



รายงานการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์  
ของยีน *rbcl*

Genetic Relationship of Varieties Rice Using by Nucleotide  
Sequence of *rbcl* Genes.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน  
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2560

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์  
ของยีน *rbcl*

Genetic Relationship of Varieties Rice Using by nucleotide  
sequence of *rbcl* genes.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เบญจพร ศรีสุวรรมาศ

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดยงบประมาณแผ่นดินที่พิจารณาโดยผ่านความเห็นชอบจาก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i>
ผู้วิจัย	สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง
ผู้ร่วมวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ
สาขาวิชา	ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. 2560

### บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* เพื่อใช้จำแนกพันธุ์ข้าว 10 พันธุ์ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยใช้โปรแกรมที่มีความจำเพาะ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing จากการศึกษา พบว่า สามารถจำแนกข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ข้าวเก่า ข้าวลิ้มผัว ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมนิล ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวสันป่าตองและข้าวเขี้ยววุง ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ 2 จัดความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด ได้แก่ ข้าวพญาลิ้มแกง และข้าวมันปู และลำดับต่อมาคือข้าวสุโขทัย ตามลำดับ ซึ่งเป็นการจำแนกข้าวออกเป็นกลุ่มนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์

คำสำคัญ ข้าว, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, ยีน *rbcl*

Title Genetic Relationship of Varieties Rice Using by nucleotide sequence of *rbcl* genes.

Author Surachest Aiumsumang.

Co- author Assoc. Prof Dr.Benchaporn Srisuvoramas.

Department Biology program, Department of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University.

Date 2017

### ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the relationship of rice using *rbcl* gene to identify 10 rice varieties. DNA extraction by DNA extraction kits and genetic relationship analysis by *rbcl* gene with using specific primer. Estimate DNA by PCR technique, and analysis by nucleotide sequencing. The result found that classify rice into 2 groups. group 1 Purple Rice, LeumPua Glutinous Rice, Riceberry, Hom-nin, Red Brown Jasmine Rice, San PA Tong and Kheo-Ngo. group 2 for Paya Lerm Kang, Mun-Poo and Sukhothai respectively. This is a classification of rice to be used in the development and cooking of varieties.

Keywords: rice (*Oryza sativa*), genetic relationship, *rbcl* gene.

## กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่เอื้อเพื่อวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยใน ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา และมหาวิทยาลัยราชภัฏ เพชรบูรณ์ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลง ได้ด้วยดี

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง

1 พฤษภาคม 2561

## สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อ		ข
ภาษาอังกฤษ		ค
กิตติกรรมประกาศ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
<b>บทที่ 1</b>	<b>บทนำ</b>	
	1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
	4. ขอบเขตของการวิจัย	2
	5. ขอบเขตระยะเวลา	2
<b>บทที่ 2</b>	<b>เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	3
	1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับข้าว	3
	2. การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล	6
	3. เครื่องหมายทางพันธุกรรม	7
	4. <i>rbcl</i> และ <i>matk</i>	11
	5. การจัดจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล	12
	6. การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA	13
	7. ชีวสารสนเทศ (bioinformatics)	17
<b>บทที่ 3</b>	<b>วิธีดำเนินการวิจัย</b>	18
	1. การสกัดแยกดีเอ็นเอ	18
	2. การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ	19
	3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	20
	4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูโกโซฟอลิเมอเรส	21
	5. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล	22
	6. การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)	23
<b>บทที่ 4</b>	<b>ผลการวิจัย</b>	25

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
	25
	27
	27
	28
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34
	35
	43
	48
	50

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	ส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์	20
ตารางที่ 3.2	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	21
ตารางที่ 4.1	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ $\mu$ l)	25
ตารางที่ 4.2	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A260/A280 ของใบข้าว	26
ตารางที่ 4.3	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	27
ตารางที่ ก1	ความเข้มข้นที่ปริมาณสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอเรส	37
ตารางที่ ก2	ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับระยะทางที่เคลื่อนที่	39
ตารางที่ ก3	บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	40

## สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพที่ 4.1	ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว บน agarose gel 1.0 %	28
ภาพที่ 4.2	แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวงรีวิวัฒนาการของข้าว	30
ภาพที่ ข1	เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์	44
ภาพที่ ข2	ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)	44
ภาพที่ ข3	เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System)	45
ภาพที่ ข4	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)	45
ภาพที่ ข5	สารละลายต้นต่อที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB	46
ภาพที่ ข6	Agarose gel (Invitrogen™) ViVaantis)	46
ภาพที่ ข7	DNA Marker หรือ DNA Ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)	46
ภาพที่ ข8	ชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC bioscience DNA plant kit	47

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชอาหารสำคัญชนิดหนึ่งของโลกที่ให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูง โดยเฉพาะประชากรในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารหลักประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆ การผลิต การบริโภค และการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงมีศูนย์กลางอยู่ในทวีปเอเชีย แต่ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคของประชากรในพื้นที่แหล่งผลิต อย่างไรก็ตามประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าวคือประเทศไทย รองลงมา คือ อินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ตามลำดับ (กรมวิชาการเกษตร, 2543)

ประเทศไทยเป็นแหล่งอารยธรรมของข้าว โดยมีหลักฐานว่ามีการปลูกข้าวมากกว่า 5,500 ปีแล้วในแหลมสุวรรณภูมิ (กรมวิชาการเกษตร, 2543) คนไทยได้สะสมภูมิปัญญาเกี่ยวกับพันธุ์ข้าว ทำให้เกิดพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมกับพื้นที่และคุณภาพการบริโภคที่หลากหลาย การพัฒนาพันธุ์ข้าวของไทยเน้นการพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิต มากกว่าจะคำนึงถึงคุณค่าทางโภชนาการของพันธุ์ข้าวระบบการส่งเสริมการปลูกข้าวสมัยใหม่ที่เน้นการปลูกข้าวเชิงเดี่ยวโดยใช้สายพันธุ์ข้าวหลักๆ เพียงไม่กี่สายพันธุ์ ทำให้พันธุ์ข้าวพื้นบ้านเป็นจำนวนมากหายไป ทั้งที่พันธุ์ข้าวพื้นบ้านนั้นมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและนอกจากนี้ ลักษณะข้าวบางชนิดมีเมล็ดคล้ายคลึงกันมากและแยกได้ยากด้วยการใช้เพียงลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของข้าวมีสีสำหรับการใช้จำแนกพันธุ์ข้าวมีสี ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวและปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาคำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม ด้วยเหตุนี้ การศึกษาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหวังที่จะใช้เทคนิคดังกล่าวในการจำแนกข้าวพันธุ์พื้นเมืองและทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ต่างๆ เพื่อใช้เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีคุณสมบัติเด่นในด้านต่างๆ ให้สามารถให้ผลผลิตได้ดียิ่งขึ้น และสามารถเป็นต้นแบบของลำดับเบสบนยีนที่เกี่ยวข้องกับสารหอม สารต้านอนุมูลอิสระ และยีนในการทนแล้งเพื่อใช้เป็น marker ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเช่น ข้าว

ชาวดอกมะลิ 105 ให้มีความสามารถในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระรวมถึงความสามารถในการทนต่อความแห้งแล้งได้ดียิ่งขึ้นและเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองอย่างยั่งยืนต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการตรวจลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมือง 10 พันธุ์ เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองและเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะตามที่ต้องการได้ดีขึ้น
2. สร้างองค์ความรู้ในงานวิจัยให้แก่พันธุ์ข้าวพื้นเมืองในท้องถิ่นให้เกิดการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์กรรมอย่างยั่งยืน

## 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. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน *rbcl* เพื่อระบุความจำเพาะของข้าวแต่ละพันธุ์
6. วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc

## 1.5 ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาดังตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2560

## 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 พันธุ์ข้าวสวนหนึ่งที่เคยมีอยู่แต่เดิมได้สูญหายไปหลายๆ พันธุ์ เนื่องจากสภาพการทำนาเพื่อตอบสนองต่อตลาดทำให้เกษตรกรต้องหันมาปลูกข้าวจำนวนไม่กี่สายพันธุ์ตามที่ตลาดต้องการ พันธุ์ข้าวที่มีการเก็บรวบรวมและจำแนกไว้แล้วโดยหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรมีประมาณ 5,000 กว่าสายพันธุ์ พันธุ์ข้าวมีการจำแนกออกในหลายลักษณะ

1. ข้าวไร่ เป็นข้าวที่ปลูกโดยอาศัยสภาพน้ำฝนตามธรรมชาติในพื้นที่ไร่หรือพื้นที่ดอน ไม่มีการเก็บกักน้ำในแปลงนา ใช้การปลูกโดยการหยอดหรือโรยเมล็ดข้าวแห้ง พันธุ์ข้าวไร่ส่วนมากจะทนต่อความแห้งแล้งได้ดี

