



รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกาแฟในพื้นที่
อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล
เอสเอสอาร์

Study on Genetic Diversity of Coffee in Khao Kao District
Phetchabun Province by SSR Marker Technique.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกาแฟในพื้นที่
อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล
เอสเอสอาร์

Study on Genetic Diversity of Coffee in Khao Kao District
Phetchabun Province by SSR Marker Technique.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

กาญจน์ คุ่มทรัพย์

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ที่พิจารณาโดยผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประเภทโครงการสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อสร้างความเป็นเลิศทางวิชาการ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

(ก)

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกาแฟในพื้นที่อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์
ผู้วิจัย	สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง
ผู้ร่วมวิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาญจน์ คุ่มทรัพย์
สาขาวิชา	ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 2562

บทคัดย่อ

กาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดเพชรบูรณ์ มีการส่งเสริมให้ปลูกเพื่อสร้างรายได้ให้กับเกษตรกร และมีการพัฒนาพันธุ์อย่างต่อเนื่อง และเนื่องจากกาแฟมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุ์กาแฟโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เพื่อจำแนกกาแฟ 10 สายต้น โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส วิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ Hierarchical cluster Analysis โดยโปรแกรม SPSS ผลการวิเคราะห์ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟมีค่าอยู่ในช่วง 1.00-7.00 ผลเดนไดรแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ (7-4,5) , (7-1,7) , (5-6,63) , (5-3,104) , (5-4,104) , (5-2,74) , (5-2,87) ,(4-1,1) และ (4-1,53) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ (4-1,39) จากการศึกษาพบว่า เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์สามารถจำแนกกาแฟออกเป็นกลุ่มได้แม้กาแฟเป็นชนิดเดียวกันแต่มีการผสมข้ามมาแล้วหลายรุ่นเพื่อเป็นการหาความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์และแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์กาแฟให้มีคุณภาพที่ดีต่อไป

คำสำคัญ : กาแฟ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

Title Study on Genetic Diversity of Coffee in Khao Kao District Phetchabun Province by SSR marker technique.

Author Surachest Aiumsumang.

Co- author Assist. professor Dr. Kan Khoomsab.

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

Date 2019

ABSTRACT

Coffee is an important economic crop of Phetchabun province. Is encouraged to grow to generate income for farmers and have continuously developed varieties and the coffee has a high genetic diversity. The objective of this research was to investigate the relationship of coffee by using the SSR molecular marker to identify the 10 lines. DNA extraction by DNA extraction kits Increase the DNA fragments by polymerase chain reaction and genetic relationship analysis by SSR marker. Analysis of genetic relationship structures by unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) and genetic relationships with Hierarchical cluster by SPSS. The results of the genetic proximity index analysis of coffee are in the range of 1.00-7.00. The dendrogram can be grouped according to the relationship and genetic intimacy into 2 groups: group 1 (7-4,5), (7-1,7), (5-6,63), (5-3,104), (5-4,104), (5-2,74), (5-2,87), (4-1,1) and (4-1,53). The second group is (4-1, 39). In this studies, it has been found that SSR molecules can be classified into groups, even though coffee is the same type, but there are many crosses, In order to find the purity of the species and the way to improve the quality of the coffee varieties.

Keywords: coffee (*Coffea* spp), genetic relationship, SSR marker.

(ค)

กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่เอื้อเฟื้อวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ นายภูวดล เตโซ เจ้าพนักงานการเกษตร ส.2 และ นายพงศ์ธร วรรณกิจ นักวิชาการเกษตร ประจำศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์(เขาค้อ) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบกาแฟ แนะนำให้ข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์และความเป็นมาในการพัฒนาสายพันธุ์กาแฟในอำเภอเขาค้อและอำเภอใกล้เคียง ตลอดจนข้อมูลต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างมากและทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี ขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง

25 กรกฎาคม 2562

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อ	ข
ภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1	บทนำ
	1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
	2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
	3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
	4. ขอบเขตของการวิจัย 3
	5. ขอบเขตระยะเวลา 3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
	2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับกาแฟ 4
	2.2 การศึกษาพันธุ์กรรมของกาแฟในระดับโมเลกุล 8
	2.3 การศึกษาในระดับโมเลกุลด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 11
	2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุล SSR 15
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย 19
	3.1 การสกัดดีเอ็นเอ 19
	3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ 21
	3.3 การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 22
	3.4 การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel 24
	3.5 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล 24
	3.5 การสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS 25
	Statistics Data Editor

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4	ผลการวิจัย
	4.1 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
	4.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
	4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟ
	จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR
	4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการด้วยยีน <i>rbcl</i>
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	
	ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมี
	ภาคผนวก ข. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี
	ภาคผนวก ค. ข้อมูลการวิเคราะห์ผลการทดลองและรายละเอียด
	ลำดับดีเอ็นเอ
ประวัตินักวิจัย	

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	ส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์	20
ตารางที่ 3.2	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	21
ตารางที่ 4.1	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l)	25
ตารางที่ 4.2	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A260/A280 ของใบข้าว	26
ตารางที่ 4.3	ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์	27
ตารางที่ ก1	ความเข้มข้นที่ปริมาณสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์	37
ตารางที่ ก2	ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับระยะทางที่เคลื่อนที่	39
ตารางที่ ก3	บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ	40

(ช)

สารบัญภาพ

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

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กาแฟ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Coffea* spp. จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Rubiaceae สกุล (Genus) *Coffea* กาแฟเกือบทุกชนิดมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในทวีปแอฟริกา และจากข้อมูล กาแฟอาราบิก้าเป็นพืชพื้นเมืองแถบพื้นที่สูง ในประเทศเอธิโอเปียและที่ราบสูงโบมา (Boma) ในประเทศซูดาน ลักษณะเป็นป่ากาแฟธรรมชาติ พื้นที่เหล่านี้ มีความสูงระหว่าง 1,350-1,800 เมตรจากระดับน้ำทะเลสภาพอากาศค่อนข้างหนาวเย็น อุณหภูมิเฉลี่ย 5-24 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 1,900 มิลลิเมตร ดินเป็นดินร่วนสีแดง หน้าดินค่อนข้างลึก ส่วนกาแฟ โรบัสต้าเป็นพืชพื้นเมืองแถบเส้นศูนย์สูตรของทวีปแอฟริกา ระหว่างเส้นรุ้งที่ 10 องศาเหนือ ถึง 10 องศาใต้ ระดับความสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลไปจนถึงความสูง 1,050 เมตร จากระดับน้ำทะเล พบตั้งแต่ชายฝั่งทะเลตะวันตกจนถึงชายฝั่งทะเลตะวันออก ขึ้นมาทางเหนือของทะเลสาบวิกตอเรียในประเทศอูกันดาและทางตอนเหนือของแม่น้ำ Kagera ในประเทศแทนซาเนีย แต่พบค่อนข้างหนาแน่นในแถบลุ่มน้ำคองโกและลุ่มแม่น้ำคูอิลู (Kouilou) ระหว่างประเทศคองโกกับกาบอง (Gabun)

กาแฟที่มีปลูกกันในประเทศไทยและในอาเซียนได้แก่ พันธุ์โรบัสต้า และ พันธุ์อาราบิก้า ผลผลิตกาแฟของโลก มีประมาณ 8 ล้านตัน เป็นกาแฟอาราบิก้า 62 % พันธุ์โรบัสต้า 38 % ของประเทศไทยมีผลผลิตคิดเป็น 0.52 % ของโลก มีพื้นที่ปลูกกาแฟกว่า 300,000 ไร่ ให้ผลผลิต 41,000 ตัน เป็นกาแฟโรบัสต้า 35,000 ตัน และ อาราบิก้า 6,000 ตัน ความต้องการบริโภคภายในประมาณ 67,000 ตัน ซึ่งผลผลิตที่ได้ไม่พอกับความต้องการใช้ บางส่วนต้องนำเข้าจากต่างประเทศ กาแฟอาราบิก้ามีปลูกมากที่จังหวัดเชียงราย เป็นกาแฟพื้นที่สูง ส่วนกาแฟโรบัสต้า มีพื้นที่การปลูกที่ต่ำลงมา เช่นในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและจังหวัดใกล้เคียง ในจังหวัดภาคใต้ได้แก่ จังหวัดระนอง สุราษฎร์ธานี ชุมพร

การปลูกกาแฟในเขตพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์นั้น โดยส่วนใหญ่จะปลูกในบริเวณพื้นที่สูง พื้นที่เชิงเขา ซึ่งมักตั้งอยู่ในเขตพื้นที่อำเภอเขาค้อ อำเภอภูหลวงและอำเภอหล่มเก่า การปลูกกาแฟได้รับการส่งเสริมโดยกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานที่รับผิดชอบโดยตรงได้แก่ สถานีเกษตรที่สูงเขาค้อ ซึ่งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์พืชเมืองหนาวเพื่อการเกษตร สำหรับแจกจ่ายให้กับประชาชนทั่วไปบนอำเภอเขาค้อและอำเภอใกล้เคียง ได้ทดลองนำไปปลูกขยายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ที่ส่งเสริมให้ปลูกเป็นหลักคือกาแฟพันธุ์อาราบิก้า จากการศึกษาพบว่า การปลูกกาแฟมีการให้ผลผลิตที่ดีพอสมควร อย่างไรก็ตามคุณภาพกาแฟที่ได้อาจยังต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและเกษตรกรเองมักมีการขยายพันธุ์กาแฟเพื่อเพิ่มจำนวน ซึ่งจากสิ่งที่เกิดขึ้นนี้ ทำให้เกิดสายพันธุ์กาแฟลูกผสมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ประกอบกับการ

นำพันธุ์กาแฟเข้ามาในพื้นที่อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้สายพันธุ์กาแฟในพื้นที่มีความหลากหลายอย่างมาก ซึ่งจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ผ่านมา นอกจากจะศึกษาลักษณะจากภายนอกแล้ว ยังมีความก้าวหน้าทางด้านพันธุศาสตร์ในการคัดเลือกพันธุ์โดยอาศัยการศึกษาในระดับโมเลกุลด้วย กล่าวคือ การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์เพื่อการรวบรวมพันธุ์พืช การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามต้องการ เรียกว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏจีโนไทป์ (genotype) เนื่องจากการคัดเลือกจากจีโนไทป์ (genotype) โดยตรง เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตจึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ ดังนั้น จึงมีความจำเป็น อย่างยิ่งที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการ คัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะเหล่านั้น จึงทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายโมเลกุล เข้ามามีบทบาทและเพิ่มความสำคัญมากขึ้น บทความนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการประยุกต์ใช้ในการ ประเมิน อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพที่สามารถนำมาช่วยในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านต่างๆ ในพืช เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นเครื่องหมายที่มีลำดับเบสซ้ำขนาดสั้นๆ ไม่ซับซ้อน และมีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนม (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2545) จากข้อมูลเบื้องต้นทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกาแฟในเขตพื้นที่อำเภอเขาค้อ เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการแก้ไขปัญหา และมีการใช้เทคนิคทางด้านเครื่องหมายโมเลกุล SSR ไปใช้ในการระบุและจำแนกความแตกต่างของกาแฟแต่ละสายพันธุ์เพื่อให้เกิดความชัดเจนของสายพันธุ์มากยิ่งขึ้น และเป็นการหาความสัมพันธ์ความใกล้ชิดระหว่างสายพันธุ์เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์ให้ได้กาแฟสายพันธุ์ดี ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามความต้องการ และไม่เกิดความสับสนในการคัดเลือกพันธุ์กาแฟเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กาแฟต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกความแตกต่างของกาแฟแต่ละพันธุ์ที่ปลูกในอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์กาแฟที่ปลูกในอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์กาแฟ สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ถึงระดับโมเลกุล
2. สนองนโยบายรัฐบาลด้านการพัฒนาและส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีการวิจัยและพัฒนาและนวัตกรรมโดยเน้นทางด้านการเกษตรและการพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขัน และการพึ่งพาตนเอง ได้ด้วยการวิจัย
3. ทำให้เกิดการพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขัน และการพึ่งพาตนเอง
4. เกิดความเข้าใจในธรรมชาติสร้างจิตสำนึกถึงความห่วงใยทรัพยากรธรรมชาติและการอนุรักษ์
5. ได้เผยแพร่ผลงานวิจัยซึ่งเป็นประโยชน์ด้านวิชาการและเป็นส่วนหนึ่งในการร่วมกันพัฒนาผลงานวิจัยให้มีความเจริญก้าวหน้ามากขึ้น

