



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์มะขามต้านเชื้อราด้วยเทคนิค
การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและ
การฉายรังสีแกมมา

Antifungal *Tamarindus indica* L. Crop Improvement by
DNA Fingerprint Analysis in Combination of Tissue
Culture and Gamma Ray Irradiation Techniques.

เบญจพร ศรีสุวรรณาศ และคณะ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555)

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่พิจารณาให้งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับ
เงินอุดหนุนการทำวิจัยประเภทงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555

ขอบคุณ นายวุฒิชัย แก้วมงคล นายมหามะชุพันธ์ แดเบาะ นักศึกษาหลักสูตรสาขาวิชา
ชีววิทยาชั้นปีที่ 4 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ช่วย
ดำเนินการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและภาคสนามจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอบคุณ บริษัทกิบไทย และบริษัท แบนเทรคดิง ที่กรุณาบริจาคสารเคมีบางส่วนและให้
วิทยากรช่วยแนะเทคนิคบางประการในการสกัด DNA จนกระทั่งการทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอบคุณ คุณนิษา อินทร์พุด ที่ช่วยจัดพิมพ์ต้นฉบับรายงานฉบับนี้บางส่วนจนสำเร็จ
เรียบร้อย

รศ.ดร.เบญจพร ศรีสุวรรณาศ
หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

ชื่องานวิจัย	การปรับปรุงพันธุ์มะขามต้านเชื้อราด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา
ชื่อผู้วิจัย	เบญจพร ศรีสุวรรณ และคณะ
มหาวิทยาลัย	ราชภัฏเพชรบูรณ์
ปีการศึกษา	2555

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ใช้เมล็ดมะขาม 6 พันธุ์ปลูก คือ ปรายทอง สีทอง ศรีชมภู ชันดี เปรี้ยวพื้นเมือง และเปรี้ยวยักษ์ทั้งจากต้นที่ไม่ติดเชื้อราหรือไม่ขึ้นรา และต้นที่ขึ้นราหรือติดเชื้อรา รวมทั้งหมด 600 ฝัก(100ฝัก/พันธุ์ปลูก)ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน 5 ระดับ (0, 5, 10, 15 และ 20 Kr) ทำการเพาะเมล็ดในดินปลูกตามธรรมชาติ และเพาะด้วยระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการสกัด DNA จากใบอ่อนทุกทริทเมนต์ ศึกษาลายพิมพ์ DNA ด้วยยีน rbcL ในคลอโรพลาสต์ ผลการทดลองพบว่า ยีนต้านเชื้อราไม่อยู่บนยีน rbcL และอาจไม่มียีนต้านเชื้อราในมะขาม แต่ยีน rbcL สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของทุกทริทเมนต์ได้ดี และพบว่าทั้งเชื้อราและรังสีแกมมามีผลก่อให้เกิดการกลายในมะขามทั้ง 6 พันธุ์ปลูก โดยเฉพาะที่ความเข้ม 15 Kr ก่อให้เกิดการกลายสูงสุด โดยเกิดการแทนที่ของเบสสูงสุด 75 ตำแหน่งจาก 496 bp คิดเป็น 15.12% และเป็นทำนองเดียวกันทุกพันธุ์ปลูก โดยมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และเมื่อดูการเจริญเติบโตภายนอกหรือสัณฐานวิทยาของต้นมะขามที่ได้รับรังสีดังกล่าว พบว่าที่ทริทเมนต์ 15 Kr จะมีรูปร่างแตกกิ่งก้านแบบ Reproductive stage ส่วนต้นควบคุมมีรูปร่างแบบทรงกระบอกซึ่งยังเป็นระยะ Juvenile stage ผลการทดลองนี้ตรงกับความต้องการเบื้องต้นของเกษตรกรชาวสวนมะขาม คือต้องการต้นเดี่ยว เพื่อเก็บผลผลิตง่าย และไม่ติดเชื้อรา ซึ่งต้องติดตามการเจริญเติบโตของมะขามเหล่านี้ต่อไปอีก 5- 10 ปี

คำสำคัญ: การปรับปรุงพันธุ์มะขาม การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การฉายรังสีแกมมา

TITLE: Antifungal *Tamarindus indica* L.Crop Improvement by DNA Fingerprint Analysis in Combination of Tissue Culture and Gamma Ray Irradiation Techniques.