2. ข้าวนาเมือง ข้าวขึ้นน้ำ หรือข้าวฟางลอย เป็นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปี พันธุ์ข้าวส่วนมากเป็นพันธุ์พื้นเมืองสามารถยืดปล้องตามระดับน้ำได้ มีการแตกแขนงและรากที่ข้อ ทนต่อสภาพน้ำท่วมขังเป็นเวลานาน รวมทั้งสภาพแห้งแล้งได้ดี แต่ผลผลิตจะต่ำกว่านาปี

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 คัพภะ (embryo) เป็นส่วนที่มีชีวิตและเจริญเป็นต้นข้าว ถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเปลือกนอกใหญ่สอง เมล็ดข้าวนึ่งเมล็ด จะมีน้ำหนักตั้งแต่ 10 - 45 มิลลิกรัม

การงอกของเมล็ดจะเริ่มขึ้นเมื่อเมล็ดได้รับความชื้นที่เพียงพอ ภายหลังจากผ่านระยะพักตัวของเมล็ด (15-30 วัน) รากจะโผล่พ้นรอยแตกของเมล็ดออกมา ภายใต้อากาศที่ไม่มีอากาศ รากส่วนที่เป็น seminal root จะเป็นส่วนที่โผล่ออกมาเป็น coleorhiza จากส่วนจุมูกข้าวและตามด้วยส่วนกาบหุ้มยอดอ่อน ในทางตรงกันข้าม ภายใต้อากาศที่ไม่มีอากาศ 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) แขนกลางช่อดอก (panicle axis) ระวังปฐมภูมิ (primary branches) บนระวังปฐมภูมิจะแตกกิ่งเล็กๆ ออกมามากมาย เรียกว่าระวังทุติยภูมิ (secondary branch) ก้านดอก (panicle) และดอกข้าว (spikelet) โดยที่บริเวณฐานของช่อดอกจะมี

ใบข้าวที่เรียกว่า ใบธง (flag leaf) ซึ่งเป็นใบที่อยู่ปลายยอดและกาบของใบธงมีส่วนสำคัญในการปกป้องบริเวณที่จะเจริญเป็นรวงข้าว

ดอกข้าว (spikelet) มีลักษณะเป็นเปลือกนอกสองแผ่นประสานกันเพื่อห่อหุ้มส่วนที่อยู่ภายใน ประกอบด้วยเปลือกนอกแผ่นใหญ่ (lemma) และเปลือกนอกแผ่นเล็ก (palea) ที่ปลายสุดของ lemma มีลักษณะเป็นปลายแหลมยื่นออกมา เรียกว่า หาง (awn) เปลือกทั้งสองจะตั้งอยู่บนก้านสั้น ๆ ที่เรียกว่า ชั่วดอก (rachilla) ทำหน้าที่ควบคุมให้เปลือกทั้งสองเปิดปิดได้ และมีเปลือกบางๆประกบสองข้างเรียกว่า กลีบรองดอก (sterile lemma) และส่วนล่างสุดคือ ก้านดอก (pedicel) ซึ่งติดอยู่กับระแนงหุติยภูมิของรวงข้าว 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 ในขณะที่เมล็ดข้าวเหนียวประกอบด้วยแป้งอะไมโลเพคติน (Amylopectin) เป็นส่วนใหญ่และมีแป้งอะไมโลส (Amylose) ประมาณร้อยละ 5-7 ตัวอย่างข้าวเจ้าพันธุ์ดีที่ทางการแนะนำได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105

ข้าวพันธุ์ไวต่อช่วงแสง (photoperiod sensitive varieties) หมายถึง ข้าวที่มีช่วงเวลาของการออกดอกที่แน่นอน เป็นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปีเท่านั้น เป็นพันธุ์ข้าวที่จะออกดอกได้ในช่วงวันสั้น (น้อยกว่า 12 ชั่วโมง) ในประเทศไทยจะอยู่ในช่วงเดือนกันยายน-ธันวาคมข้าวจะออกดอกในช่วงที่เวลากลางวันสั้นกว่ากลางคืน จึงต้องปลูกในฤดูฝนเพื่อให้ออกดอกช่วงฤดูหนาว ข้าวพันธุ์ไวต่อช่วงแสงนี้จะปลูกได้เฉพาะ นาปี ถ้าปลูกในนาปรังจะไม่ออกดอก พันธุ์ไวต่อช่วงแสงนี้ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองทั่วไป

ข้าวพันธุ์ไม่ไวต่อช่วงแสง (photoperiod insensitive varieties) หมายถึง ข้าวที่ออกดอกตามอายุเก็บเกี่ยวของข้าวโดยไม่ขึ้นอยู่กับช่วงแสง เป็นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปรัง สามารถปลูกได้ตลอดปี ถ้ามีน้ำเพียงพอ และปลูกได้ดีในฤดูร้อนเพราะมีช่วงแสงมากกว่าฤดูอื่น อายุการปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 110-150 วัน พันธุ์ข้าวจำพวกนี้จะออกดอกได้โดยไม่ขึ้นกับความยาวของช่วงวันจะขึ้นอยู่กับอายุเก็บเกี่ยวที่ค่อนข้างแน่นอน และใช้เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกในนาปรัง ซึ่งต้องอาศัยน้ำชลประทาน

## 2.2 การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

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

DNA barcode เป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชื่อ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว บริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบนั้น 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) การหาคำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษา ลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชหลายๆ ประการ เช่น ผลผลิต และลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกัน การแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

เทคโนโลยีดีเอ็นเอ เป็นเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ที่กำลังมีบทบาทสำคัญในการเกษตร โดยเฉพาะในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งถือว่าเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ให้มีลักษณะดีตรงตามความต้องการของตลาด และมีผลผลิตสูงเป็นที่ต้องการของผู้ปลูก กระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นงานที่รวมทั้งศาสตร์และศิลป์เข้าด้วยกัน โดยอาศัยความพยายามของนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่จะรวบรวมลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นจากแหล่งต่างๆ มาสร้างพืชพันธุ์ใหม่โดยใช้กระบวนการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสม งานปรับปรุงพันธุ์พืชจึงมีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกของแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เพราะเป็นการคัดเลือกพืชจากจีโนไทป์ (genotype) โดยตรงซึ่งการศึกษาลักษณะดังกล่าวจะใช้เทคนิคที่เรียกว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมเข้าช่วย

### 2.3 เครื่องหมายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Markers) หมายถึง ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมและสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้นๆ ไปยังรุ่นลูกได้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีการใช้กันมานานแล้วในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การใช้ลักษณะรูปร่างสัณฐานพืชที่มีความแตกต่างกันมาใช้เป็นเครื่องหมาย เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาด รูปร่างและสีของเมล็ด อายุวันออกดอก และวันเก็บเกี่ยว เป็นต้น โดยเรียกเครื่องหมายบ่งชี้นี้ว่า เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological markers) อย่างไรก็ตาม พบว่าลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ นอกจากนั้นแล้ว การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกนี้ ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิด ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาเครื่องบ่งชี้ชนิดอื่นมาประกอบ เพื่อช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้อง 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 ทำให้นัก-วิทยาศาสตร์พยายาม

ค้นหาและพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ มาใช้เป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าว ประกอบกับความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีดีเอ็นเอที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ได้เปิดเผยความลับของรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต 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 การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพโดยการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม และการติดตามการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละพื้นที่ ทั้งสองขั้นตอนสำคัญนี้ต้องเกี่ยวข้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้อง ซึ่งผู้ที่จะทำหน้าที่นี้ได้ดีที่สุด คือ นักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญในการระบุสิ่งมีชีวิตเฉพาะกลุ่ม อย่างไรก็ตาม การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้องสามารถกระทำได้รวดเร็วและยังคงถูกต้องแม่นยำ แนวคิดของการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์จำเพาะต่อสปีชีส์ในการระบุชนิดเกิดขึ้นจากการสังเกตเห็นประโยชน์เมื่อประยุกต์ใช้ในเชิงอนุรักษ์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไฮบริดเซชัน (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) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown *et al.*, 1996, Powell *et al.*, 1996) เป็นต้น

กระบวนการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญได้แก่ การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพโดยการศึกษาความหลากหลายชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม และการติดตามการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละพื้นที่ ทั้งสองขั้นตอนสำคัญนี้ต้องเกี่ยวข้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้อง ซึ่งผู้ที่จะทำหน้าที่นี้ได้อย่างดีที่สุดคือนักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญในการระบุสิ่งมีชีวิตเฉพาะกลุ่ม อย่างไรก็ตาม การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้องสามารถกระทำได้รวดเร็วและยังคงถูกต้องแม่นยำ แนวคิดของการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์จำเพาะต่อสปีชีส์ในการระบุชนิดเกิดขึ้นจากการเล็งเห็นประโยชน์เมื่อประยุกต์ใช้ในเชิงอนุรักษ์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