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. รวบรวมพันธุ์กาแฟจากพื้นที่อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยรวบรวมจากกาแฟสายพันธุ์ อาราบิก้าซึ่งเป็นที่นิยมปลูกในพื้นที่อำเภอเขาค้อจำนวน 10 สายพันธุ์
2. สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR)
4. วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
5. ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้เป็นตัวจำแนกพันธุ์กาแฟและเป็นตัวบ่งบอกเอกลักษณ์ของกาแฟสายพันธุ์นั้น ๆ

1.5 ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2562

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับกาแฟ

กาแฟ หรือ Coffee มีชื่อทางพฤกษศาสตร์คือ *Coffea Arabica* L. อยู่ในวงศ์ Rubiaceae และมีชื่อสามัญว่า Arabica Coffee, Common Coffee กาแฟเติบโตได้ดีในที่สูงอากาศชื้น กาแฟเป็นพืชที่ขึ้นตามป่าธรรมชาติมาก่อนที่มนุษย์จะนำออกมาจากป่ามาเป็นพืชทางการค้าหรือพืชเศรษฐกิจ มีผู้นิยมบริโภคทั่วทุกมุมโลก สร้างธุรกิจได้หลากหลายแขนง มีธุรกิจที่เกี่ยวข้องกับกาแฟเป็นจำนวนมาก กาแฟเป็นพืชที่มีสารออกฤทธิ์ต่อจิตและระบบประสาท ในกาแฟจะมีสารคาเฟอีน โดยในแต่ละส่วนของต้นกาแฟจะมีสารคาเฟอีนที่แตกต่างกันออกไปเช่น ในใบกาแฟมีคาเฟอีนอยู่ประมาณ 1 - 1.25% เปลือกและผลชั้นนอกของกาแฟมีคาเฟอีนและกรดมอลลิก แมนไนท์ น้ำตาล ส่วนเมล็ดกาแฟมีคาเฟอีนอยู่ประมาณ 0.72 - 2.43% กรดมอลลิก กรดซิตริก โปรตีน กลูโคส กรด coffeo-iannic และน้ำมันหอมระเหยต่างๆ

กาแฟเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดปานกลาง สูงประมาณ 3-4 เมตร ใบสีเขียวแตกออกจากข้อเป็นคู่ ๆ ดอกมีสีขาวบริสุทธิ์ กลิ่นหอม ต้นกาแฟในประเทศไทยเริ่มออกดอกในเดือนตุลาคม - กุมภาพันธ์ และเก็บเกี่ยวได้ในช่วง พฤศจิกายน - มีนาคม ระยะเวลาตั้งแต่การออกดอกถึงการเก็บเกี่ยวใช้เวลาประมาณ 8-12 เดือน หลังจากปลูกกาแฟได้ 2-3 ปี กาแฟจะเริ่มออกดอกและติดผล ผลของกาแฟเรียกว่า “Coffee Berry”

“Coffee Berry” มีลักษณะค่อนข้างกลม ขณะที่ผลยังอ่อนมีสีเขียว และเมื่อผลแก่จัดจะมีสีแดง ในแต่ละข้อของกิ่งกาแฟติดผลประมาณ 10-60 ผล แต่ละผลมีเมล็ดกาแฟอยู่ 2 เมล็ด

กาแฟ มีหลากหลายสายพันธุ์ กาแฟบางสายพันธุ์ก็ได้สูญพันธุ์ไปแล้ว การเรียกกาแฟในแต่ละสายพันธุ์จะเรียกตามพื้นที่ปลูกบ้างหรือพื้นที่ที่พบพันธุ์ของกาแฟนั้นในครั้งแรกบ้าง กาแฟที่มีชื่อเสียงโด่งดังและได้รับความนิยมจากนักดื่มส่วนใหญ่มีอยู่ด้วยกัน 3 สายพันธุ์ คือ

1. กาแฟพันธุ์โรบัสต้า (Robusta)

เป็นกาแฟที่ปลูกในพื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลไม่มากนัก ส่วนใหญ่ปลูกในประเทศแถบร้อนชื้น มีรสชาติเข้มข้น หอมฉุนกว่ากาแฟพันธุ์อาราบิก้า มีสัดส่วน ของผลผลิตกาแฟทั่วโลกถึง 25% กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า เป็นสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อนานโรคสูง ปลูกง่าย ให้ผลผลิตต่อไร่สูง การบำรุงรักษาทำได้ง่าย กาแฟสายพันธุ์นี้มีปริมาณของคาเฟอีนประมาณ 2% นิยมนำไปทำเป็นกาแฟผงหรือกาแฟสำเร็จรูป (Instant Coffee) รวมไปถึงการนำไปผสมกับสายพันธุ์อื่นเพื่อให้มีรสชาติ กลิ่น ที่แปลกไปจากเดิมหรือที่เรียกว่าเบลนด์กาแฟนั่นเอง

2. กาแฟพันธุ์ไลเบริกา (Libelica)

เป็นพันธุ์กาแฟที่มาจากแถบแอฟริกา การปลูกและการดูแลรักษาทำได้ง่ายเหมือนโรบัสต้า แต่ราคาจะไม่ดีเท่าอาราบิก้า ผู้คนนิยมดื่มกาแฟ พันธุ์นี้น้อยกว่าสองพันธุ์แรก ส่วนมากจะนำกาแฟพันธุ์นี้ไปปรุงพิเศษหรือการผสมรวมกับกาแฟพันธุ์อื่นนั่นเอง เพื่อให้ได้รสชาติและกลิ่นตามความต้องการดื่มของแต่ละคน

3. กาแฟพันธุ์อาราบิก้า (Arabica)

ถือเป็นที่สุดของกาแฟ เรียกว่าเป็นราชินีอยู่บนยอดดอยได้เลยเพราะกาแฟพันธุ์อาราบิก้านี้ ปลูกและดูแลรักษาค่อนข้างยากลำบากต้องปลูกในที่สูงและอุณหภูมิเหมาะสมจึงจะได้กาแฟรสดีไม่เพี้ยนไปจากพันธุ์ดั้งเดิม โดยความสูงต้องตั้งแต่ 1000 เมตรขึ้นไปจากระดับน้ำทะเลและมีความลาดเอียงของพื้นที่ปลูกไม่เกิน 30% อุณหภูมิที่พอเหมาะจะอยู่ที่ 15 - 25 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 60% รสหอมกลมกล่อม ในเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิก้ามีปริมาณคาเฟอีนน้อยกว่าพันธุ์โรบัสต้า ประมาณ 1 เท่า ผลผลิตของกาแฟทั่วโลกเป็น กาแฟพันธุ์อาราบิก้า 75% กาแฟอาราบิก้านิยมนำมาคั่ว บด และชงโดยการกรองกากออกหรือที่ปัจจุบันนิยมเรียกว่า "กาแฟสด" นั่นเอง กาแฟพันธุ์อาราบิก้ามีปริมาณคาเฟอีนอยู่ประมาณ 1% แต่เป็นพันธุ์กาแฟที่มีผู้คนนิยมดื่มสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ ราคาที่ค่อนข้างแพงกว่าพันธุ์อื่น

สายพันธุ์แท้ของกาแฟอาราบิก้า(Arabica coffee varieties)

กาแฟอาราบิก้ามีโครโมโซม ที่สามารถผสมตัวเองได้ ทำให้มีการผสมภายในสายพันธุ์ (inbreeding) โดยไม่ทำให้เกิดผลเสีย แต่อาจจะมีการแตกเหล่าขึ้นได้ เกิดเป็นสายพันธุ์ต่างๆ หลากหลาย พอแยกพันธุ์สำคัญได้ดังนี้

- พันธุ์คาฟูร่า ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของกาแฟอาราบิก้าดั้งเดิม
- พันธุ์ทิปปิก้า (Typica) มีลักษณะเด่นยอดเป็นสีทองแดง ติดลูกห่างระหว่างข้อ มีใบเล็ก เรียบ เจริญเติบโตเร็ว แต่ไม่ทนต่อโรค ฯลฯ เป็นพันธุ์ดั้งเดิม ต้นกำเนิดของกาแฟอาราบิก้าเริ่มปลูกในเยเมน แล้วแพร่หลายไปสู่ประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย อเมริกาใต้ ฟิlipปินส์และฮาวาย พันธุ์บลูเมาเทน (Blue Mountain) กลายพันธุ์มาจากพันธุ์ทิปปิก้า นำไปปลูกที่บลูเมาเทนในจาไมก้ามีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมบนภูเขาที่สูง เป็นกาแฟที่มีคุณภาพและรสชาติดีมาก เป็นที่ยอมรับของตลาดผู้บริโภค ถือว่าเป็นกาแฟมีชื่อเสียงอันดับหนึ่งของโลก จึงมีราคาแพงที่สุดเช่นกัน

ในประเทศไทยมีการผลิตกาแฟทั้งสิ้น 2 สายพันธุ์ ได้แก่ กาแฟพันธุ์โรบัสต้า (Robusta coffee) ซึ่งเพาะปลูกมากแถบจังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี กระบี่ และนครศรีธรรมราช คิดเป็นปริมาณประมาณปีละ 80,000 ตัน และกาแฟพันธุ์อาราบิก้า (Arabica coffee) เพาะปลูกมากแถบจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และตาก ซึ่งเป็นพื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลและอากาศเย็น ซึ่งคิดเป็นปริมาณปีละประมาณ 500 ตัน ซึ่งจากความนิยมในการบริโภคกาแฟและการผลิตที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการศึกษาทดลองเพื่อปรับปรุงพันธุ์กาแฟให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นตามความ

ต้องการและมีคุณภาพที่ดีขึ้นเช่นเดียวกัน และการปรับปรุงพันธุ์กาแฟนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องได้ต้นพันธุ์กาแฟที่มีคุณภาพดี นอกจากเป็นพันธุ์แท้แล้ว จะต้องมีความแข็งแรงสมบูรณ์ด้วย จากการเพาะปลูกที่ผ่านมาพบว่า การคัดเลือกพันธุ์ซึ่งมีอยู่มากมายมักประสบปัญหาในการคัดเลือกเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์กาแฟที่เป็นพันธุ์แท้จริงๆ ซึ่งหากสังเกตจากลักษณะภายนอกแล้วแม้แต่เกษตรกรที่มีความชำนาญจริง ในบางครั้งอาจยังไม่สามารถจำแนกพันธุ์ได้อย่างถูกต้องทั้งหมด ด้วยเหตุนี้ จึงมีวิธีการในการระบุเพื่อจำแนกสายพันธุ์กาแฟให้เป็นไปตามที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า “เครื่องหมายโมเลกุล” ซึ่งเป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพืชและสัตว์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงหรือยีนที่มีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างจำเพาะเจาะจงมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกลายพันธุ์พืชได้