RESEARCHERS: Benchaporn Srisuvoramas et al

UNIVERSITY: Phetchabun Rajabhat University

ACARDAMIC YEAR: 2012

ABSTRACT

This study investigate in 6 *Tamarindus indica* cultivar seeds. They are Prakaitong(PKT), Seetong(ST), Srichoompoo(SCP), Khuntree(KT), Preao-puenmuang (PPM) and Preao – Yak (PY). These seeds were collected from both fungal infected seeds and non fungal infected seeds. Total of them are 600 pods(100 pods/cultivar). They were irradiated by 5 acute gamma ray doses (0,5,10,15 and 20 Kr.) They were cultured in natural soil and Tissue Culture Techniques. DNA extraction from young leaves of all treatments were conducted. DNA fingerprint analysis through rbcL gene from chloroplast were investigated. It was found that the fungal resistance gene is not on rbcL gene, may be no more fungal resistance gene in *Tamarindus indica* cultivars. But the rbcL gene could be used as molecular marker for analyze in all treatments of cultivar level of *Tamarindus indica* . And the results show that both fungal disease and acute gamma ray irradiation could be induced mutagenic effect in 6 *Tamarindus indica* cultivars, especially the dose of 15 Kr can induced the highest mutagenic effect. Substitution of bases at 75 points or 15.12 % from 496 bp were occurred in Prakai. And they were found in the same results from each cultivar. They were hight significant different from control at 0.05 ($p < 0.05$). By the morphological study , the result showed that the control groups still young in juvenile stage but the irradiated groups are in branching stage or reproductive stage. These results are concordance with the basic need of tamarind farmers that shorter in plant height for easier to collect the products. And they need the antifungal tamarind cultivars, that we have to watch for their growth in 5-10 years later.

Key Words : *Tamarindus indica*. , Crop Improvement, DNA Fingerprint Analysis , Tissue culture and gamma rays irradiation techniques.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(2)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(6)
สารบัญภาพ	(7)
บทที่ 1 : บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
การวางแผนการทดลองและสถิติที่ใช้	3
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
ข้อตกลงเบื้องต้น	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ	4
บทที่ 2 : เอกสารอ้างอิงและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
การศึกษาพันธุกรรมของมะขามในระดับโมเลกุล	5
การเกิดรูปแบบลายสัคย์ DNA ที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด	5
การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA	6
วิธีการจัดจำแนกพันธุ์ปลูกในระดับโมเลกุล	6
การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA	8
สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR	9
การศึกษาระดับโมเลกุลของมะขามในประเทศไทย	10
บทที่ 3 : วิธีการดำเนินการวิจัย	
ตอนที่ 1 การเพาะเมล็ดร่วมกับการฉายรังสี	12
พันธุ์ปลูกประกายทอง	12
พันธุ์ปลูกสีทอง	12

พันธุ์ปลุกศรีชมภู	13
พันธุ์ปลุกขันตี	13
พันธุ์ปลุกเปรี้ยวพื้นเมือง	13
พันธุ์ปลุกเปรี้ยวยักษ์	14

สารบัญ

	หน้า
ตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี	14
ตอนที่ 3 การศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน rbcl	19
การออกแบบไพรเมอร์ (primer design)	21
การศึกษาตรวจสอบขนาดของแถบ DNA ด้วยเทคนิค PCR และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส	22
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcl (Nucleotide analysis of rbcl gene)	23
การวิเคราะห์ข้อมูลและประมวลผลเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน rbcl	23
สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ	
ตอนที่ 1 การเพาะเมล็ดร่วมกับการฉายรังสี	24
ตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี	25
ตอนที่ 3 การศึกษาลำดับเบสของยีน rbcl	26
กลุ่มประกายทอง	26
กลุ่มสีทอง	35
กลุ่มศรีชมภู	46
กลุ่มขันตี	58
กลุ่มเปรี้ยวพื้นเมือง	67
กลุ่มเปรี้ยวยักษ์	75
บทที่ 5 การสรุปผลการทดลอง วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ	
การสรุปผลและการวิเคราะห์ผลการทดลองตอนที่ 1	89

การสรุปผลและการวิจารณ์ผลการทดลองตอนที่ 2	89
การสรุปผลและการวิจารณ์ผลการทดลองตอนที่ 3	90
วิจารณ์และเสนอแนะสำหรับการทดลองต่อไป	92
เอกสารอ้างอิง	94
ภาคผนวก	97
ประวัติคณะผู้วิจัย	128

.....