Hebert และคณะ (2003) เสนอคำว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อใช้สำหรับเรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่งๆ ในจีโนมที่มีลำดับเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้สามารถใช้งานกับสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ ในทำนองเดียวกันกับแถบบาร์โค้ดของสินค้าที่ระบุชนิดของสินค้า กลุ่มวิจัยนี้ได้ทดสอบใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียบริเวณยีน 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 7.93% และ 0.43% ตามลำดับ และจากงานวิจัยนี้ทำให้พบชนิดใหม่ 4 ชนิด เนื่องจากมีนก 4 ตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างออกไป จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน พฤติกรรม ร่วมกับเสียงร้องใหม่จึงทำให้จัดนกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากนั้นเป็นชนิดใหม่ 4 ชนิด (Hebert *et al.*, 2004)

ในขณะที่การค้นหาดีเอ็นเอบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืชยังเป็นความท้าทายเนื่องจากยีน *COI* จากไมโทคอนเดรียในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ ทำให้มีความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดพืชได้ นักวิจัยจึงมุ่งความสนใจมาที่ลำดับดีเอ็นเอในพลาสติดจีโนมหลายกลุ่มวิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการระบุชนิดพืชของดีเอ็นเอบริเวณต่างๆ ในพลาสติด โดยบริเวณที่มีความเหมาะสมในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดควรมีลำดับเบสที่มีความแปรผันในต่างสปีชีส์ (interspecific variation) สูงกว่าความแปรผันภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecific variation) กลุ่มทำงานทางด้านพืช

ใน CBOL ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอ 7 บริเวณในพลาสติดเพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ *atpF-atpH* spacer, ยีน *matK*, ยีน *rbcl*, ยีน *rpoB*, ยีน *rpoC1*, *psbK-psbI* spacer และ *trnH-psbA* spacer เกณฑ์ที่ใช้ประกอบการพิจารณาความเหมาะสมคือ การได้มาซึ่งลำดับดีเอ็นเอ คุณภาพของข้อมูล และความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ จากการศึกษาครั้งนี้ PWG สรุปว่าบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชคือ *rbcl* และ *matK* โดยต้องใช้ข้อมูลจากทั้งสองยีนร่วมกันในการระบุชนิดพืช (2-locus barcode) (CBOL Plant Working Group, 2009) อย่างไรก็ตามแม้คณะกรรมการระดับสูงของ CBOL สรุปยืนยันว่า *rbcl* และ *matK* ได้รับความเห็นชอบในการถูกกำหนดให้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชบก แต่คณะกรรมการยังคงเห็นควรว่า การศึกษาดีเอ็นเอบริเวณอื่นสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะยังเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลสำรองสำหรับความต้องการในบางกรณีที่ข้อมูลจาก *rbcl* และ ไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกสปีชีส์พืชบางกลุ่ม (CBOL, 2009)

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 ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS จะเป็นข้อมูลที่ดี และมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genbank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่ม และพบว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcl* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่า จึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิด และน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณ

หนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืช แต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งานจริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในแง่ของการนำมาใช้เป็น DNA barcode

#### 2.4 บริเวณ *rbcl* และ *matK*

CBOL Plant Working Group (2009) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอมาตรฐานจากคลอโรพลาสต์จีโนม 7 บริเวณ ได้แก่ *rbcl*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* และ *psbK-psbI* เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการสร้าง DNA barcode กับพืช 907 ตัวอย่าง จาก 550 ชนิด โดยแบ่งเป็นพืชดอก 445 ชนิด (670 ตัวอย่าง) กลุ่มจิมโนสเปิร์ม 38 ชนิด (81 ตัวอย่าง) และกลุ่มไรเมอไรต์ 67 ชนิด (156 ตัวอย่าง) โดยเน้นที่คุณลักษณะ 3 ประการ คือ ความเป็นมาตรฐานสากล คุณภาพของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (sequence quality) และประสิทธิภาพในการแยกชนิดพืช (species discrimination) หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐานที่นำมาทดสอบต้องให้ผลในการแยกและระบุชนิดพืชได้ดี หรือ มีความแม่นยำสูง

เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนและความรวดเร็วในการวิเคราะห์ผลร่วมด้วย CBOL Plant Working Group ได้เสนอให้ยีน *rbcl* และ ยีน *matK* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้สร้าง DNA barcode ในพืช โดยจะต้องใช้ร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดพืชได้ดีที่สุด ผลการทดสอบพบว่า การใช้บริเวณยีนทั้งสองร่วมกันให้ผลในการระบุพืชในระดับชนิดได้ถูกต้อง ประมาณ 72% ของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา และในระดับสกุลระบุได้ถูกต้อง 100% แม้ว่าการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานร่วมกัน 3 บริเวณ เช่น *rbcl* + *matK* + *trnH-psbA* ระบุชนิดพืชในระดับชนิดได้ดีขึ้น (76%) แต่ไม่ได้ให้ผลแตกต่างกันมากนัก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนและใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้น CBOL Plant Working Group จึงได้เสนอให้ใช้เพียง 2 บริเวณร่วมกัน โดยเลือกใช้ยีน *rbcl* + *matK* แต่ไม่เลือกใช้ *rbcl* + *trnH-psbA* หรือ *matK* + *psbA* เนื่องจากคณะนักวิจัยพิจารณาแล้วว่าบริเวณ *trnH-psbA* ยังมีปัญหาคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพไม่ดีนัก ดังนั้นคณะนักวิจัยจึงเสนอให้บริเวณ *trnH-psbA* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณเสริม (supplementary loci) เท่านั้น ส่วนบริเวณอื่นๆ พบว่ามีประสิทธิภาพในการนำมาใช้แยกและระบุชนิดพืชได้ไม่ดี หรือ บางบริเวณอาจให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คุณภาพไม่ดีจึงไม่ถูกลีอกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

*rbcl* เป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) เอนไซม์ RubisCO ที่สมบูรณ์ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กรวมตัวกัน จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO<sub>2</sub> ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcl* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาว

ตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (Kress & Erickson, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010) จุดเด่นของยีน *rbcL* ที่ CBOL Plant Working Group พิจารณาว่าเหมาะสำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานคือ มีความเป็นมาตรฐานสากล และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก แม้ว่าประสิทธิภาพในการนำไปใช้แยกและระบุชนิดพืชจะค่อนข้างต่ำแต่เมื่อใช้ร่วมกับบริเวณอื่น เช่น *matK* จะให้ผลการแยกและระบุชนิดพืชได้ดีขึ้น ส่วนยีน *matK* เป็นยีนที่มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ maturase ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Group II introns splicing (Hilu & Liang, 1997) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานจะเลือกเพียงบางบริเวณของยีนให้มีความยาว 700-800 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ข้อดีของยีนนี้คือมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ระบุชนิดพืชได้ดีอีกทั้งยังให้คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในเกณฑ์ดีเช่นเดียวกับยีน *rbcL* แต่ข้อด้อยของยีน *matK* ที่เป็นอุปสรรคสำหรับการนำไปใช้สร้าง DNA barcode คือมักไม่มีความเป็นมาตรฐานสากล กล่าวคือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนนี้ให้ผลสำเร็จน้อยมาก โดยเฉพาะในกลุ่มพืชไร่เมล็ดซึ่งให้ผลสำเร็จเพียง 10% ส่วนในพืชกลุ่มจิมโนสเปิร์มให้ผลประมาณ 83% และในพืชดอกให้ผลดีที่สุดประมาณ 90% (CBOL Plant Working Group, 2009)

ในปัจจุบัน ความพยายามในการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *matK* ให้ครอบคลุมพืชหลายกลุ่มนั้นยังไม่ประสบผลสำเร็จ โดยเฉพาะในพืชกลุ่ม จิมโนสเปิร์ม และพืชไร่เมล็ดที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้ยากหรือไม่ได้ผล (Sass *et al.*, 2007) แม้กระทั่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *matK* ในพืชดอกส่วนใหญ่ก็จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ถึง 2 คู่ หรือมากถึง 10 คู่ (Fazekas *et al.*, 2008; Lahaye *et al.*, 2008) รวมถึงจำเป็นต้องปรับสภาวะปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมแตกต่างกันไปในพืชแต่ละกลุ่มด้วย (Sass *et al.*, 2007; Fazekas *et al.*, 2008) ซึ่งนับว่าเป็นอุปสรรคสำคัญสำหรับการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเป็นสากล การพัฒนาไพรเมอร์ของยีน *matK* ให้ได้กับพืชหลายกลุ่มอาจเป็นไปได้ยาก แต่หากพัฒนาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับเฉพาะกลุ่ม เช่นกลุ่มพืชดอกที่นักวิจัยพัฒนาได้สำเร็จใกล้เคียง 100% (Fazekas *et al.*, 2008)

## 2.5 การจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล

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

## 2.6 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 ปฏิกริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม 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 ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกิริยา 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 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA Polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72°C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะถูกควบคุมสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบสามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 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 ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม ( $Mg^{++}$ ) อยู่ด้วย

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ 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 ดีเอ็นเอ ที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอัลตราไวโอเล็ตซึ่งจะเห็นแถบ ดีเอ็นเอ เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