ประวัติกาแฟพันธุ์อราบิก้าในประเทศไทย

กาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกชนิดหนึ่ง เกษตรกรชาวไทยปลูกกาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจทั้งภาคเหนือและภาคใต้ โดยภาคเหนือปลูกกาแฟพันธุ์อราบิก้า (Arabica) และภาคใต้ปลูกกาแฟพันธุ์โรบัสต้า (Robusta)

ประวัติกาแฟพันธุ์อราบิก้าในประเทศไทย ตามบันทึกของพระสารสาส์นพลชั้นรุ (นายเจริญ ชาวอิตาเลียน) ในปี พ.ศ. 2454 ได้ระบุว่า กาแฟเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่สมัยอยุธยา และได้มีการทดลองปลูกกาแฟอราบิก้าในฐานะพืชเศรษฐกิจมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2393 โดยครั้งแรกได้นำไปปลูกไว้ที่จังหวัดจันทบุรี จึงมีชื่อเรียกว่า กาแฟจันทบุรี ส่วนกาแฟพันธุ์โรบัสต้า คนไทยคนแรกที่นำมาปลูกในภาคใต้ของไทย ชื่อ นายคิหมุน นำมาปลูกเมื่อปี พ.ศ. 2447 ที่อำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา และมีการแพร่หลายในฐานะพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยมีแหล่งปลูกสำคัญร้อยละ 90 อยู่ทางภาคใต้ ที่จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกทางภาคใต้ คือ พันธุ์โรบัสต้า ในขณะที่ทางภาคเหนือแหล่งปลูกสำคัญอยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน โดยนิยมปลูกพันธุ์อราบิก้า

ในปี พ.ศ. 2500 นายสมบูรณ์ ณ ถลาง อดีตผู้อำนวยการกองการยาง กรมกสิกรรม (กรมวิชาการเกษตรในปัจจุบัน) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้นำเมล็ดกาแฟอราบิก้าจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ ทิปปิก้า (Typica), เบอร์บอน (Bourbon), แคททูรา (Caturra) และมุนดู นูวู (Mundo Novo) จากประเทศบราซิลมายังประเทศไทย โดยปลูกไว้ที่สถานีทดลองพืชสวนมูเซอ จ.ตาก สถานีทดลองพืชไร่แม่ใจ จ.เชียงใหม่ และสถานีทดลองพืชสวนฝาง จ.เชียงใหม่ เมล็ดกาแฟจากสถานทดลองทั้งสามแห่งนี้ได้แพร่กระจายไปสู่เกษตรกรชาวไทยภูเขาและพื้นราบ ซึ่งปลูกกันอย่างแพร่หลาย ต่อมาต้นกาแฟอราบิก้าเหล่านี้ได้เกิดเป็นโรคราสนิม สาเหตุจาก เชื้อรา *Hemileia vastatrix* ทำให้ต้นโทรม ผลผลิตต่ำมาก จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2516 นักวิชาการโรคพืชจากกองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตรได้ทำการสำรวจการแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นกับ

กาแฟโรบัสต้าและกาแฟอราบิก้าในภาคใต้และภาคเหนือของประเทศ พบว่า กาแฟโรบัสต้าในภาคใต้ได้รับความเสียหายจากโรคราสนิมน้อยมาก เกิดขึ้นเฉพาะกาแฟอราบิก้าในภาคเหนือที่ปลูกบนภูเขาของจังหวัดตาก เชียงใหม่ เชียงราย (อ.แม่สาย) ลำปาง และน่าน ซึ่งได้รับความเสียหายอย่างรุนแรงทั้งสายพันธุ์ ทิปปิก้า เบอร์บอน และแคททูรา ทำให้เกษตรกรหยุดการดูแล เพราะไม่สามารถแก้ไขปัญหารোগโรคราสนิมได้ จึงต้องปล่อยให้สวนกาแฟกร้างและเลิกปลูกกันเป็นจำนวนมาก

ในปี พ.ศ. 2517 โครงการหลวงพัฒนาชาวเขา ได้มีดำริที่จะทำการวิจัยและพัฒนาการปลูกกาแฟอราบิก้าบนพื้นที่สูง เพื่อทดแทนการปลูกฝิ่นของชาวไทยภูเขาในภาคเหนือ ภายใต้ความช่วยเหลือของกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (USDA) ได้มอบหมายให้กรมวิชาการเกษตรดำเนินการ โดยโครงการหลวงพัฒนาชาวเขาได้รับเมล็ดพันธุ์กาแฟอราบิก้าลูกผสมรุ่นที่ 2 ที่ศูนย์วิจัยโรคราสนิมของโปรตุเกส (Coffee Rust Research Center, Oeiras, Portugal) ได้ส่งเข้ามาเพื่อความต้านทานต่อโรคราสนิม โดยใช้พันธุ์กรรมที่สามารถต้านทานต่อโรคราสนิมของกาแฟอราบิก้า Hibride de Timor มาผสมกับกาแฟอราบิก้าที่มีพันธุ์กรรมต้นเดี่ยว ผลผลิตสูง และกาแฟอราบิก้าที่มีรสชาติดี ลูกผสมรุ่นที่ 2 ทั้ง 26 คู่ผสมนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็น Hibrido de Timor derivative และกลุ่มอราบิก้าแท้ (True Arabica) โดยนำกาแฟอราบิก้าที่เพิ่งสำรวจพบและเก็บเมล็ดมาในช่วงศตวรรษที่ 19 จากเอธิโอเปีย เช่น S.12 Kaffa, S.4 Agaro, S.6 Cioiccie Dilla Alghe เป็นต้น มาผสมกับกาแฟอราบิก้าสายพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า เช่น แคททูรา คาทุยอ ในปัจจุบันกาแฟอราบิก้าลูกผสมเหล่านี้ (หลายสายพันธุ์) ได้ผ่านการทดสอบกับเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคราสนิมแล้ว จึงได้คัดเลือกต้น บันทึกลงผลผลิตและพัฒนา มาจนถึงรุ่นที่ 4 รุ่นที่ 5 รุ่นที่ 6 ของแต่ละสายพันธุ์ ปัจจุบันได้แพร่กระจายไปตามแหล่งปลูกต่าง ๆ บนภูเขาในภาคเหนือ เช่น มูลนิธิแม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย ดอยช้าง จ.เชียงราย บนพื้นที่สูงของจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก น่าน เพชรบูรณ์ และพิษณุโลก ตามลำดับ

ในช่วงเวลาเดียวกัน ในปี พ.ศ. 2517 กระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกาได้นำเมล็ดพันธุ์กาแฟอราบิก้าพันธุ์อื่นๆ มาให้โครงการหลวงพัฒนาชาวเขาอีกชุดหนึ่ง เช่น S.288, S.353 และ S.795 ซึ่งได้ผสมและพัฒนาพันธุ์จนกระทั่งมีความคงที่และไม่ผันแปรในความต้านทานต่อโรคราสนิมและเรื่องผลผลิต มาจากประเทศอินเดีย และกาแฟอราบิก้าสายพันธุ์ K.7 มาจากประเทศเคนย่า

ในปี พ.ศ. 2526 นักวิชาการจากกรมวิชาการเกษตร ได้เดินทางไปร่วมประชุมเรื่องโรคราสนิมของกาแฟ และศึกษาดูงานที่ศูนย์วิจัยโรคราสนิมของกาแฟที่ประเทศโปรตุเกส เมื่อเดินทางกลับประเทศ ได้นำเมล็ดพันธุ์กาแฟอราบิก้า คาติมอร์ (Coffee Arabica cv. Catimor) 2 เบอร์ กลับมาด้วย คือ คาติมอร์ CIFIC 7962 และ คาติมอร์ CIFIC 7963 หลังจากได้เพาะเมล็ดและทดสอบกล้าพันธุ์ กันเชื้อรา H. vastatrix Race II ในห้องปฏิบัติการแล้ว กล้าพันธุ์เหล่านี้ได้ถูกส่งไปปลูกเพื่อ

ทดสอบผลผลิต และความต้านทานต่อโรคราสนิมในสภาพธรรมชาติ ที่สถานีทดลองเกษตรหลวงขุนวาง จ.เชียงใหม่ สถานีเกษตรที่สูงเขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ และศูนย์วิจัยและส่งเสริมกาแฟอราบิก้า โครงการหลวงแม่หลอด จ.เชียงใหม่ ต่อมาในปี พ.ศ. 2527 และปี พ.ศ. 2530 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้รับเมล็ดพันธุ์กาแฟอราบิก้า คาติมอร์ อีก 3 เบอร์ คือ คาติมอร์ CIFIC 7958, คาติมอร์ CIFIC 7960 และ คาติมอร์ CIFIC 7961 จากศูนย์วิจัยโรคราสนิมของโปรตุเกส กล้าพันธุ์เหล่านี้ได้ถูกส่งไปปลูกที่สถานีเกษตรที่สูงเขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ มูลนิธิแม่ฟ้าหลวง ดอยตุง สถานีทดลองเกษตรที่สูง จ.เชียงราย และ ศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟอราบิก้า มูลนิธิโครงการหลวงแม่หลอด จ.เชียงใหม่

ในปี พ.ศ. 2531 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้รับเมล็ดพันธุ์กาแฟอราบิก้าลูกผสมรุ่นที่ 2 ระหว่าง คาติมอร์ คาพูยอ จำนวน 8 ชุด จากศูนย์วิจัยโรคราสนิมของโปรตุเกส กล้าพันธุ์ที่ได้หลังจากการทดสอบกับเชื้อรา *H. vastatrix* Race II แล้ว ได้ถูกส่งไปปลูกที่ศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟอราบิก้า โครงการหลวงแม่หลอด จ.เชียงใหม่ สถานีทดลองเกษตรที่สูงเขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ และโครงการพัฒนาเพื่อความมั่นคง ภูซัด ภูเมี่ยง และภูสอยดาว จ.พิษณุโลก

สรุปคือ กาแฟอราบิก้าสายพันธุ์ต่างๆ ได้แพร่กระจายไปตามแหล่งเพาะปลูกต่างๆ บนที่สูงในพื้นที่ของ มูลนิธิโครงการหลวง มูลนิธิแม่ฟ้าหลวง ดอยตุง จ.เชียงราย ส่วนเมล็ดพันธุ์จากสถานีของสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ได้ถูกส่งไปยัง สถานีทดลองเกษตรหลวงขุนวาง จ.เชียงใหม่ สถานีทดลองเกษตรที่สูงวารี จ.เชียงราย สถานีทดลองพืชสวน มูเซอ จ.ตาก สถานีทดลองเกษตรที่สูงเขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ และโครงการพัฒนาเพื่อความมั่นคง ภูซัด ภูเมี่ยง และภูสอยดาว จ.พิษณุโลก และได้แจกจ่ายไปสู่เกษตรกร และชาวไทยภูเขาได้ปลูกกันอยู่จนถึงปัจจุบัน

2.2 การศึกษาพันธุกรรมของกาแฟในระดับโมเลกุล

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกพันธุ์ปลูกพืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ปลูก การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ปลูก เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางการศึกษา ลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชหลายๆ ประการ เช่น ผลผลิต และลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกัน การแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดยใช้

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2552)

เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีจำนวนเบสซ้ำในหนึ่งหน่วยเบสซ้ำประมาณ 1-6 เบส เรียงอยู่ต่อเนื่องกัน กระจายทั่วทั้งจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของ SSR ในโลкусหนึ่งๆ ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วมได้ (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน ไพรเมอร์ (primer) ที่สร้างขึ้นสำหรับพีซีอาร์หนึ่งๆ นั้นมีความจำเพาะเจาะจง แต่การพัฒนาเครื่องหมาย SSR ด้วยวิธีมาตรฐานค่อนข้างยุ่งยากใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และในปัจจุบัน ได้มีการทำฐานข้อมูลจากฐานข้อมูลสาธารณะ EST (expressed sequence tags) มาใช้ในการหาเครื่องหมาย SSR เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR และวิธีการนี้เป็นที่แพร่หลายในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอในปัจจุบัน (ขวัญใจ และคณะ, 2552) เครื่องหมาย SSR ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 1-6 เบส ตัวอย่างเช่น เบสซ้ำหนึ่งเบสเรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)_n เบสซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)_n เบสซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA)_n และเบสซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA)_n โดยที่ n เป็นจำนวนครั้งของเบสซ้ำ ลำดับเบสแบบเครื่องหมาย SSR นี้มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม (Powell et al., 1996) แต่การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอบางบริเวณพบมาก บางบริเวณพบน้อย ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือส่วนนำรหัสของยีน (non-coding region) โดยเฉพาะพวกที่ชุดซ้ำมีขนาดไม่เท่ากับ 3 เบส เพราะถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของชุดซ้ำจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีส่วนน้อยที่พบอยู่ส่วนนำรหัสของยีนหรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนเนื่องจากลำดับเบสแบบเครื่องหมาย SSR มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่ขนานข้างกับเบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะของลำดับเบสนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) ซึ่งจะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน ซึ่งจะใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Ince et al., 2009; Karaca et al., 2005; สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2552) ปัจจุบัน ได้มีการนำเครื่องหมาย SSR นี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวางทั้งในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางแผน

ตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะ ในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับ ดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002)

เครื่องหมาย EST-SSR (expressed sequence tags) expressed sequence tags (EST) เป็นลำดับดีเอ็นเอส่วนที่เป็น complementary DNA (cDNA) ของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ทำหน้าที่ คัดลอกรหัสดีเอ็นเอบางส่วนของจีโนม โดยทั่วไป จะสัมพันธ์กับการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีการพัฒนาในส่วนที่มีการแสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของลำดับเบสดีเอ็นเอ และที่ในส่วนที่เป็นเอ็กซอน (exon polymorphism) (Poncet et al., 2006) ลำดับดีเอ็นเอที่พบใน EST มีขนาด 500-800 นิวคลีโอไทด์ จะเกี่ยวข้องกับยีนที่มีการแสดงออก การใช้ลำดับ EST จะสามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต ยังพบบริเวณที่มี ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำอยู่มากมาย ที่มีชุดซ้ำ 1-6 คู่เบส เรียกว่า ไมโครแซทเทลไลต์ หรือเอสเอสอาร์ (SSR) โดยจำนวนซ้ำของชุดซ้ำนี้จะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ดังนั้น เอสเอสอาร์จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถระบุลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตได้ และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนและการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Cho et al., 2000)

การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จากฐานข้อมูล EST ในปัจจุบัน มีการใช้อย่างแพร่หลายในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยการค้นหาข้อมูลของลำดับเบสจากฐานข้อมูลสาธารณะ NCIB (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) แล้วนำข้อมูลของลำดับเบสที่มีการแสดงออก มาออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งเฉพาะของยีนนั้นๆ โดยใช้หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจสอบและแยกขนาดโดยใช้อะกาโรส และอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR จากฐานข้อมูล EST จะต้องพิจารณาจากจำนวนข้อมูล EST ของพืช ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิด (species) เดียวกัน หรือ แม้แต่ในสกุล (genus) เดียวกัน ที่มีสายวิวัฒนาการเกี่ยวข้องกัน และอาจเชื่อมโยงถึงหลักการทำงานยีนเดียวกันที่อยู่ในจีโนม สามารถนำมาตรวจสอบกับพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้ (cross transferability) เนื่องจากการมีบรรพบุรุษร่วมกัน (orthologous genes) จะเป็นตัวกำหนดรูปแบบและลำดับเบส รวมทั้งข้อมูลความสัมพันธ์เกี่ยวกับรูปแบบการกลายพันธุ์ และวิวัฒนาการของตำแหน่งยีน (loci) (Poncet et al., 2006) วิธีการพัฒนาเครื่องหมาย SSR จากฐานข้อมูล EST นี้ จะช่วยลดต้นทุนแรงงาน และระยะเวลา ในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR และยังได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนของยีนโดยตรง (Feng et al., 2009.) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการประเมินความหลากหลายของจีโนมที่จะเป็นประโยชน์ในการเปรียบเทียบแผนที่ทางพันธุกรรม หาถิ่นเป่าหมายที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเพิ่มเติมยีนที่

สำคัญลงในแผนที่ทางพันธุกรรมให้สมบูรณ์มากขึ้นปัจจุบัน จำนวน EST ในฐานข้อมูลสาธารณะมีจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จากฐานข้อมูล EST ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Kentety et al., 2002) และมีการใช้ประโยชน์จาก EST ของพืชใกล้เคียง (cross transferability) อย่างแพร่หลาย เนื่องจากฐานข้อมูล EST มีจำนวนมากขึ้น การพัฒนาไพรเมอร์จำเป็นจะต้องมีการคัดกรอง EST ก่อน เพื่อลดความซ้ำซ้อนของข้อมูล และข้อมูล EST ส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ดังนั้น ในพืชพื้นเมืองอาจจะต้องใช้ข้อมูลของ EST ในพืชที่อยู่ในสกุลหรือวงศ์เดียวกัน ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ในพืชที่ยังไม่มีฐานข้อมูล

2.3 การศึกษาในระดับโมเลกุลด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้อธิบายไว้ว่า การทำให้เกิดรูปแบบลายศักยดีเอ็นเอมี 3 วิธีดังนี้

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

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

3. PCR-based method เป็นวิธีที่ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) หรือไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับและดำเนินปฏิกิริยา PCR สร้างดีเอ็นเอเป้าหมายขึ้นมาใหม่ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส จะได้รูปแบบหรือชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้จำแนกความหลากหลายของพืชได้ การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้สรุปประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอไว้ดังนี้

1. เพื่อใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (Molecular Marker) ในการจำแนกพันธุ์พืช

2. เพื่อให้เห็นความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของพืช ซึ่งไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้โดยการมองด้วยสายตา

3. เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้ โดย ช่วยในการตรวจสอบ Somaclonal Variation ในกรณีที่มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ช่วยในการตรวจสอบ linkage ระหว่าง DNA marker กับลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อพันธุ์พืช เช่น ต้านทานโรคและแมลง ฯลฯ เพื่อช่วยในการคัดเลือกและหาตำแหน่งยีนบนโครโมโซม และช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่ต้องการได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอเวลาออกดอกหรือผล

4. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืช

2.3.1 วิธีการจัดจำแนกพันธุ์ปลูกพืชในระดับโมเลกุล

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์ปลูก มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

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

2. PCR-based marker เป็น เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction (PCR) technique) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (RAPD marker) (William *et al.*, 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos *et al.*, 1995), และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown *et al.*, 1996, Powell *et al.*, 1996) เป็นวิธีที่ใช้ ดีเอ็นเอ ตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ สายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบสและทำการติดฉลากสารกัมมันตรังสีเพื่อใช้ในการติดตามผล นำมาทำปฏิกิริยากับ ดีเอ็นเอ ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจที่ถูกแยกเป็นเส้นเดี่ยวและถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) โดยอาศัยความสามารถของ ดีเอ็นเอ ตรวจสอบที่สามารถเข้าคู่หรือจับกับกับสาย ดีเอ็นเอ เป้าหมายตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (DNA hybridization) กันได้

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเป็นการศึกษาถึงไปถึงความแตกต่างในระดับของยีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายระดับดีเอ็นเอจึงได้นำมาใช้ในงานหลาย ๆ ด้าน เช่น การสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (DNA fingerprint) การแยกพันธุ์ปลูก (varietal identification) การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic mapping) การหาตำแหน่งของยีน (gene tagging) และการนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA

2.3.2 เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ 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

การเพิ่มปริมาณขึ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่มีความจำเพาะขึ้นในหลอดทดลองโดยทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ จากการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่าง

1. เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ
 2. ดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ 2 สายหรือไพรเมอร์ (DNA primer) ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่ เป็นตัวกำหนดขนาดของ ดีเอ็นเอที่ทำการสังเคราะห์
 3. นิวคลีโอไทด์อิสระ
 4. สายดีเอ็นเอ เป้าหมาย ภายในหลอดทดลอง
- ภายหลังการทำปฏิกิริยาจะได้สาย ดีเอ็นเอ ใหม่จำนวนมากที่ถูกกำหนดขนาดตามระยะห่างของไพรเมอร์ทั้ง 2 สายที่เข้าจับบนสายต้นแบบเมื่อเริ่มปฏิกิริยาสังเคราะห์

เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ ที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

- ก. ประเภทที่มีไพรเมอร์ ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้มีบริเวณจับบนสาย ดีเอ็นเอ ที่สนใจในตำแหน่งที่แน่นอน ได้แก่ sequence tagged site (STS) และ SSLP (simple sequence length polymorphism) หรือ microsatellite

ข.ประเภทที่มี ไพรมเมอร์ ชนิดที่ไม่จำเพาะเจาะจง(random primer) เครื่องหมายชนิดนี้ สามารถจับกับสาย ดีเอ็นเอ ได้หลาย ๆ ตำแหน่ง ได้แก่ RAPDs(random amplified polymorphic DNAs) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism)

ผลที่ได้จากการตรวจสอบคือ แถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นโดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจะถูกกำหนดจากตำแหน่งที่ไพรมเมอร์ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์จับบนสายดีเอ็นเอจุดจับของไพรมเมอร์บนสายดีเอ็นเอที่ต่างกันจึงทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน

หลักการของ PCR ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสาย ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอ็นไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลาก ดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรมเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรกเรียกว่า denaturing เป็นการแยกสาย ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C

ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรมเมอร์ซึ่งเป็น ดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับ เบสเป็นคู่สมกับ ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60°C

ขั้นที่สามเรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรมเมอร์ ตามข้อมูลบน ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75°C เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบสามารถเพิ่มปริมาณสาร ดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสาย ดีเอ็นเอ สายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็น ดีเอ็นเอ สายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1.Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่

2.DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ ให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อกันของคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3.Primer เป็น ดีเอ็นเอ เริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ ดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของ ดีเอ็นเอ ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

4.PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุโมลแมกนีเซียม (Mg^{2+}) อยู่ด้วย

5.Template คือ ดีเอ็นเอ ต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่าง ดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหา ดีเอ็นเอ จำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็ก ปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิต ดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ผลผลิต ดีเอ็นเอ จากปฏิกิริยา 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

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุล SSR

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ได้มีการวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการจำแนกความแตกต่างแต่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยมีนักวิจัยได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิคเครื่องหมาย SSR สรุปได้ดังนี้ ได้แก่