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงการจัดทริทเมนต์เพื่อนำดินอ่อนไปฉายรังสี	17
3.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcL</i>	21
4.1	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกประกายทอง จำนวน 8 ทริทเมนต์ กับ <i>T. indica</i> จาก GenBank	29
4.2	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกประกายทอง จำนวน 8 ทริทเมนต์ โดยเปรียบเทียบกันเอง จำนวน 496 bp เท่ากัน ด้วยโปรแกรม Clustal W2(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 1.1.1)	31
4.3	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทอง จำนวน 8 ทริทเมนต์(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 2 ตารางที่ ผ 2.1)	38
4.4	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกศรีชมภู จำนวน 6 ทริทเมนต์(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 3 ตารางที่ ผ 3.1)	48
4.4.1	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกศรีชมภู จำนวน 5 ทริทเมนต์(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 3 ตารางที่ ผ 3.1.1)	52
4.5	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกขันดี จำนวน 8 ทริทเมนต์(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 4 ตารางที่ ผ 4.1)	62
4.6	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง จำนวน 6 ทริทเมนต์(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 5 ตารางที่ ผ 5.1)	70
4.7	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของลำดับเบสในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามหวานพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ จำนวน 6 ทริทเมนต์(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 6 ตารางที่ ผ 6.1)	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ต้นอ่อนมะขามทุกพันธุ์ปลูกอายุ 1 เดือน	24
4.2	ต้นอ่อนมะขามที่เลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือในหลอดแก้ว	25
4.3	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกประกายทองจากต้นปกติ	34
4.4	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกประกายทองจากต้นไม่ขึ้นราและต้นขึ้นรา	35
4.5	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองเบา	44
4.6	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองจุกและสีทองหนัก	44
4.7	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองหัวจุกหรือสีทองจุก	45
4.8	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองหนักขึ้นรา	45
4.9	ฝักมะขามหวานพันธุ์ปลูกศรีชมภูท้องปลิงหรือศรีชมภูปลิง	49
4.10	ฝักมะขามหวานพันธุ์ปลูกศรีชมภูท้องปลิงเปรียบเทียบกับศรีชมภูท้องกลม	49
4.11	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกขันตีหยวก	62
4.12	ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลูกขันตีสร้อย	63
4.13	มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง	67
4.14	มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์	75
4.15	มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ขึ้นรา	76

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากภาวะโลกร้อนทำให้เกิดฝนตกผิดปกติในปลายเดือนธันวาคม 2552 และต้นเดือนมกราคม 2553 ซึ่งเป็นช่วงที่มะขามหวานในจังหวัดเพชรบูรณ์มีฝักเจริญเติบโตเต็มที่ ฝักสุก และเก็บฝักขายได้ เป็นผลให้มะขามหวานส่วนใหญ่ขึ้นรา โดยเฉพาะสายพันธุ์ประกายทองขึ้นราตั้งแต่อยู่บนต้น เกษตรกรต้องเผามะขามที่ขึ้นราทิ้งไปเป็นพันตัน สูญเสียรายได้จำนวนมาก เกิดวิกฤตมะขามหวานขึ้นราอย่างใหญ่หลวง จึงควรปรับปรุงพันธุ์มะขามหวานให้ต้านทานเชื้อราอย่างเร่งด่วน