ในปัจจุบัน เทคนิคทาง molecular phylogenetics เป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการศึกษาทางชีววิทยา ในหลากหลายสาขา โดยเป็นการอาศัยองค์ความรู้สมัยใหม่ด้านวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ สิ่งมีชีวิตมาช่วยกับการใช้ข้อมูลทางชีววิทยาเชิงโมเลกุลเช่น 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 เทคนิคการวิเคราะห์หากการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการของ ลำดับดีเอ็นเอและโปรตีน การสร้างแผนภาพ phylogenetic tree การอนุมานแผนภาพต้นไม้ phylogenetic tree การทดสอบทางสถิติแผนภาพ phylogenetic tree ตลอดจนการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree จากเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีสารสนเทศ (Information technology) หมายถึง กระบวนการต่างๆ และระบบงานที่จัดการ ให้ได้สารสนเทศที่ต้องการ มักอยู่ในลักษณะของฐานข้อมูล เช่น ฐานข้อมูลผู้ป่วยใน

โรงพยาบาล ฐานข้อมูลการลงทะเบียนเรียน ของนักศึกษาในมหาวิทยาลัย เป็นต้น ลักษณะของข้อมูลดิบ ดังกล่าว เมื่อปราศจากการจัดการด้วยกระบวนการทางสารสนเทศ มักจะมีปริมาณมาก ไม่เป็นระเบียบและยากต่อการเข้าถึง ปัจจุบัน การศึกษาทางชีววิทยาปัจจุบันในระดับโมเลกุล นักวิจัยทั่วโลกที่ทำงานทางอณูชีววิทยาก็มีเป็นจำนวนมาก ทำให้ข้อมูลการวิจัย ปริมาณมหาศาลถูกผลิตขึ้นในแต่ละวัน ไม่รู้จบสิ้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้ก็ต้องการวิธีการและระบบจัดการที่ดีเช่นกัน

## 2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนจากสาย โพลีเปปไทด์หลายๆ สายของทั้งหมด หรือส่วนหนึ่งของสาย โพลีเปปไทด์ (alignment) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนาย โครงสร้างโปรตีน บริเวณที่จัดเรียงกันกันได้ดีที่สุดในโครงสร้าง จะมีการแสดงผลออกมาโดยการทำงานของโปรแกรมซึ่งกำหนดค่า โดยผู้ใช้ การจัดเรียงที่ดีที่สุดนั้นมักเป็นการพยายามที่จะทำให้ ทั้งจำนวนของช่องว่างและลำดับกรดอะมิโนหรือดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) มีค่าน้อยที่สุด (เจษฎา เตนดวงบริพันธ์, 2545) การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากการจัดเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ เป็นประโยชน์ต่อการทำงานทางชีวโมเลกุลมาก ทางด้านการวิเคราะห์หายีน โครงสร้างของยีน เช่น ส่วนที่ทำหน้าที่ ควบคุมการทำงานของยีน (regulatory elements) ส่วนที่จะ ทำการแปลรหัสเพื่อให้ได้โปรตีน (coding sequence) ซึ่งสามารถ ประยุกต์ใช้ได้ในการบวนการโคลนเพื่อการสร้างโปรตีนลูกผสม ใหม่ๆ ขึ้น หรือแม้กระทั่งการจัดจำแนกและชี้เฉพาะสปีชีส์ของ สิ่งมีชีวิตโดยเทียบความคล้ายคลึงจากลำดับเบส และสร้าง แผนภาพ ต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตขึ้นมา เป็นต้น สำหรับในงานทางด้านโปรตีน มักเป็นการทำงานที่เกี่ยวกับการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของโปรตีน วิธีการที่ง่ายที่สุดประกอบด้วย การเทียบบริเวณหนึ่งบริเวณ หรือมากกว่าของโปรตีนเดียวกันแต่มาจากแหล่งที่มาที่ต่างกัน สามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ได้

โปรแกรมเปรียบเทียบโครงสร้างโปรตีนคู่เหมือนส่วนใหญ่ มักถูกออกแบบเพื่อให้มาเทียบ โครงสร้างโปรตีนคู่เหมือน (homologous protein) ที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน มีโปรแกรม จำนวนมากมายและมีหลายยุทธวิธีที่ใช้กันในปัจจุบัน ในบทความนี้ จะขอยกตัวอย่างโดยสังเขป เพื่อประกอบความเข้าใจเท่านั้น ตัวอย่างที่ยกมานี้เป็นเพียงหลักการเบื้องต้นของการทำงานที่ นักอณูชีววิทยาใช้ใน งานวิจัย โดยส่วนใหญ่กระบวนการนี้มี สองแบบ 1. สำหรับการประยุกต์เพื่อวัตถุประสงค์เชิงวงค์วาน วิวัฒนาการหรือที่เรียกกันว่าวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogeny) จำเป็นที่จะต้องสนใจจำนวนข้อมูลที่จะนำมาเทียบ วัตถุประสงค์ก็ เพื่อที่จะเพิ่มความเป็นไปได้ระหว่างการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน (alignment of nucleotide or amino acid sequence) ที่ใกล้เคียงกันที่ใกล้เคียงความจริง และเพื่อลดความ คลาดเคลื่อนทางสถิติให้มากที่สุดเช่นกัน 2. สำหรับงานที่ต้องการหาโปรตีนที่ ใกล้เคียงกับข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ นักวิทยาศาสตร์มักจะใช้โปรแกรมที่ สามารถทำการเทียบ ลำดับโดยหาบริเวณที่เหมาะสมได้โดย อัตโนมัติ โดยโปรแกรมจะทำการเลือกบริเวณการเริ่มเทียบโดย

อัตโนมัติได้ทันที เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติหรือโครงสร้างของ โปรตีนที่ต้องการศึกษากับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

## 2.8 ชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

เป็นศาสตร์เรียนรู้ด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงใหม่ที่จะเป็นวิชาการแขนงหนึ่งซึ่งมีความสำคัญมากที่สุดในการศึกษาวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตในศตวรรษที่ 21 ผู้เชี่ยวชาญหลายท่านถึงกับกล่าวไว้ว่าศาสตร์แขนงชีววิทยาในยุคใหม่นี้จะเปลี่ยนแปลงรูปโฉมจาก purely lab-based science ไปเป็น information science และแนวโน้มดังกล่าวก็เริ่มปรากฏให้เห็นเป็นรูปธรรมมากขึ้นในขณะนี้

ชีวสารสนเทศศาสตร์พัฒนามาจากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพด้านจีโนม จีโนมิกส์และโปรตีโอมิกส์ ประกอบกับพัฒนาการของวิทยาการทางด้านคอมพิวเตอร์และระบบฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตทั้งหลายไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ 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

สกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูปของ RBC Bioscience โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและชุดสกัดสำเร็จรูปดังนี้

1.1 นำใบข้าวที่เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

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 (กลับหลอดทุก5นาที)

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 GP3จำนวน 750 ไมโครกรัม (รวมเป็น 1,250 ไมโครกรัม) เป็นต้น นำไปปั่นบน vortex เป็นเวลา 5วินาที

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 (หรือข้อ12) (~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 96-100เปอร์เซ็นต์) ลงใน GD column แทน buffer)

23. นำ GD column ที่แห้งวางลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ (ต้องตัดฝาที่ก่อน)

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 butter ซึมซับไปทั่วกลางของ GD column และทำการละลาย DNA ออกมา) นำไปปั่น 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้ง GD column ไปได้ สารละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา

26. ถ่ายสารละลาย DNA ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝาลงในหลอด 1.5 อันใหม่ หรือหลอด PCR ปิดฝาให้สนิท รััดด้วย Para film ให้แน่น ใส่ถุงพลาสติก ชนิดแช่แข็ง ตัดฉลากให้เรียบร้อย 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. การตรวจหาสายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

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

2. ตรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์มาทดสอบกับดีเอ็นเอหนึ่งตัวอย่าง เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบสายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตรต่อหลอด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. DNA templat (50 ng/ ไมโครกรัม)	1.0	50 ng
3.MgCl <sub>2</sub> (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 <sub>2</sub> 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 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel

- นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.2
- ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ลำดับที่	ไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จาก ปลาย 5' ไปยัง 3'
1	F	5' GCTGCGGAATCTTCTACTGG 3'
	R	5' CCAAAGATCTCGGTCAAAGC 3'
2	F	5' GACAACTGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' CCCCAGGGTGTCTAAAGT 3'
3	F	5' GACAACTGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' ATCGCGTCCTTCATTACGAG 3'

### 3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (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<sub>2</sub> ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์

TaqDNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาอุทกโซลิมเมอร์ส (Swift.Maxfro.Thermal Cyclers,ESCO,Singapore) ตั้งโปรแกรมนำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (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 การตรวจสอบผลปฏิกิริยา 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 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์หากชิ้นยีนมีขนาดใหญ่ 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 ด้วยเหตุนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้ดีขึ้น