สุริพร เกตุงาม, (2546) ได้อธิบายไว้ว่า ถึงเครื่องหมายโมเลกุล SSR หรือ ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellites) เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยที่โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในโลกลักษณะหนึ่งๆ ไมโครแซทเทลไลท์ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Simple Sequence Repeats (SSR), Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLP) และ Sequence tagged Microsatellite Site (STMS) เป็นต้น โดยทั่วไปไมโครแซทเทลไลท์จะประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) มีตั้งแต่ 1-6 เบส โดยเบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A) n ซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA) n ซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA) n และ ซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA) n โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำ เบสซ้ำเหล่านี้พบกระจายอยู่บริเวณต่างๆ ของจีโนมประมาณ 104-105 โกลัส ในจีโนมของพืชเขตร้อนส่วนใหญ่ เช่น ข้าวโพด จะพบลำดับเบสซ้ำ (GT) n และ (AG) n ในปริมาณมาก (ประมาณ 104-105) ส่วนในจีโนมข้าวจะพบ (GGC) n เสียเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปเบสซ้ำเหล่านี้ มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่บริเวณรอบๆ เบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะนี้ สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) เหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า “ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ หรือ เอสเอสอาร์ไพรเมอร์” ไพรเมอร์เหล่านี้ จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่าง unique sequences ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนี้ ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ ตัวอย่างเช่น การใช้ (GT) n ในการบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมพืช หรือนำมาใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ในข้าว

ทัศนี ขาวเนียม และ สมปอง เตชะโต (2557) ได้อธิบายไว้ว่า การทดสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค SSR ในปาล์มน้ำมัน โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการ preconditioning และ dehydration ด้วยเทคนิค SSR แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

วารวรณ์ หิตฉิม และ สมปอง เตชะโต (2557) ได้อธิบายไว้ว่า ลักษณะการออกดอกของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองเป็นความแปรปรวนทางพันธุกรรมรูปแบบหนึ่งของปาล์มน้ำมันที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายในแปลงปลูกของเกษตรกร การศึกษานี้เป็นการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ออกดอกและออกดอกในหลอดทดลองพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา เบอร์ 77 ที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่ดูรา (D366) และ ต้นพ่อพิสิเฟอรา (P172) โดยใช้เทคนิค SSR จาก

การศึกษาสามารถใช้เทคนิคดังกล่าวในการคัดเลือกความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนปลูกลงแปลงซึ่งจะช่วยลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นต่อไป

เศรษฐา ศิริพิณฑุ และ มัลลิกา จินดาสิงห์ (2555) ได้อธิบายไว้ว่า การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด 18 พันธุ์ โดยอาศัยเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายเอสเอสอาร์ พบว่า สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมบนโครโมโซมถั่วเหลืองฝัก จากการศึกษพบว่า การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองฝักสดด้วยผลของการใช้เทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย SSR จึงเป็นประโยชน์สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดในอนาคตอย่างยิ่ง

จุฑาพร แสงประจักษ์ (2555) ได้อธิบายไว้ว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ไว้ว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายประเภท เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), STS (Sequence Tagged Sites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats) หรือ microsatellites และ SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) เป็นต้น การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

สุจิตรา จางตระกูล (2552) ได้พัฒนาไมโครแซทเทลไลต์มาร์กเกอร์ในมะขามป้อม จากผลจากการศึกษาเบื้องต้นในการหาลำดับเบสชิ้นดีเอ็นเอ 72 clones จาก genomic libraries พบว่ามี 57 clones ที่มีไมโครแซทเทลไลต์ ในการออกแบบไพรเมอร์ 54 คู่ไพรเมอร์ ในเบื้องต้นพบว่ามี 11 คู่ไพรเมอร์ ที่มี polymorphism สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ในเบื้องต้น โดยจำนวนของอัลลีลอยู่ในช่วง 3-8 อัลลีล และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.45 ซึ่งไมโครแซทเทลไลต์มาร์กเกอร์ที่พัฒนาได้ดังกล่าวสามารถนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบบสืบพันธุ์ของประชากรของมะขามป้อมได้

สุนิดา อัญจิระโรจน์. (2550) ได้ศึกษาการไอโทปและชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่ามะขามทุกพันธุ์ปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์ มีจำนวนชุดของโครโมโซม $2n = 24$ โครโมโซม และสามารถใช้ในการมีแซทเทลไลต์เฉพาะที่โครโมโซมบางตัวเป็นเครื่องหมายระดับโครโมโซมในการจำแนกชนิดของมะขามได้ นอกจากนี้ยังใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสในดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ rDNA ในนิวเคลียส เพื่อหาความแตกต่างของมะขามหวาน 10 พันธุ์ปลูก พบว่าลำดับเบสและแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 0.05

Chakravarthi and Naravaneni, (2006) ได้อธิบายไว้ว่า พันธุกรรมความหลากหลายและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีนข้าว 15 ชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ SSR ถูกตรวจสอบผลการศึกษาไพรเมอร์แสดงให้เห็นความแตกต่างกันในหมู่พันธุ์ การศึกษาแสดงให้เห็นความแตกต่างของการวิเคราะห์กลุ่มการจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวเป็น 10 ชั้นเรียนในประเภท japonica DH-1 (Azucena) และ Moroborekan ได้แยกความแตกต่างจากประเภท indica การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักทำให้มองเห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวของชนชั้นสูง ผลการวิจัยพบคล้ายกับผลการ UPGMA การศึกษาครั้งนี้มีช่วงของความคล้ายคลึงกันสำหรับสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ให้ความมั่นใจมากขึ้นในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาดีเอ็นเอพิมพ์ลายช่วยในการระบุอย่างชัดเจนของลักษณะ 9 พันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ 18 RM ที่แตกต่างกันข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการเลือกระหว่างโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์

Katharina et al., (2016) ได้อธิบายไว้ว่า การใช้เครื่องหมาย SSR ไว้ว่า sainfoin เป็นพืชตระกูลถั่วอาหารสัตว์ยืนต้นที่มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์สำหรับการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากการปรากฏตัวของสารทุติยภูมิแต่การเพาะปลูกทั่วโลก sainfoin เป็นขอบเนื่องจากการขาดของสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีทางการเกษตรปรับให้เข้ากับ ความหลากหลายของสภาพแวดล้อม เล็กๆ น้อยๆ รู้จักกันเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของ sainfoin และเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพียงไม่กี่คนที่สามารถให้ความช่วยเหลือทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์การสืบสวน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดของเครื่องหมาย SSR ประโยชน์สำหรับการศึกษาทางพันธุกรรมใน sainfoin และลักษณะของพวกเขาในเชื้อพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย

Luo et al., (2016) ได้อธิบายไว้ว่า การใช้เครื่องหมายโมเลกุลโดยใช้พืช *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) เป็นพันธุ์พืชกรานที่ชาวบ้านจัดเป็นภัยคุกคาม ในความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่ การศึกษานี้แสดงลำดับตัวอย่าง ลำดับซ้ำ (EST-SSR) เครื่องหมายได้รับการพัฒนาและศึกษา 16b ตำแหน่ง ของ SSR แยกได้จาก *T. diversifolia* ใช้ลำดับยีนและการคัดกรองทางชีววิทยา จำนวนของอัลลีลที่แตกต่างกัน 2-4 อัลลีลใน 48 ลักษณะจากประชากร ส่วนใหญ่ของไพรเมอร์เหล่านี้ยังพบใน *T. rotundifolia* และ *Parthenium hysterophorus* เครื่องหมายเหล่านี้มีประโยชน์ในการตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมและกระบวนการวิวัฒนาการของ *T. diversifolia* ซึ่งอาจให้ข้อมูลที่สำคัญสำหรับการศึกษาความหลากหลายของวิวัฒนาการ

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างใบกาแฟได้จากต้นกาแฟในสถานีเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ (เขาค้อ) สายพันธุ์ พันธุ์ราบีก้าชื่อ "คาติมอร์" (CatiMor) เป็นการเรียกชื่อพันธุ์มาจากคำว่า คาทูรา (Cattura) และ ไฮบริโด เดอ ทิมอร์ (Hibrido de Timor) เป็นชื่อเรียกตามการผสมข้ามสายพันธุ์ ระหว่างคาทูราผลแดงเป็นต้นแม่พันธุ์ และ ไฮบริโด เดอ ทิมอร์เป็นต้นพ่อพันธุ์ ผลการผสมระหว่างลูกผสมข้ามชนิด ทำให้ลูกผสมที่ได้มีความต้านทานต่อโรคราสนิม และได้ลักษณะทรงเตี้ย ผลผลิตสูง และใช้หมายเลข CIFC 19/1 และ 832/1 ซึ่งกำหนดโดยนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่ Centro de Investicao -das Ferrugens de Cafeeiro (CIFC) ในประเทศโปรตุเกส สายพันธุ์ที่ปลูกในพื้นที่อำเภอเขาค้อ คือพันธุ์เชียงใหม่ 80 สายพันธุ์ คาติมอร์ มีการขยายพันธุ์โดยอาศัยการผสมข้ามจนได้ต้นลูกออกมาหลายชุด ซึ่งได้ถูกระบุชื่อชุดออกมาเป็นสายต้น และในการทดลองนี้ได้รับชื่อสายต้นที่ใช้ในการทดลอง ดังตารางที่ 3.1 ดังนี้คือ

ตารางที่ 3.1 ชื่อสายต้นกาแฟที่รวบรวมได้จากอำเภอเขาค้อทั้งหมด 33 สายต้น

ลำดับ	ชื่อสายต้น	ลำดับ	ชื่อสายต้น	ลำดับ	ชื่อสายต้น
1	8-7,26	12	6-2,114	23	8-8,55
2	5-2,88	13	8-7,78	24	13-1,33
3	8-5,18	14	5-2,74	25	5-3,34
4	7-4,5	15	5-2,59	26	4-1,53
5	7-1,7	16	7-1,8	27	7-4,10
6	5-3,63	17	5-2,87	28	7-1,85
7	5-3,104	18	5-4,1	29	6-2,40
8	5-3,96	19	4-1,103	30	6-2,18
9	5-4,42	20	8-5,19	31	5-3,67
10	4-1,39	21	4-1,1	32	4-1,34
11	3-1,29	22	CIFC	33	5-2,81

จากตัวอย่างกาแฟจำนวน 33 พันธุ์ปลูก ได้คัดเลือกพันธุ์จำนวน 10 พันธุ์เพื่อใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ชื่อสายพันธุ์กาแฟที่ใช้ในการทำลองในครั้งนี้จำนวน 10 สายพันธุ์

ลำดับที่	เลขลำดับพันธุ์	ชื่อพันธุ์
1	4	7-4,5
2	5	7-1,7
3	6	5-3,63
4	7	5-3,104
5	9	5-4,42
6	10	4-1,39
7	14	5-2,74
8	17	5-2,87
9	21	4-1,1
10	26	4-1,53