เบญจพร ศรีสุวรรณและจินตนา สนามชัยสกุล (2552) ได้ทำการเพาะเชื้อราในมะขามหวานพันธุ์ปลูกประกายทอง ตั้งแต่ระยะเป็นดอก ทั้งดอกตูม(ดอกยังไม่เปิด)และดอกบาน ฝักอ่อนมะขามอายุ 1 เดือน 3 เดือน 5 เดือน 8 เดือน(ระยะคาบหมุ) และระยะฝักแก่หรือฝักสุก อายุ 9-10 เดือน ปรากฏว่าพบเชื้อราในรังไข่และฐานรองดอกของดอกบาน และฝักมะขามทุกระยะที่นำมาตรวจเชื้อ ไม่พบเชื้อราในดอกตูมเพียงทริทเมนต์เดียวจากการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่า มะขามติดเชื้อราตั้งแต่ระยะเป็นดอก เกิดจากสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งน่าจะมียู่มากมายในบรรยากาศภายในสวนมะขามปลิวไปตกบนยอดเกสรตัวเมีย ด้วยแรงลมและแมลงพาไป หรือติดอยู่กับละอองเกสรตัวผู้ซึ่งเข้าไปปฏิสนธิในรังไข่ สปอร์ของเชื้อราที่เข้าไปในรังไข่ จะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเปลือกและเจริญอยู่ภายในฝักมะขามพร้อมกับเจริญเติบโตขึ้นของฝักมะขาม ดังนั้นเมื่อตรวจเพาะเชื้อในฝักอ่อนทุกระยะและฝักแก่ที่ไม่มีรอยแตกหรือร่องรอยของการถูกทำลายด้วยเชื้อราจากผิวนอก จึงตรวจพบเชื้อราดังกล่าว นอกจากนี้ผู้ทดลองยังพบว่า น้ำส้มควันไม้และสารสกัดจากสะเดาสามารถกำจัดเชื้อราจากมะขามได้ และได้แนะนำให้เกษตรกรชาวสวนมะขามใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา ฉีดพ่นที่พื้นดินใต้ต้นมะขามเพื่อกำจัดเชื้อรา และปรับปรุงดินร่วมกับการฉีดพ่นน้ำส้มควันไม้ตั้งแต่ระยะเป็นดอก และฉีดสารสกัดสะเดาในระยะเริ่มติดฝัก คำแนะนำนี้เป็นเพียงการป้องกันและลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในฝักมะขามเท่านั้น สำหรับมะขามฝักที่ได้รับสปอร์ของเชื้อราตั้งแต่ยังเป็นดอกและเจริญเติบโตขึ้นมาพร้อมกับฝักมะขาม เมื่อใดที่ฝนตกอากาศชื้นและอุณหภูมิสูงในขณะที่ฝักมะขามเริ่มลูก เช่นกรณีเกิดภาวะโลกร้อนในตอนต้นเดือนมกราคม 2553 เชื้อราจะเจริญอย่างรวดเร็วในฝักมะขาม แต่ถ้าอากาศไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา เชื้อราในฝักจะตายไปและถูกเนื้อเยื่อมะขามทำลายและกำจัดไปในที่สุด ในเบื้องต้นการแก้ไขด้วยการคัดเลือกพันธุ์ที่ต้านเชื้อราตามธรรมชาติ แล้วขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เบญจพร ศรีสุวรรณและคณะ,2544) ร่วมกับเทคนิคการปักชำยอดในห้องปฏิบัติการ เช่นเดียวกับการขยายพันธุ์ต้นสักมงคลสายพันธุ์เสาชิงช้า(กรมป่าไม้,2552) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของยีนด้วยเทคนิคDNAเครื่องหมายจะเหมาะสมที่สุด เพราะอาจมีการกลายเกิดขึ้นในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเนื่องจากมะขามเป็นพืชที่มีวงจรชีวิตยาวนาน เจริญเติบโตช้า ต้นมะขามอายุ 5-10 ปี จึงจะออกดอกให้ผลผลิตได้ การใช้เทคนิคตรวจลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ เข้าช่วย จะทำให้ตรวจพบสายพันธุ์/พันธุ์ปลูกที่ไม่ต้องการได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าแรก ไม่ต้องรอจนถึงระยะเวลาที่มะขามออกดอกออกผล เราจึงควรทดลองสร้างสายพันธุ์/พันธุ์ปลูกต้านเชื้อราในห้องปฏิบัติการ โดยการฉายรังสีหรือเลี้ยงในสภาวะเครียดต่าง ๆ

ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฯลฯ มะขามเปรี้ยว หรือมะขามพันธุ์ปลูกอื่น ๆ อีกหลายพันธุ์ปลูก ไม่เป็นเชื้อรา หรือเป็นน้อยไม่เกิน 20 % การตรวจลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ จะทำให้ทราบว่ามะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมีถิ่นแตกต่างกันอย่างไร ถ้าจำเป็นอาจจะต้องตัดต่อยีนต้านเชื้อราจากพันธุ์ปลูกหนึ่งสู่อีกพันธุ์ปลูกหนึ่งก็ได้ จะเห็นได้ว่าการตรวจลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ มีนักศึกษาระดับปริญญาโท 2 ท่าน คือ สุวนิดา อัญจิระโรจน์, 2550 ศึกษาหาลำดับเบสของยีน ITS ในมะขามจังหวัดเพชรบูรณ์ 10 พันธุ์ปลูก ซึ่งพบว่า ยีน ITS ไม่สามารถใช้เป็น Molecular marker ในการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกในมะขามได้ ผู้ศึกษาเรื่องนี้อีกท่านหนึ่งคือ ปฎิภาณี ชันธโณ, 2550 ได้ศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มะขามเพชรบูรณ์ 3 พันธุ์ปลูก โดยใช้ยีน rbcL ซึ่งพบว่ายีนชนิดนี้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของพันธุ์ปลูก 3 พันธุ์ปลูก คือ ศรีชมภู ชันติ และเปรี้ยวยักษ์ โดยพิจารณาร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก และมีได้ทำในแง่การปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาแหล่งกำเนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามจากประเทศอื่นในทวีปต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ของ Diallo และคณะ (2007) ผู้วิจัยมีความเห็นว่า ควรทำการทดลองต่อยอด โดยนำเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน rbcL ในคลอโรพลาสต์ ร่วมกับการศึกษาข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาของลักษณะดอกและผล มาทดลองซ้ำและทำเพิ่มในมะขาม 6 พันธุ์ปลูก และทำทั้งต้นที่ขึ้นราและไม่ขึ้นรา พร้อมทั้งฉายรังสีแกมมาเพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ไปด้วยในตัว ต้นที่เลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา จะใช้เป็นเทคนิคในการศึกษาต้นที่ขึ้นรา แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับเบสและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุกทริทเมนต์ เพื่อตรวจหาจุดแตกต่าง (single nucleotide analysis) ระหว่างพันธุ์ปลูกเดียวกัน และจุดแตกต่างระหว่างต่างพันธุ์ปลูก ในมะขาม 6 พันธุ์ปลูก คือ ปรายทอง สีทอง ศรีชมภู ชันติ เปรี้ยวพื้นเมืองและเปรี้ยวยักษ์ ซึ่งเป็นพันธุ์เศรษฐกิจของจังหวัดเพชรบูรณ์ บางทีเราอาจจะได้ลำดับเบสและรูปแบบเฉพาะของยีนที่ต้านเชื้อราในมะขามทั้ง 6 พันธุ์ปลูก เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์มะขามในระดับโมเลกุลต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ในยีน rbcL ด้วยเทคนิค PCR ของมะขามต้นที่ไม่ติดเชื้อราและต้นที่ติดเชื้อราจากมะขาม 6 พันธุ์ปลูก (ปรายทอง, สีทอง, ศรีชมภู, ชันติ เปรี้ยวพื้นเมืองและเปรี้ยวยักษ์) ซึ่งเกิดจากการเพาะเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสี 4 ระดับเพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปลูกและคัดเลือกพันธุ์ต้านเชื้อราของมะขาม
2. ศึกษาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL ด้วยเทคนิค PCR ของมะขาม 6 พันธุ์ปลูก (ปรายทอง, สีทอง, ศรีชมภู, ชันติ, เปรี้ยวพื้นเมืองและเปรี้ยวยักษ์) ที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีเพื่อคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่ต้านเชื้อราโดยเทียบกับลำดับเบสในยีน rbcL จากข้อ 1 หรือเกิดพันธุ์ปลูกใหม่เนื่องจากผลของรังสี
3. ศึกษาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL ด้วยเทคนิค PCR ของมะขาม 3 พันธุ์ปลูก (สีทอง, ศรีชมภูและชันติ) ที่มีชื่อพ้องอย่างอื่นอีก 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสีทอง มีชื่อพ้อง 3 ชื่อ คือ สีทองหนัก สีทองเบา และสีทองหัวจุก กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มศรีชมภู มี 2 ชื่อพ้อง คือ ศรีชมภูท้องปลิง กับศรีชมภูท้องกลม และกลุ่มที่ 3 กลุ่มชันติ มี 2 ชื่อพ้องคือ ชันติหยวก กับชันติสร้อย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้มะขาม 6 พันธุ์ปลูก คือ ปรายทอง, สีทอง , ศรีชมภู , ชันดี, เปรี้ยวพื้นเมืองและเปรี้ยวยักษ์ จากจังหวัดเพชรบูรณ์เท่านั้น ทั้งต้นที่ปลูกในดินตามธรรมชาติที่ไม่ติดเชื้อราและติดเชื้อรา และต้นที่เจริญในหลอดแก้วร่วมกับการฉายรังสีแกมมา 5 ระดับคือ 0,5,10,15 และ 20 Kr