## 4. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (per องค์ศาเซลเซียส 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 แต่ละตำแหน่งที่มีความหลากหลายแบบทางพันธุกรรม (polymorphic ionic sea shell species) ด้วยวิธี likelihood ratio test (Yeh *et al.*, 1999) และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test ตรวจสอบวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากร โดยจะปรับจีโนมไทป์และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-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 และปรับจีโนมไทป์ใช้โปรแกรม 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 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรทุกคู่ ใช้การวิเคราะห์ค่า  $P$  ของ  $F_{st}$  ระหว่างคู่ประชากร ( $PF_{st}$ ) และวิธี exact test ( $P_{exact}$ ) ภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า  $P$  ที่ได้รับการปรับโดยใช้ Bonferroni correction เพื่อความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests 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 คลิกข้อความ 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. ทาการสร้าง 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/ $\mu$ l)

พันธุ์ข้าว	ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ $\mu$ l)		
	สกัดครั้งที่		
	1	2	3
ข้าวเก่า	561.7	612.2	628.0
ข้าวสันป่าตอง	631.5	553.6	592.6
ข้าวเขี้ยววูง	582.5	681.7	538.4
ข้าวพญาลิ้มแกง	642.2	621.4	642.2
ข้าวลิ้มผิว	594.6	601.2	616.2
ข้าวหอมแดงสุโขทัย	631.2	621.2	610.2
ข้าวหอมมะลิแดง	533.5	552.6	522.4
ข้าวหอมนิล	593.3	648.2	655.5
ข้าวมันปู	628.4	612.0	538.2
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	619.2	610.4	583.7

หลังจากการสกัดดีเอ็นเอ หาคความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และหาความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}/A_{280}$ ) หากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ที่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจากการตรวจสอบดังกล่าวได้ค่าสัดส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  ดังตารางที่ 4.2

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

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}/A_{280}$ )					
พันธุ์ข้าว	ข้าวที่	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1	ข้าวกำ	2.1	1.9	1.6	5.6
2	ข้าวสันป่าตอง	1.8	1.9	1.7	5.4
3	ข้าวเขี้ยวงู	1.9	1.7	1.7	5.3
4	ข้าวพญาลิมาแกง	1.7	1.7	1.9	5.3
5	ข้าวลิ้มผัว	1.9	1.9	1.8	5.6
6	ข้าวหอมแดงสุโขทัย	2.0	1.9	1.9	5.8
7	ข้าวหอมมะลิแดง	2.1	1.8	1.7	5.6
8	ข้าวหอมนิล	1.6	1.9	1.9	5.4
9	ข้าวมันปู	1.8	1.8	1.9	5.5
10	ข้าวไรซ์เบอร์รี่	1.8	2.0	1.9	5.7

ภายหลังจากการวัดค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแล้ว นำมาตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟเรซิส และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Spectrophotometer เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ หากขึ้นจีโนมิกดีเอ็นเอมีความสมบูรณ์ ไม่แตกหักเสียหายมากนัก ดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะรวมตัวกันอยู่บริเวณด้านบนของเจลและมักไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลลงไปยังด้านล่างได้มากนัก การสกัดดีเอ็นเอของพืชควรเลือกใบอ่อนของพืช เพราะเป็นแหล่งของดีเอ็นเอที่แท้จริง และสอดคล้องกับการทดลองของ Michiels *et al.* (2003) ที่ได้ศึกษาการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบของพืชโดยการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของใบอ่อนและใบแก่ พบว่า ใบพืชอ่อนจะมีองค์ประกอบของสารประกอบประเภทพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) และพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compounds) น้อยกว่าใบแก่ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะมีผลต่อปฏิกิริยากับโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้สารประกอบพอลิแซคคาไรด์และพอลิฟีนอลิกยังมีผลในการยับยั้งดีเอ็นเอในขั้นตอนการสกัดอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Lim *et al.* (1997) ภายหลังจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล พบว่า ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและอาจมีการปนเปื้อนของสารทุติย

ภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีอยู่ในพืช จากดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาตรวจสอบโดยวิธีการเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส

## 2. การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

### 2.1 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว

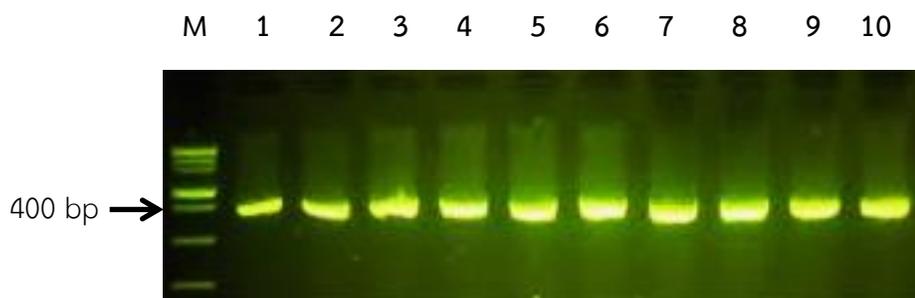
ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกันตามความสามารถของไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถเข้าจับกับจีโนมดีเอ็นเอของข้าวในแต่ละตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มีจำนวนทั้งหมด 3 คู่ ดังตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.3** ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าว

ลำดับที่	ไพรเมอร์	นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จาก ปลาย 5' ไปยัง 3'
1	F	5' GCTGCGGAATCTTCTACTGG 3'
	R	5' CCAAAGATCTCGGTCAAAGC 3'
2	F	5' GACAACTGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' CCCCAAGGGTGTCTAAAGT 3'
3	F	5' GACAACTGTGTGGACCGATG 3'
	R	5' ATCGCGTCCTTCATTACGAG 3'

## 3. การวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าว ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อตรวจสอบด้วย agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบไพรเมอร์ทุกเส้นที่ใช้ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวจากไพรเมอร์แต่ละเส้นมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกันดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์จากดีเอ็นเอข้าว บน agarose gel 1.5 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 ข้าวเขี้ยววง Lane ที่ 8 คือ ข้าวหอมนิล

Lane ที่ 4 คือ ข้าวพญาลิ้มแกง Lane ที่ 9 คือ ข้าวมันปู

Lane ที่ 5 คือ ข้าวลิ้มผัว Lane ที่ 10 คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่

#### 4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการด้วยยีน *rbcL*

จากเหตุผลดังกล่าว จึงต้องมีการศึกษาการใช้ยีน *rbcL* ร่วมกับการจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทนยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับสปีชีส์และยังสามารถจำแนกได้ลึกกว่าระดับสปีชีส์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ศึกษายีน *rbcL* หรือ Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase/oxygenase ซึ่งเป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) เอนไซม์ RubisCO ที่สมบูรณ์ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กรวมตัวกัน จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ  $\text{CO}_2$  ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcL* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (Kress & Erickson, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010) จุดเด่นของยีน *rbcL* ที่ CBOL Plant Working Group พิจารณาว่าเหมาะ

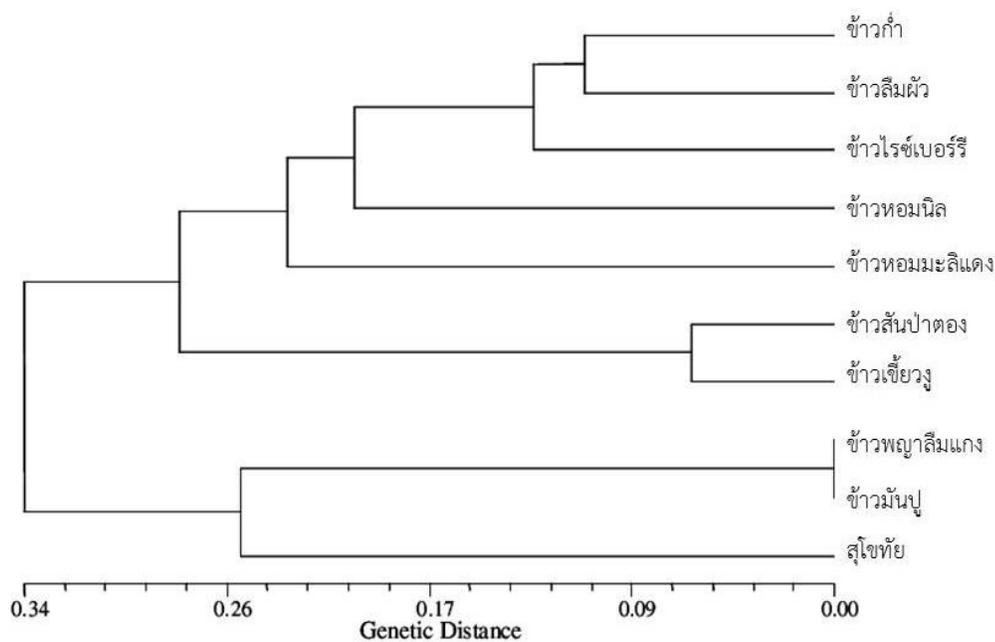
สำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานคือ มีความเป็นมาตรฐานสากล และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก จากการศึกษาดังกล่าว จึงได้นำข้อมูลข้างต้นมาใช้ในการร่วมกันในจำแนกข้าวน้ำดอกไม้อันแต่ละพันธุ์ปลูกเพื่อ แสดงถึงลักษณะการมีความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการ

## 5. การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> และได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไฟล์แบบ FASTA format จากข้าว ดังแสดงต่อไปนี้

```
5'GTTACAAAGGACGATGCTACAACATTGAGCCCGTGGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGT
AGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGT
ATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTAGAGGATCTACGAATCCCTACCGCGTATATAAAAA
CTTTCCAAGGACCACCGCATGGGATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCTTA
TTGGGATGTACTATTAACCGAAATTAGGTTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATG
TCTACGTGGTGGACTTGACTTTACCAAAGACGATGAGAACGTGAACTCCCAACCATTTATGCGTTGGA
GAGACCGTTTCCTATTTTT3'
```

จากข้อมูลพบว่า ข้าวทุกสายพันธุ์ที่ทำการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ มีข้าวบางพันธุ์ ได้แก่ ข้าวเขี้ยวงู ข้าวมันปู ข้าวสันป่าตอง ให้สัญญาณการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ไม่ตื้นัก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังอยู่ใน บริเวณที่คาบเกี่ยวกับสายพันธุ์อื่น และเมื่อทำการศึกษา ซึ่งเทียบได้จากค่า genetic distant เพื่อหา ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกันโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 ในการเปรียบเทียบลำดับเบสของ ยีน *rbcl* ระหว่างพันธุ์ปลูกข้าวน้ำดอกไม้อันข้างต้น ใช้โปรแกรม CLUSTAL X (1.83) ในการทำ multiplealignment และใช้โปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1 ซึ่งเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ที่มีความใกล้ชิดกันของข้าวในโอโซเลตต่างๆ จะเห็นได้ว่า ข้าวแต่ละ พันธุ์มีค่า genetic distant ดังนี้คือ ข้าวเก่า = 0.12 ข้าวสันป่าตอง = 0.28 ข้าวเขี้ยวงู = 0.07 ข้าวพญาลิ้ม แกง = 0.001 ข้าวลิ้มผัว = 0.12 ข้าวหอมแดงสุโขทัย = 0.24 ข้าวหอมมะลิแดง = 0.23 ข้าวหอมนิล = 0.20 ข้าวมันปู = 0.25 และข้าวไรซ์เบอร์รี่ = 0.13 ซึ่งจากค่าดังกล่าว ค่าที่ได้หากยิ่งมีค่ามาก แสดงว่า สิ่งมีชีวิตนั้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสิ่งมีชีวิตที่เปรียบเทียบกับกันค่อนข้างน้อย ซึ่งจะเห็นได้ว่า ข้าว น้ำดอกไม้อันมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์ ปลูกอื่นๆดังแสดงจากการสร้าง Phylogenetic tree ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวงศาวิวัฒนาการของข้าวที่ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวจำนวน 10 พันธุ์ปลูก ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* พบว่า สามารถสร้าง cluster ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวที่ใช้ในการศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยในกลุ่มแรก พันธุ์ข้าวที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด ได้แก่ ข้าวเก่า และข้าวลิ้มฝัว และข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมนิล ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวสันป่าตองและข้าวเขี้ยววู ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ 2 จัดความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด ได้แก่ ข้าวพญาลิ้มแกง และข้าวมันปู และลำดับต่อมาคือข้าวสุโขทัย ตามลำดับ

## 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) วิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ลำดับของยีน *rbcl* ด้วยโปรแกรม PhotoCaptMw จากนั้นนำไปวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสร้างเป็น dendrogram และตาราง metrix จากโปรแกรม SPSS แล้วพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มข้าวออกเป็น 2 โดยในกลุ่มแรก พันธุ์ข้าวที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด ได้แก่ ข้าวเก่า และข้าวลิ้มผิว และข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมนิล ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวสันป่าตองและข้าวเขี้ยววงตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ 2 จัดความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด ได้แก่ ข้าวพญาลิ้มแกง และข้าวมันปู และลำดับต่อมาคือข้าวสุโขทัย ตามลำดับ

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 ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS จะเป็นข้อมูลที่ดี และมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genbank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่ม และพบว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcl* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่า จึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิด และน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืช แต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งานจริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในแง่ของการนำมาใช้เป็น DNA barcode ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวนี้ จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวิธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2543. การพัฒนาการเกษตรไทยยุค เทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ.วิจัย  
มูลนิธิข้าวไทย. (2554). รู้เรื่องข้าว จุดกำเนิดและประวัติข้าวไทย. ค้นเมื่อ 15 มีนาคม 2558,  
จาก [http://www.thairice.org/html/aboutrice/about\\_rice.htm](http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice.htm).
- สถาบันวิจัยข้าว. (2538). **การทำน่าน้ำฝน**. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์เกษตรแห่งประเทศไทย.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 116 หน้า. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและ  
เครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟ  
แอลพี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Brown, S.M., Szewc-McFadden, A. K., and Kresovich, S. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. *In*. Methods of plant genome analysis : Their merits and pitfalls. Jauhar, P.P. (ed.). CRS Press, Boca raton, FL. U.S.A. Pp. 147-159.
- 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.
- 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.
- 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.
- Goudet J. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3. 2001. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>  
Updated from Goudet (1995)
- 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.
- 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 Vasil, I.K. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. Pp.8-38.
- Maclean, J.L., Dawe, D.C., Hardy, B. and Hettel, G.P. editor. (2002). *Rice Almanac: Source book for the most importance economic activity on earth*. 3rd ed. Wallingford: CABI Publishing.
- McCouch, S., and Tanksley, S.D. 1991. Development and use of restriction fragment Length polymorphisms in rice breeding and genetic. In *Rice biotechnology*.
- Powell, W., Machray, C., and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci.* 1: 215-222.
- Rahman M, Vahter M, Wahed MA, Sohel N, Yunus M, Streatfield PK, et al. 2006. Prevalence of arsenic exposure and skin lesions. A population based survey in Matlab, Bangladesh. *J Epidemiol Community Health* 60(3):242–248.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.M. & 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.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., and Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology*. 7:257-264.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zebeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprintings. *Nucleic. Acids. Res.* 23:4407-4414.
- Waugh, R., and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *BTECH*. 10:186-191.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley PF. MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes*. 2004;4:535–538.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle, 1999. POPGENE 32-version 1.31. Population Genetics Software.

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)

**ตารางที่ ก1 ความเข้มข้นที่ปริมาณสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน**

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
$\beta$ -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

## 11. อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ (Agarose Gel Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงสร้างของโมเลกุลของสาร การแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส มักทำให้ตัวกลางที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่พวกโพลีเมอร์ สำหรับดีเอ็นเอนิยมแยกโดยใช้อะกาโรส หรือโพลีอะครีลาไมด์เป็นตัวกลาง การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แยก บ่งชี้และทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากการเตรียมอะกาโรสเจลทำได้สะดวกกว่าการเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล การตรวจหาแถบของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันสามารถทำได้โดยการย้อมอะกาโรสเอธิเทียมโบรไมด์ แล้วตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเรืองแสง (fluorescence) เมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัมสามารถถูกตรวจพบได้โดยวิธีนี้ การแยกดีเอ็นเอโดยโพลีอะครีลาไมด์ยุ่งยากกว่า แต่มีอำนาจการแยก (resolving power) สูงกว่าอะกาโรสเจลมากโดยสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงคู่เบสเดียวออกจากกันได้ จึงใช้ได้ดีในเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

### อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อะกาโรสเป็นสารโพลีเมอร์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ถ้ากำหนดให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้นตรง ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโมเลกุลกับระยะทางที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถแสดงได้ในรูปของกราฟซึ่งจะเห็นว่าสำหรับแต่ละความเข้มข้นของอะกาโรสเจล จะมีช่วงที่การเคลื่อนที่กับ  $\log$  ของขนาดโมเลกุลมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ซึ่งช่วงขนาดของดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางนั้นได้รวบรวมไว้

ในปัจจุบันมีการใช้อะกาโรสในงานอิเล็กโทรโฟรีซิสเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก ผู้ผลิตหลายบริษัทจึงทำการผลิตอะกาโรสชนิดพิเศษสำหรับใช้ในงานอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเฉพาะซึ่งเป็นอะกาโรสที่บริสุทธิ์ปราศจากสารเจือปนซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไปหลังจากแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล และปราศจากการปนเปื้อนจากนิวคลีเอสซึ่งทำลายกรดนิวคลีอิก

ในการเตรียมเจลจะนำอะกาโรสมาหลอมในบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ประมาณ 8 แล้วเทลงในภาชนะเจลเมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วจึงทำการหยดดีเอ็นเอลงในหลุมแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เจล ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ต่อไปนี้

#### 1. ขนาดของดีเอ็นเอ

อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผกผันกับ  $\log_{10}$  ของจำนวนคู่เบสดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าเพราะมีแรงเสียดทานมากกว่าและโมเลกุลจะเคลื่อนผ่านรูของเจลยากกว่า