หลังจากคัดเลือกพันธุ์กาแฟจำนวน 10 สายพันธุ์แล้ว ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบกาแฟด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปของ RBC Bioscience โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและชุดสกัดสำเร็จรูปดังนี้คือ นำใบกาแฟมาชั่งน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ห่อด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำใบกาแฟมาสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป RBC bioscience ประเทศไต้หวัน โดย ชั่งใบพืชสดหรือใบพืชแช่แข็ง 50-100 มิลลิกรัม (หากเป็นตัวอย่างใบแห้งใช้ 5-100 มิลลิกรัม) หั่นหรือสับเป็นชิ้นเล็กๆกับไนโตรเจนเหลว จนเป็นผงละเอียด ตักใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม GPI (หรือ GPXI) 400 ไมโครกรัม และ RNase A 5 ไมโครกรัม ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตรนำไปปั่นบน vortex นำไปอุ่นใน 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (กลับหลอดทุก 5 นาที) เติม GP2 100 ไมโครกรัม นำไปปั่นบน vortex นำไปแช่น้ำแข็ง 3 นาที ใส่ Filter column (หัวกรองสีขาว) ลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube เตรียมไว้ นำสารละลายจากข้อ 5 (อยู่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร) เทลงใน Filter column ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่ Filter column เทสารละลายที่ได้ใส่ หลอด 1.5 อันใหม่ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA binding โดยเติม GP3 (ซึ่งเติม isopropanol แล้ว) จำนวน 1.5 เท่าของสารที่กรองได้ เช่น สารที่กรองได้ 500 ไมโครกรัม ให้เติม GP3จำนวน 750 ไมโครกรัม (รวมเป็น 1,250 ไมโครกรัม) เป็น

ต้น นำไปปั่นบน vortex เป็นเวลา 5 วินาที ใส่หลอด GD column (หัวกรองสีเขียว) ลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube อันใหม่ เตรียมไว้ ดูดสารละลายที่เหลือ ประมาณ 700 ไมโครกรัม ลงใน GD column ส่วนที่เหลือ (~550 ไมโครกรัม) นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ซึ่งเฉพาะสารละลายที่อยู่ใน collection tube นำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม ทำซ้ำข้อ 12-14 โดยนำสารละลายจากส่วนที่เหลือใช้ในข้อ 10 (หรือข้อ 12) (~550 ไมโครกรัม) เติมนลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่ซึ่งเฉพาะสารที่อยู่ใน collection tube อันเดิมอีกครั้ง จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอ โดยเติม W1 buffer จำนวน 400 ลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายใน collection tube ที่ลงใน collection tube อันเดิม เติม Wash buffer ที่เติม ethanol แล้วจำนวน 600 ไมโครกรัม ลงใน GD column นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายใน collection ที่นำไปนำ GD column ใส่กลับลงใน collection tube อันเดิม นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้สารลงบน GD column (ethanol 96-100 เปอร์เซ็นต์) ลงใน GD column แทน buffer) นำ GD column ที่แห้งวางลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ (ต้องตัดฝาทั้งก่อน) จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน DNA Elution โดย เติม preheated Elution buffer (อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) จำนวน 100 ไมโครกรัม ลงตรงกลางของ GD column และทำการละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา ตัดทิ้งไว้ 3-5 นาที (เพื่อให้ Elution buffer ซึมเข้าไปทั่วกลางของ GD column และทำการละลาย DNA ออกมา) นำไปปั่น 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่ซึ่ง GD column ไปได้สารละลาย DNA อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝา ถ่ายสารละลาย DNA ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ถูกตัดฝาลงในหลอด 1.5 อันใหม่ หรือหลอด PCR ปิดฝาให้สนิท รััดด้วย Para film ให้แน่น ใส่ถุงพลาสติก ชนิดแช่แข็ง ติดฉลากให้เรียบร้อย นำไปแช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

3.2 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

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

ปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ (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

3.3 การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

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

2. ตรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์มาทดสอบกับดีเอ็นเอหนึ่งตัวอย่าง เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 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 ₂ (50 mM)	1.5	2.5 mM
4. dNTP (10 mM)	1.0	200 μM
5. Primer (4 μM /100 ไมโครกรัม)	1.0	2.0 μM
6. Tag Master Mix	25	2x
7. ddH ₂ O ปลอดเชื้อ	20.5	-
รวม	50	-

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ให้เข้ากันในหลอดสำหรับ PCR และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยมีรายละเอียดของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที	จำนวน 1 รอบ
ขั้นที่ 2 Denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที	จำนวน 35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
ขั้นที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที	จำนวน 1 รอบ

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

3. นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.2

4. ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	Sequence repeat motif (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Reference
1	UBC-807	(AG)8T	47	Haritha et al.,2015
2	UBC-808	(AG)8C	49	Haritha et al.,2015
3	UBC-809	(AG)8G	49	Haritha et al.,2015

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) MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ TaqDNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Swift.Maxfro.Thermal Cyclers,ESCO,Singapore) ตั้งโปรแกรมนำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

ปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. สารละลายดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร
2. คูไพรเมอร์ (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

3.4 การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel

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

3.5 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งของแอลลีลที่ประกอบด้วย 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) โดยการวิเคราะห์ ณ แต่ละตำแหน่งที่มีความหลากหลายรูปแบบทาง

พันธุกรรมด้วยวิธี likelihood ratio test (Yeh *et al.*, 1999) และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test ตรวจวิเคราะห์ null allele ในทุกตำแหน่งของทุกประชากร โดยจะปรับจีโนไทป์และทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กใหม่ ณ ตำแหน่งและประชากรที่ตรวจพบ null allele คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของ Nei (1978) พร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (dendrogram) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 1.2 (Goudet, 1995) และ POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ยกเว้นการวิเคราะห์ null allele และปรับจีโนไทป์ใช้โปรแกรม Micro-Checker version 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) โดยระบุกลุ่มประชากรตามที่ปรากฏในโครงสร้างความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างให้ครอบคลุมทุกระดับที่ปรากฏในโครงสร้าง โดยตรวจสอบจากค่า F-statistics (inbreeding coefficients หรือ fixation indexes) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า P ในทุกระดับ และทุกคู่ประชากร ของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า P ที่ 0.02 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรทุกคู่ ใช้การวิเคราะห์ค่า P ของ F_{st} ระหว่างคู่ประชากร (P_{Fst}) และวิธี exact test (P_{exact}) ภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า P ที่ได้รับการปรับโดยใช้ Bonferroni correction เพื่อความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.1

3.5 การสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Data Editor

เมื่อการตรวจสอบคุณภาพพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) เสร็จสิ้น จากนั้นนำแผ่นเจลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PhotoCap เพื่อเปิดรูปลายพิมพ์เพื่อนำมาวิเคราะห์โดยจากแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ แล้วนำมาสร้าง dendrogram ด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้เทคนิค Hierarchical Cluster

บทที่ 4

ผลการวิจัย

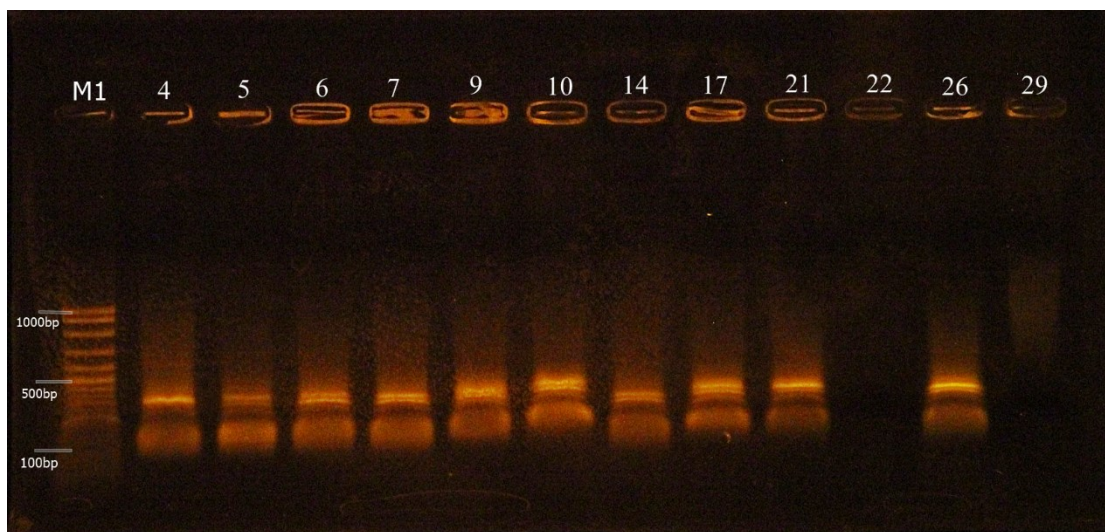
จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกาแฟ 10 พันธุ์ ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในขั้นตอน PCR หลังจากการสกัดดีเอ็นเอ หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และหาความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) หากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจากการตรวจสอบดังกล่าวได้ค่าสัดส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} หลังจากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกันตามความสามารถของไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถเข้าจับกับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวในแต่ละตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

4.1 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกาแฟ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพันธุ์กาแฟ จำนวน 10 สายต้น ด้วยไพรเมอร์แบบ SSR ที่ให้ผลดีที่สุด คือ UBC808 [(AG)₈C] ให้ผลการแสดงแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และสามารถนำผลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ โดยตัวอย่างสายต้นที่นำมาใช้ในการศึกษาพันธุ์กาแฟ แสดงในตารางที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 พันธุ์กาแฟที่ใช้ในการทำลองในครั้งนี้จำนวน 10 สายต้น

ลำดับที่	เลขลำดับสายต้น	ชื่อสายต้น
1	4	7-4,5
2	5	7-1,7
3	6	5-3,63
4	7	5-3,104
5	9	5-4,42
6	10	4-1,39
7	14	5-2,74
8	17	5-2,87
9	21	4-1,1
10	26	4-1,53

ผลการใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกาแฟ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อตรวจสอบด้วย agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกาแฟมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกัันดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 แลบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอของกาแฟโดยใช้ไพรเมอร์ UBC808 ช่อง M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (Fermentas) เลขลำดับสายต้นที่ 4-29 คือ (4) 7-4,5 (5) 7-1,7 (6) 5-6,63 (7) 5-3,104 (9) 5-4,104 (10) 4-1,39 (14) 5-2,74 (17) 5-2,87 (21) 4-1,1 (26) 4-1,53

4.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟทั้งหมด 10 สายต้น โดยใช้แลบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล SSR นำมาวิเคราะห์โครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (dendrogram) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) จากการวิเคราะห์จากความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้ค่าดัชนีความเหมือนหรือความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าอยู่ที่ช่วง 1.0 – 7.0 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าดัชนีความเหมือนของกาแฟทั้ง 10 สายต้น จากการวิเคราะห์จากความต่างกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าอยู่ที่ช่วง 1.0 – 7.0

Proximity Matrix

Case	Squared Euclidean Distance						
	1:7-4,5	2:7-1,7	3:5-3,63	4:5-3,104	5:5-4,104	6:4-1,39	7:5-2,74
1:7-4,5	0.000	3.000	3.000	3.000	4.000	7.000	3.000
2:7-1,7	3.000	0.000	2.000	2.000	3.000	6.000	2.000
3:5-3,63	3.000	2.000	0.000	0.000	1.000	4.000	2.000
4:5-3,104	3.000	2.000	0.000	0.000	1.000	4.000	2.000
5:5-4,104	4.000	3.000	1.000	1.000	0.000	3.000	3.000
6:4-1,39	7.000	6.000	4.000	4.000	3.000	0.000	6.000
7:5-2,74	3.000	2.000	2.000	2.000	3.000	6.000	0.000
8:5-2,87	4.000	3.000	1.000	1.000	0.000	3.000	3.000
9:4-1,1	5.000	2.000	2.000	2.000	1.000	4.000	4.000
10:4-1,53	5.000	2.000	2.000	2.000	1.000	4.000	4.000

Proximity Matrix

Case	Squared Euclidean Distance		
	8:5-2,87	9:4-1,1	10:4-1,53
1:7-4,5	4.000	5.000	5.000
2:7-1,7	3.000	2.000	2.000
3:5-3,63	1.000	2.000	2.000
4:5-3,104	1.000	2.000	2.000
5:5-4,104	0.000	1.000	1.000
6:4-1,39	3.000	4.000	4.000
7:5-2,74	3.000	4.000	4.000
8:5-2,87	0.000	1.000	1.000
9:4-1,1	1.000	0.000	0.000
10:4-1,53	1.000	0.000	0.000

