูรณ์:คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนสถาบันวิจัยและพัฒนาประจำปี 2551 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, อาตุลย์ จงรักษ์ ,ประยูร ลิ้มสุข และ กฤษฎีพันธ์ พรณรัตน์ชัย .2550.

ศึกษาการผลิตผักโขมที่ปราศจากสารก่อมะเร็ง(แคลเซียมออกซาเลต) โดยวิธีไฮโดร โพนิกส์

เพื่อเป็นต้นแบบไปสู่ภาคธุรกิจ เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนงบประมาณแผ่นดินโดยผ่านการพิจารณาจาก วช.
2550

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2549. การศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสบูดำโดยเทคนิคการ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฝังตัวอย่างในพาร์ฟฟิน. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและ
พัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2549

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2548.คุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแคลลัสผักโขมหนามที่
ปราศจากสารก่อเนื้องอก. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย
ราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2547. ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแคลลัสในผักโขม 3 ชนิด
(ผักโขมจีน, ผักโขมหนามและผักโขมหัด) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.
ISBN 974-7479-83-4 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย
ราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2547

เบญจพร ศรีสุวรรณ.2546.ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นแฮพลอยด์(n)จากอับละอองเรณูของ
ช่อนกลิน. ISBN 974-7479-62-1 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2546

เบญจพร ศรีสุวรรณ. 2545. การศึกษาคุณค่าทางอาหารของแคลลัสจากมะขามหวาน 4 สาย
พันธุ์ (ประกายทอง, สีทอง, ศรีชมภู และขันตี). ISBN 974-7479-50-8
เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการ
วิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2545

เบญจพร ศรีสุวรรณ และคณะ. 2545. ศึกษาการเพาะเมล็ดแก้วมังกรด้วยเทคนิค Embryo
Rescue. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณ. 2544. การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานใน
หลอดแก้ว. ISBN 974-7479-44-3 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2544

เบญจพร ศรีสุวรรณ. 2526.ความผิดปกติของโครโมโซมในลิ้มไฟซ์ของคนเนื่องมาจาก
วิตามินซี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม) คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบญจพร ศรีสุวรรณ, พรทิพย์ พุ่มภาชี, นุจรี เพือกใต้, และ ศุภเกียรติ ประเสริฐสังข์. 2544.

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในแคลลัสจากมะขามหวาน 3 สายพันธุ์ (สีทอง, ปรายทอง และขันตี). เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์

Benchaporn Srisuvoramas. 1999. Morphology, Histology and Cytology of Enhanced Axillary Bud Formation and Production of Cell Suspension Culture in *Theobroma cacao* Linn. *in Vitro*. Ph.D. Dissertation . UPLB. Philippines.

7. ตำรา/เอกสารประกอบการสอน

รายวิชา: พันธุศาสตร์ ISBN 974-7479-45-1

ชีววิทยาของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ไมโครเทคนิค

จุลชีววิทยา

วิทยาศาสตร์เพื่อคุณภาพชีวิต

วิทยาศาสตร์ในชีวิตประจำวัน

8. ประวัติการศึกษา และประวัติการทำงาน

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี : กศ.บ.(ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร
กรุงเทพฯ เมื่อ พ.ศ. 2518

ปริญญาโท : วท.ม. (ชีววิทยา-พันธุศาสตร์) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ เมื่อ พ.ศ. 2526

ปริญญาเอก : Ph.D. (spect in Tissue Culture and Genetics) จากUP LOSBANOS
เมื่อ พ.ศ.2542