## 2. ความเข้มข้นของอะกาโรส

ขณะที่ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ารูมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะสูงกว่าเจลที่มีรูขนาดเล็ก ขนาดของรูภายในเจลจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส อะกาโรสยิ่งมีความเข้มข้นมากรูภายในจะมีขนาดเล็กลง การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสจะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส ตามสมการ

$$\log u = \log u_0 - Kr T$$

$u$  = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจล

$u_0$  = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสภาพที่ไม่มีอะกาโรสเจล

$Kr$  = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)

**ตารางที่ ก2** ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ไปในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%)	ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด(กิโลเบส)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

## 3. โครงรูปของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่อยู่ในโครงรูปที่ต่างกันจะเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลในอัตราที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล ความแรงของกระแสไฟฟ้าและความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ โดยทั่วไป สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ โครงรูปแบบซูเปอร์เฮลิคัล (superhelical) จะเคลื่อนที่เร็วกว่าแบบเส้นตรง (linear) ส่วนแบบวงกลมนิก (nicked circular) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด

## 4. องค์ประกอบของบัฟเฟอร์

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้สำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอมี 4 ชนิด ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 2 นิยมเตรียมบัฟเฟอร์เข้มข้นเก็บไว้ เช่น 10X buffer หมายความว่า เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10

เท่าของความเข้มข้นที่ใช้จริง TAE, TPE และ TBE ใช้กับดีเอ็นเอสายคู่ ส่วนบัฟเฟอร์ต่าง(alkaline buffer) ใช้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

**ตารางที่ 3** บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้ในอิเล็กโทรโฟรีซิส (working solution)	บัฟเฟอร์เข้มข้น/1000 ml (stock solution)
Tris-acetate(TAE)	1X:0.04 M Tris-acetate 0.001 M EDTA	10X:48.4 g Tris base 11.4 ml glacial acetic acid 20 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0 )
Tris-phosphate(TPE)	1X:0.09 M Tris- phosphate 0.002 M EDTA	10X:108 g Tris base 15.5 ml 85% phosphoric acid 40 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0 )
Tris-borate(TBE)	0.5X:0.045 M Tris- borate 0.002 M EDTA	5X:54 g Tris base 27.5 ml boric acid 20 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0 )
Alkaline Buffer	1X:50mM NaOH 1 mM EDTA	10X:5 ml 10 N NaOH 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

วัสดุและอุปกรณ์

1. agarose (electrophoresis grade)
2. 5x TBE buffer
3. Ethidium bromide 10 mg/ml
4. 10 x gel loading buffer
5. electrophoresis chamber(mini gel)
6. power supply
7. UV transilluminator
8. Polaroid Camera

### วิธีทำ

1. เตรียมภาตรองเจล (gel mould) วางบนพื้นเรียบ
2. ชั่ง agarose จำนวนที่ต้องการลงในพลาสติก เติม electrophoresis buffer (1 X TBE) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยทั่ว ๆ ไป mini-gel มักใช้ปริมาณ agarose 35-40 ml ถ้าต้องการเตรียม 0.8 % agarose gel ใช้ agarose 0.32 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 40 ml
3. ทำให้ agarose ละลายโดยแช่พลาสติกในน้ำเดือด หรือในเตาไมโครเวฟนาออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นลงถึงประมาณ 60 °C เติม ethidium bromide (10 mg/ml) ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 µg/ml (2 ไมโครลิตรต่อ 40 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนพลาสติกเบาๆ
4. เท agarose ลงในภาตรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศวาง comb ลงที่ปลายด้านหนึ่งของภาตรองเจล ให้ซี่ของ comb อยู่ห่างจากปลายของเจลประมาณ 1 ซม. รอให้เจลแข็งตัว
5. หลังจากเจลแข็งตัว นำภาตไปวางใน electrophoresis tank เท buffer (1X TBE) ลงไปจนท่วมเจลให้บัฟเฟอร์ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มม. ค่อยๆ ดึง comb ออก
6. ผสม DNA sample กับ gel-loading buffer แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องโดยใช้ disposable micropipette (gel-loading buffer คือบัฟเฟอร์ที่มีสีส้ม 2 ชนิด คือ bromphenol blue กับ xylene cyanol, bromphenol blue จะเคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอกๆ กับดีเอ็นเอซึ่งยาวประมาณ 300 คู่เบสและเคลื่อนที่เร็วกว่า xylene cyanol ประมาณ 2.2 เท่า xylene cyanol เคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอกๆ กับดีเอ็นเอคู่ซึ่งยาวประมาณ 4 kb นอกจากนี้ยังมี glycerol หรือ sucrose ผสมอยู่ เพื่อถ่วงให้ดีเอ็นเอตกลงสู่ก้นหลุม มักจะเตรียม gel - loading buffer ที่เข้มข้นกว่าที่ใช้จริง 10 เท่า ดังนั้น ถ้ามีดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ 10 ไมโครลิตร ใช้ gel - loading buffer 1 ไมโครลิตร ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด ดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมใช้คือ แลมด้าดีเอ็นเอ ตัดด้วยเอนไซม์ Hind III หรือ Eco RI หรือทั้งสอง
7. เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ปิดฝา electrophoresis chamber แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ตั้ง voltage สูงประมาณ 1-5 โวลต์/ซม. ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จาก cathode (ขั้วสีดำ) ไปยัง anode (ขั้วสีแดง) อย่่าตั้ง voltage ให้สูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะทลายดีเอ็นเอ โดยทั่ว ๆ ไปสำหรับ mini-gel ใช้ 50-60 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อ bromphenol blue เคลื่อนไปได้ประมาณ 80 % ของความยาวเจล หยุดกระแสไฟฟ้า นำเจลออกมาแล้วนำไปวางบน UV Transilluminator เพื่อตรวจดูผลการแยก บันทึกภาพด้วยกล้องโพลาไรด์

**การเตรียมสารละลาย**

1. 5x TBE (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTAO

54 กรัม Tris base

27.5 กรัม Boric acid

20 ml 0.5 M EDTA(pH8.0)

**ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร**

2. 1 x TBE

5 x TBE 1 ส่วน:น้ำ 4 ส่วน

3. 10 mg/ml ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร โดยการกวนบน magnetic stirrer 1-2 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ (ethidium bromide อาจเป็น strong mutagen สวมถุงมือตลอดเวลาที่เกี่ยวข้องกับสารนี้)

4. 10 x gel-loading buffer

0.4 % bromophenol blue

0.4 % xylene cyanol

50 % glycerol in water

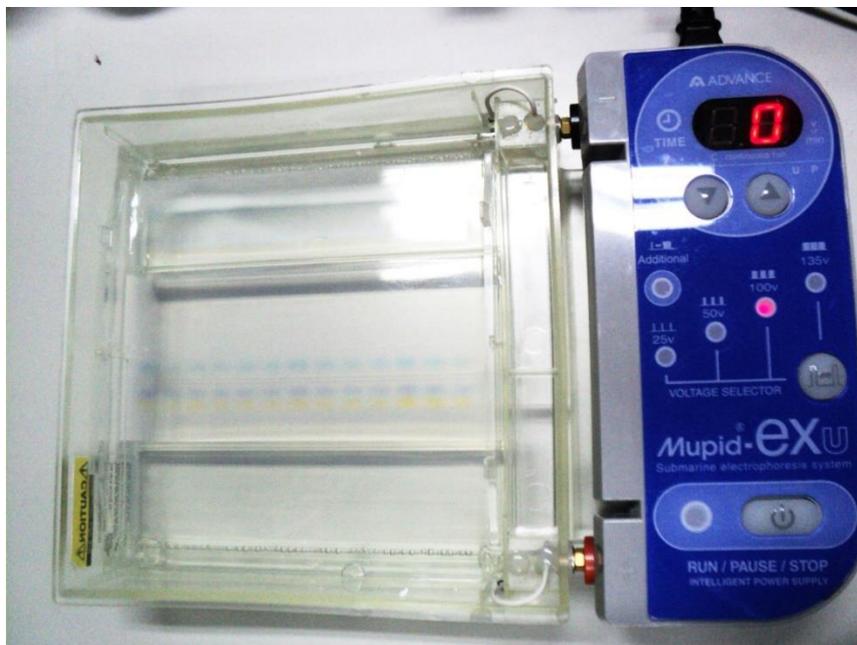
ภาคผนวก ข



ภาพที่ ข1 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)