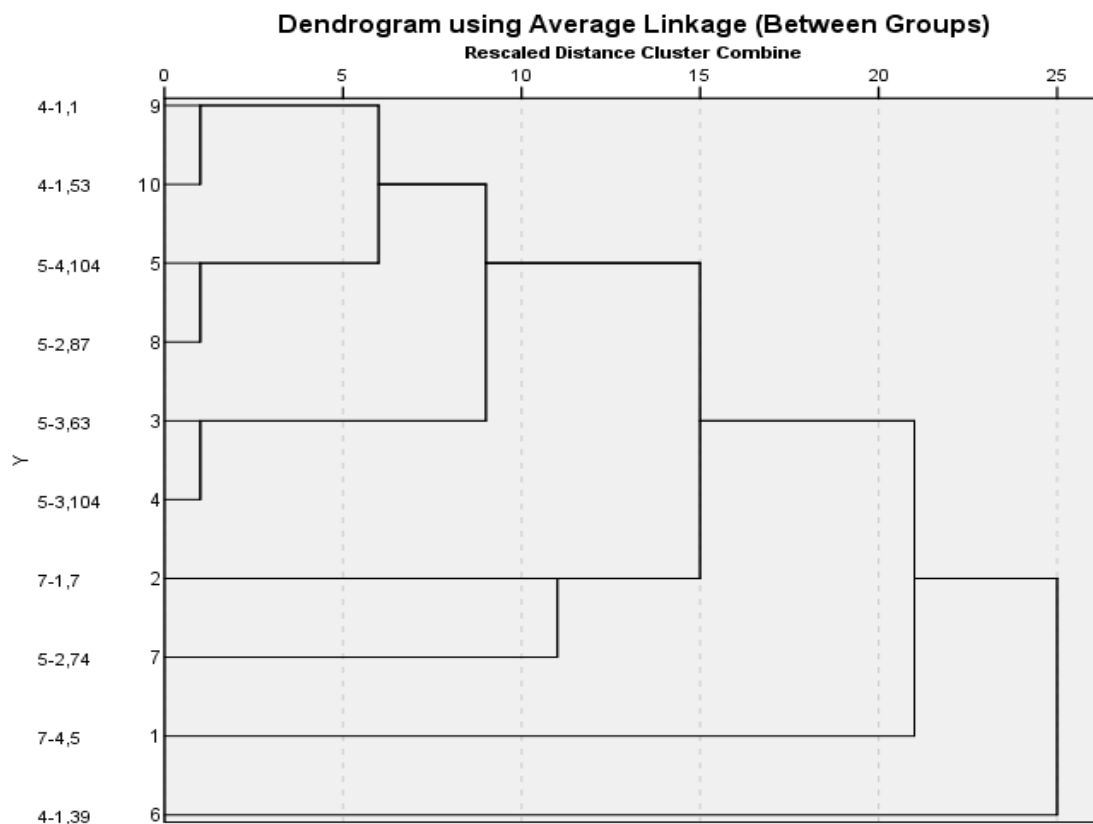
4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟจากเครื่องหมายโมเลกุล SSR

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟทั้งหมด 10 สายต้น โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ทั้งหมดนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ Hierarchical cluster Analysis โดยโปรแกรม SPSS ผลการวิเคราะห์ดัชนีความใกล้ชิดทาง

พันธุกรรมของกาแฟมีค่าอยู่ในช่วง 1.00-7.00 จากผลเดนโทแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเป็น 2 กลุ่ม (รูปที่ 4.2) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายต้นกาแฟ (7-4,5) , (7-1,7) , (5-6,63) , (5-3,104) , (5-4,104) , (5-2,74) , (5-2,87) ,(4-1,1) และ (4-1,53)

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สายต้นกาแฟ (4-1,39) ดังแสดงในภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของกาแฟทั้ง 10 สายต้น จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SSR

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกาแฟจำนวน 10 สายต้น ได้แก่ 1) 7-4,5 2) 7-1,7 3) 5-6,63 4) 5-3,104 5) 5-4,104 6) 4-1,39 7) 5-2,74 8) 5-2,87 9) 4-1,1 และ 10) 4-1,53 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์รหัส UBC-808 (AG)8C (Haritha et al., 2015) วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ วิเคราะห์ความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากใบอ่อนของกาแฟสายพันธุ์คาติมอร์ เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสร้างเป็น dendrogram และตาราง metrix จากโปรแกรม SPSS แล้วพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกาแฟออกเป็น 2 โดยกลุ่มที่ 1 ได้แก่ กาแฟคาติมอร์ เชียงใหม่ 80 สายต้น (7-4,5) , (7-1,7) , (5-6,63) , (5-3,104) , (5-4,104) , (5-2,74) , (5-2,87) , (4-1,1) และ (4-1,53) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ (4-1,39) มีค่าดัชนีความเหมือนของกาแฟทั้ง 10 สายต้น จากการวิเคราะห์จากความต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยมีค่าอยู่ที่ช่วง 1.0 – 7.0 จากการข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า แม้กาแฟในสายพันธุ์เดียวกัน แต่มีการผสมข้ามจนทำให้เกิดสายต้นใหม่ และเมื่อต้องการทดสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สามารถทำได้โดยใช้เครื่องหมาย SSR markers ซึ่งอาจเป็นข้อได้เปรียบในการคัดเลือกกาแฟให้มีความบริสุทธิ์หรือการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมได้โดยไม่ต้องอาศัยการตรวจสอบทางสัณฐานภายนอก จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ พบว่า ไพรเมอร์รหัส UBC-808 (AG)8C สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มาตรวจสอบความหลากหลายของสายต้นกาแฟ และสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของพันธุกรรมในสายพันธุ์กาแฟในระดับชนิด ซึ่งได้ดีที่สุดซึ่งน่าจะเกิดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับบนจีโนมมีความเหมาะสม โดยจับบริเวณที่ให้ความแตกต่างในสายพันธุ์ ซึ่งหากต้องการทราบว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสำคัญอย่างไร อาจต้องนำไปศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งในการพัฒนาสายพันธุ์อาจต้องใช้จำนวนต้นและจำนวน SSR markers ที่มากขึ้นเพื่อให้แน่ใจว่าพันธุ์ดังกล่าวเข้าใกล้ความเป็น homozygous lines ซึ่งจากงานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมา เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ปรับปรุงในประเทศอินโดนีเซีย (Thomson et al., 2007) ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส มีโพลิเมอร์ฟิซึมสูง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย นอกจากนี้มีการข่มร่วม (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้มีการกระจายตัวทั้งจีโนมเหมาะสำหรับใช้ในการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อีกมากมาย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2559)

เอกสารอ้างอิง

- จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. วารสารแก่นเกษตร 40 : 299-308
- ทัศนีย์ ขาวเนียม และสมปอง เตชะโต. 2556. การเก็บรักษาเอ็มบริโอเจนิคแคลล์ของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอร่าในไนโตรเจนเหลวด้วยเทคนิค dehydration และการตรวจสอบความแปรปรวนด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์. วารสารนราธิวาสราชชนก. 6(2): 125-135
- วรารณ หิดฉิม และ สมปอง เตชะโต. 2557. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์1: 21-27
- เศรษฐา ศิริพิณฑุ์ และ มัลลิกา จินดาสิงห์. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองฝักสดโดยวิธีเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรปีที่ 43 ฉบับที่ 2 (พิเศษ) หน้า 525-528
- สุจิตรา จางตระกูล 2552. ความก้าวหน้าในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในไม้พะยุง. การประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16 เรื่อง “พันธุศาสตร์แก้วิกฤตพลังงานชาติ” ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม 2552.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 116 หน้า. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อตรวจสอบพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้า และลูกผสม. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.
- สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5:37-59.
- สุนิดา อัญจิระโรจน์. 2550. คาร์โบไฮโป และชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน. [ออนไลน์]. www.ejournals.swu.ac.th (สืบค้นเมื่อ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2562)
- Areshchenkova T. and Ganai M.W. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. Theor Appl Genet 104: 229–235.

- 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.
- Chakravarthi, B.K. and Naravaneni, R. 2006. SSR Marker Based DNA Fingerprinting and Diversity Study in Rice (*Oryza sativa*. L.). African Journal of Biotechnology. 5, 684-688.
- Cho J.S., Choi Y.J. and Chung D.K. 2000. Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus gasser* and *Lactobacillus johnsonii* and characterization of the genetically modified probiotic Curr Microbiol, 40, pp. 257-263
- Feng, Y., Hare, C. E., Leblanc, K., DiTullio, G. R., Lee, P. A., Wilhelm, S. W., Sun, J., Rose, J. M., Nemcek, N., Benner, I., and Hutchins, D. A. 2009. The effects of increased pCO₂ and temperature on the North Atlantic Spring Bloom: I. The phytoplankton community and biogeochemical response, Mar. Ecol-Prog. Ser., 388, 13–25.
- Ince AG, Karaca M, Onus AN. 2009. Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. Genet Resour Crop Evol. 56:211–221. doi: 10.1007/s10722-008-9356-4.
- Karaca M, Ince AG, Elmasulu SY, Onus AN, Turgut K (2005). Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. Anal Biochem 343: 353–355.
- Kentely, R.V., Rota, M.L., Matthewa, D.E. and Sorrells, M.E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, sorghum and wheat. Plant Mol Biol. 48: 501-510.
- 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.

- Luo J, Lee SH, VandeVrede L, Qin Z, Piyankarage S, Tavassoli E, Asghodom RT, Aissa MB, Fa M, Arancio O, et al. Re-engineering a neuroprotective, clinical drug as a procognitive agent with high in vivo potency and with GABAA potentiating activity for use in dementia. *BMC Neurosci.* 2015;16:67.
- McCouch, S., and Tankslay, S.D. 1991. Development and use of restriction fragment Length polymorphisms in rice breeding and genetic. In. *Rice biotechnology.*
- Poncet V., Hamon P., Minier J., Carasco C., Hamon S. and Noirot M. 2004. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* 47: 1071–1081 (2004)
- Powell, W., Machray, C., and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci.* 1: 215-222.
- Tankslay, 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.

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 ความเข้มข้นที่ปริมาณสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

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

หมายเหตุ เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

11. อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ (Agarose Gel Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงรูปของโมเลกุลของสาร การแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส มักทำให้ตัวกลางที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่พวกโพลีเมอร์ สำหรับดีเอ็นเอนิยมแยกโดยใช้อะกาโรส หรือโพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวกลาง การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แยก บ่งชี้และทำขึ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากการเตรียมอะกาโรสเจลทำได้สะดวกกว่าการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล การตรวจหาแถบของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันสามารถทำได้โดยการย้อมอะกาโรสเอธิเทียมโบรไมด์ แล้วตรวจสอบหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเรืองแสง (fluorescence) เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต แถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัมสามารถถูกตรวจพบได้โดยวิธีนี้ การแยกดีเอ็นเอโดยโพลีอะคริลาไมด์ยุ่งยากกว่า แต่มีอำนาจการแยก (resolving power) สูงกว่าอะกาโรสเจลมากโดยสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงคู่เบสเดียวออกจากกันได้ จึงใช้ได้ดีในเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อะกาโรสเป็นสารโพลีเมอร์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ถ้ากำหนดให้โครงรูปของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้นตรง 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 อะกาโรสยังมีความเข้มข้นมาก รูภายในจะมีขนาดเล็กลง การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสจะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส ตามสมการ

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

u = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจล

u_0 = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสภาพที่ไม่มีอะกาโรสเจล

Kr = สัมประสิทธิ์ความหน่วง(retardation coefficient)

ตารางที่ ก2 ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ไปในอะกาโรสเจล ความเข้มข้นต่าง 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 ก3 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้ในอิเล็กโตรโฟรีซิส (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 จำนวนที่ต้องการลงในฟลาสก์ 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 ละลายโดยแช่ฟลาสก์ในน้ำเดือด หรือในเตาไมโครเวฟจนออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นลงถึงประมาณ 60 °C เติม ethidium bromide (10 mg/ml) ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 µg/ml (2 ไมโครลิตรต่อ 40 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนฟลาสก์เบาๆ
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 คือบัฟเฟอร์ที่มีสีย้อม 2 ชนิด คือ bromphenol blue กับ xylene cyanol, bromphenol blue จะเคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอกๆ กับ ดีเอ็นเอ ซึ่งยาวประมาณ 300 คู่เบส และเคลื่อนที่เร็วกว่า xylene cyanol ประมาณ 2.2 เท่า xylene cyanol เคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอกๆ กับ ดีเอ็นเอ คู่ซึ่งยาวประมาณ 4 kb นอกจากนี้ยังมี glycerol หรือ sucrose ผสมอยู่ เพื่อถ่วงให้ ดีเอ็นเอ ตกถึงก้นหลุม มักจะเตรียม gel - loading buffer ที่เข้มข้นกว่าที่ใช้จริง 10 เท่า ดังนั้น ถ้ามี ดีเอ็นเอ ตัวอย่างอยู่ 10 ไมโครลิตร ใช้ gel - loading buffer 1 ไมโครลิตร ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ทุกครั้งต้องมี ดีเอ็นเอ มาตรฐาน ที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะหยอด ดีเอ็นเอ มาตรฐาน นี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด ดีเอ็นเอ มาตรฐาน ที่นิยมใช้คือ แลมด้า ดีเอ็นเอ ตัดด้วย เอนไซม์ Hind III หรือ Eco RI หรือทั้งสอง
7. เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้วทุกหลุมแล้ว ปิดฝา electrophoresis chamber แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ตั้ง voltage สูงประมาณ 1-5 โวลต์/ซม. ดีเอ็นเอ จะเคลื่อนที่จาก cathode (ขั้วสีดำ) ไปยัง anode (ขั้วสีแดง) อย่าตั้ง voltage ให้สูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะทำให้ลาย ดีเอ็นเอ โดยทั่วๆ ไป สำหรับ 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 EDTA)

54 กรัม Tris base

27.5 กรัม Boric acid

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

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

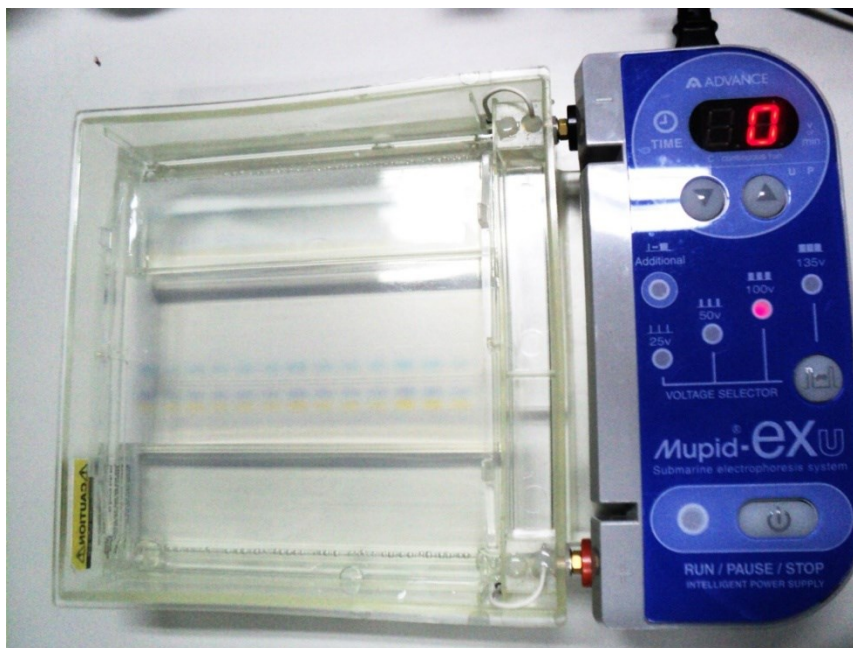
ภาคผนวก ข



ภาพที่ ข1 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)



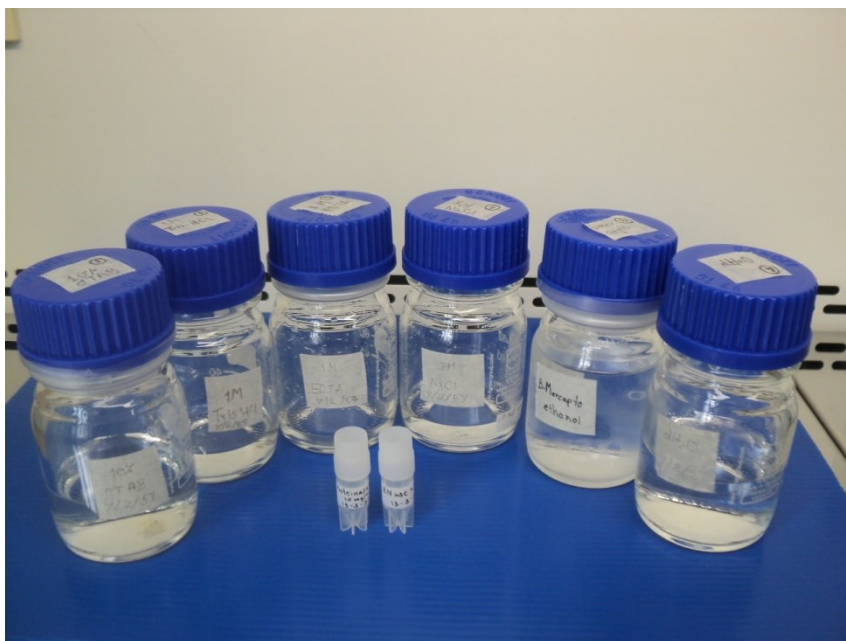
ภาพที่ ข2 ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)



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



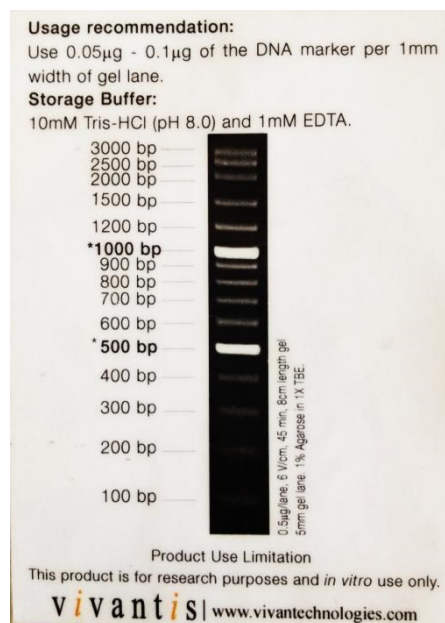
ภาพที่ ข4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)



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. เปิดสวิตช์ทางด้านหลังของเครื่อง 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

หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ มือถือ 0899612694
e-mail : toptthesun@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ จากคณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา สาขาย่อย ชีววิทยา
โมเลกุล)

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีววิทยาโมเลกุล พันธุศาสตร์โมเลกุล

งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว

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

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

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

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

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ 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 สโมสรนาคามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

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

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

กาญจน์ คุ่มทรัพย์, สุธะเชษฐ เอี่ยมสำอาง, อาดุลย์ จงรักษ์ และอาทิตย์ หุ้เต็ม. 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

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย กาญจน์ คุ่มทรัพย์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Kan Khoomsab
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3670200583980
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
เงินเดือน (บาท) 30,000 บาท
เวลาที่ใช้ทำวิจัย (16 ชั่วโมง : สัปดาห์)
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
email: topkan13@hotmail.com โทร. 084 – 113 -2456

5. ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา) วท.ม. (สัตววิทยา) ปร.ด. (เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม)
 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม R
 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
- กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2548. การอนุรักษ์สัตว์ป่าเพื่อพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาที่ยั่งยืนของประเทศไทย. วารสารมหาวิทยาลัยคริสเตียน ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 หน้า 100-109, นครปฐม.
- กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2548. สารบบกวนฮอร์โมน. วารสารมหาวิทยาลัยคริสเตียน ปีที่ 11 ฉบับที่ 3 หน้า 155-161, นครปฐม.
- กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2555. การออกแบบผลิตภัณฑ์เชิงนิเวศเศรษฐกิจและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม. SP home Service Provider Newsletter. ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 กุมภาพันธ์ หน้า 8.
- กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2559. การประยุกต์ใช้โปรแกรม R สำหรับการสอนและการวิจัยทางชีววิทยา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีที่ 24 ฉบับที่ 5 (ฉบับพิเศษ) 2559. หน้า 831 – 842.
- Panas Tumkiratiwong, Kan Khoomsab and Veerapol Boonchudoung. 2008. Seasonal Profiles of Sex Steroid Hormones and Corticosterone of Silver Pheasant *Lophura nycthemera jonesi* Maintained in Captivity, 2008, *Ornitho Sci* 7:67-73.
- Kan Khoomsab and Pojanie Khummongkol. 2010. Monitoring of Sulfate and Nitrate Fluxes above Tropical Forest Using Aerodynamic Gradient Method, 2010, International Conference on Environment 2010, Malaysia.
- Kan Khoomsab and Pojanie Khummongkol. 2010. Application of Bowen Ratio Method for Estimating Fluxes of Sulfate and Nitrate Aerosols, 2010, International Conference on Biology, Environment and Chemistry (ICBEC 2010), Hong Kong.
- Kauzhide Matsuda, Hiroyuki Sase, Naoto Murao, Tatsuya Fukazawa, Kan Khoomsub, Phuvasa Chanonmuang, Thiti Visaratana, Pojanie Khummongkol. 2012. Dry and Wet Deposition of Elemental Carbon on a Tropical Forest in Thailand. *Atmospheric Environment*.54: 282 – 287.

Kan Khoomsab and Pojanie Khummongkol. 2013. Dry Deposition of Nitrate over Forest in Tropical Climatology Using Relaxed Eddy Accumulation. Adv. Sci. Lett. 19: 2815- 2817.

Kan Khoomsab and Pojanie Khummongkol. 2013. Micrometeorological Technique for Estimation of Nitrate Dry Deposition over Forest in Tropical Climatology. Journal of Environmental Protection and Ecology. Vol.14, No.3 :836 – 842.

Kan Khoomsab, Pojanie Khummongkol and Kazuhide Matsuda. 2014. Trends in Sulfate Dry Deposition over Mixed Dipterocarp Forest in Thailand using Relaxed Eddy Accumulation Method. Sains Malaysiana 43 (3).

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดย
ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้า
โครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
งานวิจัยที่กำลังทำ :การพัฒนาเทคนิคการขับไล่แมลงก่อดำความรำคาญด้วยวิธีทาง
กายภาพและชีวเคมี
แหล่งทุน : งบประมาณแผ่นดิน 2560