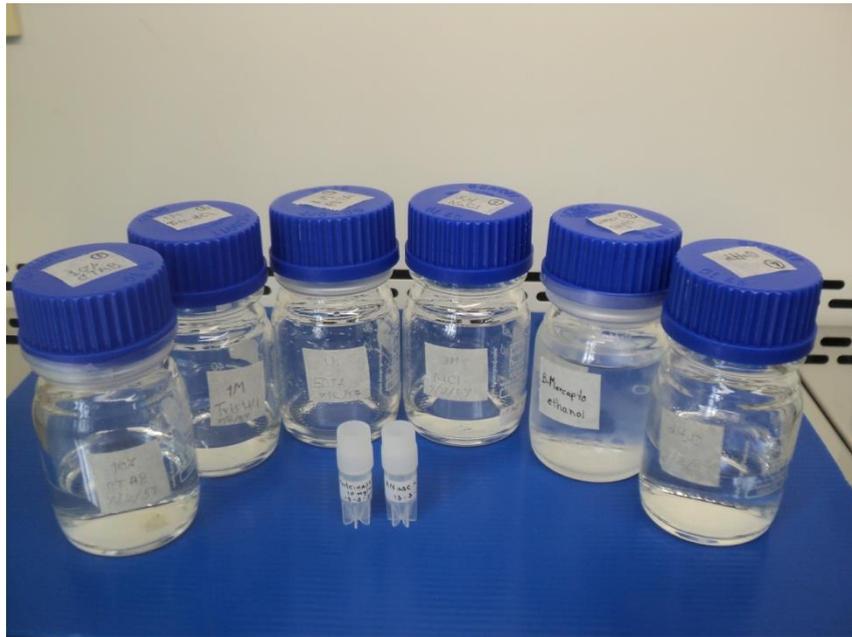
ภาพที่ ข2 ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)



ภาพที่ ข3 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System)



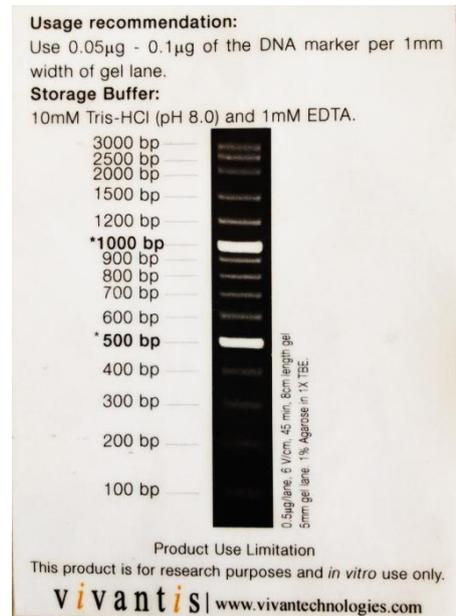
ภาพที่ ข4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)



ภาพที่ ข5 สารละลายต้นตอที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB



ภาพที่ ข6 Agarose gel (Invitrogen™)



ภาพที่ ข7 DNA Marker หรือ DNA Ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)



ภาพที่ ข8 ชุดสกัดดีเอ็นเอ RBC bioscience DNA plant kit

ภาคผนวก ค

### วิธีเปิดเครื่องบันทึกภาพ Dark Hood DH-50 รุ่นDH-50

1. เปิดสวิทช์ทางด้านหลังของเครื่อง Dark Hood D-50
2. เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์แล้วไปที่โปรแกรม bio step argusX1 จะมีหน้าต่าง Bio step กด  
เครื่องหมาย ✓
3. กดปุ่ม camera ด้านซ้ายมือเกิดหน้าต่าง USB Camera
4. กดปุ่ม Live image เพื่อดูสภาพสดในเครื่อง ถ้าไม่มีของอยู่ในเครื่องน่าจจะเป็นสีดำจากนั้นกดปุ่ม  
Top-light White  ปุ่มสีขาว จากนั้นกด สีเหลือง
5. ไปที่ Transmission light กดปุ่มขวาสุด  กดแล้วจะกลายเป็นสีเหลือง จากนั้นภาพของจริงที่อยู่  
ใน dark hood ปรากฏในจอที่มีด
6. สามารถถ่ายภาพได้โดยกด Exposure (ภาพถ่าย) แล้วกด proceed จะเกิดภาพขยายปิดจอเล็ก  
แล้วไปกดที่ Export เกิดหน้าจอ Export
7. ขึ้นไปเมนูข้างบนเกิดหน้าจอ Export image ตั้งชื่อไฟล์แล้วกด Save

## ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง  
Mr. Surachest Aiumsumang

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3679800097588

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์  
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์  
83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000  
โทรศัพท์ มือถือ 0899612694  
e-mail : tophesun@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. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์

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

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

เบญจพร ศรีสุวรรณาศ และสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2559. The effect of acute gamma ray irradiation through *rbcl* gene in Thai sweet *Tamarindus indica* L. ในรูปแบบ proceeding ในงาน Tokyo international conference on engineering and applied science และ International conference on biological, chemical and environmental science ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 14-15 สิงหาคม 2559

กาญจน์ คุ่มทรัพย์ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง. 2559. การจัดการธาตุอาหารพืชเพื่อเพิ่มคุณภาพผลผลิตมะม่วงน้ำดอกไม้ในพื้นที่ตำบลดงมูลเหล็ก อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ในรูปแบบ proceeding ในการประชุมระดับชาติเครือข่ายวิจัยสถาบันอุดมศึกษาทั่วประเทศ ครั้งที่ 11 เครือข่ายวิจัยอุดมศึกษา สานพลังประชารัฐ วันที่ 19-20 ธันวาคม 2559 ณ สรุสนาคาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง เบญจพร ศรีสุวรรณาศ และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2560. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในมะม่วงบางสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*. การประชุมสัมมนาวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 17 "บูรณาการงานวิจัยสู่การพัฒนาท้องถิ่นที่ยั่งยืน" ศูนย์วัฒนธรรมภาคเหนือตอนล่าง วังจันทน์ริเวอร์วิว มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ในวันที่ 21 กรกฎาคม 2560

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง เบญจพร ศรีสุวรรณาศ และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์. การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ในการประชุมวิชาการ (ปอ มท.) ประจำปี พ.ศ. 2560 “กระทรวงอุดมศึกษาแก้ปัญหาการศึกษาได้จริงหรือ” การประกาศเกียรติคุณผู้ที่ได้รับการยกย่องให้เป็นอาจารย์ดีเด่นแห่งชาติและการนำเสนอผลงานการวิจัยสหวิทยาการ (Interdisciplinary Conference) วันที่ 23 – 25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2560 ณ โรงแรมเจริญธานี ปริ๊นเซส จังหวัดขอนแก่น.

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

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, สมพงษ์ แสนเสนยา และ สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง. 2558. การตรวจสอบเพื่อระบุข้าวพันธุ์ปลูกพื้นเมืองเพชรบูรณ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL. การประชุมวิชาการจีโนมิกส์ ชีวสารสนเทศศาสตร์ และชีววิทยาเชิงระบบ. สมาคมพันธุศาสตร์ไทย. 10-11 พฤศจิกายน 2558 ณ ไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

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

Artit Hutem 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 สารสกัดสมุนไพร สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ ที่มีต่อเชื้อราจากมะขามหวานพันธุ์ประกายทองในห้องปฏิบัติการ. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปีการศึกษา 2552.

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

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาตุลย์ จงรักษ์ ประยูร ลิ้มสุข และ กฤษณ์พันธ์ พรรณรัตน์ชัย. 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 โรงแรมรอยัลแม็องหนองคาย ประเทศไทย

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2551. **การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรพญาพานโดยการใช้สมุนไพร** เพชรบูรณ์:คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนสถาบันวิจัยและพัฒนาประจำปี 2551 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, อาตุลย์ จงรักษ์ ,ประยูร ลิ้มสุข และ กฤษณ์พันธ์ พรรณรัตน์ชัย .2550.

**ศึกษาการผลิตผักโขมที่ปราศจากสารก่อนิ่ว(แคลเซียมออกซาลेट) โดยวิธีไฮโดร โพนิกส์เพื่อเป็นต้นแบบไปสู่ภาคธุรกิจ** เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนงบประมาณแผ่นดินโดยผ่านการพิจารณาจาก วช. 2550

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2549. **การศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสบู่ดำโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฝังตัวอย่างในพาร์ฟฟิน.** เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2549

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2548.**คุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแคลสผักโขมหนามที่ปราศจากสารก่อนิ่ว.** เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2547. **ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแคลลัสในผักโขม 3 ชนิด (ผักโขมจีน, ผักโขมหนามและผักโขมหัด) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** ISBN 974-7479-83-4 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2547
- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2546.**ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นแฮพลอยด์(๓)จากอับละอองเรณูของ ช่อนกลิ้ง.** ISBN 974-7479-62-1 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2546
- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2545. **การศึกษาคุณค่าทางอาหารของแคลลัสจากมะขามหวาน 4 สายพันธุ์ (ประกายทอง, สีทอง, ศรีชมภู และขันตี).** ISBN 974-7479-50-8 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2545
- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และคณะ. 2545. **ศึกษาการเพาะเมล็ดแก้วมังกรด้วยเทคนิค Embryo Rescue.** เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์
- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2544. **การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานในหลอดแก้ว.** ISBN 974-7479-44-3 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2544
- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2526.**ความผิดปกติของโครโมโซมในลิ้มไฟไซท์ของคนเนื่องมาจากวิตามินซี.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, พรทิพย์ พุ่มภาชี, นุจรี เผือกใต้, และ ศุภเกียรติ ประเสริฐสังข์. 2544. **ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในแคลลัสจากมะขามหวาน 3 สายพันธุ์ (สีทอง, ประกายทอง 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 มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ เมื่อ พ.ศ. 2526

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