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอใช้ชุด Kit Real Genomics ของบริษัท RBC Bioscience Crop ประเทศไต้หวัน ซึ่งเป็นวิธีประยุกต์จากวิธี CTAB

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน rbcL ด้วยปฏิกิริยา PCR ใช้คู่ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ ซึ่งสังเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ดังนี้

rbcL-Tam-F03 ซึ่งมีลำดับเบส : CAT GGG AAG AAA TGA TAA AAA

และ rbcL-Tam-R04 ซึ่งมีลำดับเบส : CAT GGG AAG AAA TGA TAA AAA

4. วิธีการทำต่อยีนเป้าหมาย (ยีน rbcL ในคลอโรพลาสต์) ที่ต้องการศึกษาครั้งนี้ในมะขาม 6 พันธุ์ปลูกทุกพันธุ์ปลูกจะถูกฉายรังสี 4 ระดับ และการติดเชื้อราของฝักที่นำมาศึกษา โดยใช้วิธีปลูก 2 วิธี รวมเป็น 20 ทรีทเมนต์คอมบินเนชัน(Treatment combinations)ต่อพันธุ์ปลูก

การวางแผนการทดลองและสถิติที่ใช้

ในการจัดทรีทเมนต์เพื่อการเพาะเมล็ดมะขามทั้งในดินและในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนการจัดทรีทเมนต์เพื่อนำตัวอย่างไปฉายรังสี ใช้แผนการทดลองแบบCRD (Completely Randomized Design)วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล แบบจำแนกทางเดียว(One-way ANOVA) โดยใช้สถิติ F-test และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ DMRT แต่ทั้ง 20 ทรีทเมนต์คอมบินเนชัน/พันธุ์ปลูก จะไม่แสดงการเก็บข้อมูลทางด้านการเจริญเติบโต และผลการวิเคราะห์ทางด้านสถิติ แต่มุ่งจะนำใบมะขามจากทุกทรีทเมนต์คอมบินเนชันไปทำการสกัด DNA เพิ่มปริมาณของยีน rbcL ที่ศึกษาด้วยเทคนิค PCR นำ PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสของยีน(Sequencebase)หรือลำดับของนิวคลีโอไทด์(Sequence nucleotide)ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(percent identity)หรือเปอร์เซ็นต์ความต่าง ซึ่งใช้เกณฑ์ต่างกันเกิน 5% ถือว่ามีการแทนที่ของเบสมากจนมีการกลายเกิดขึ้น โดยใช้โปรแกรม Clustal W2 และวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นรายจุด (single nucleotide analysis) ด้วยโปรแกรม BioEdit ซึ่งใช้กับเครื่องคอมพิวเตอร์บุคคลทั่วไป การทดลองนี้มีตัวแปรที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

ตัวแปรต้น : วิธีการทำต่อยีนเป้าหมายคือ เชื้อราและการฉายรังสี 5 ระดับ และวิธีปลูก 2 วิธี

รวมเป็น 20 วิธีหรือ20 ทรีทเมนต์คอมบินเนชัน/พันธุ์ปลูก

ตัวแปรตาม : ความแตกต่างของลำดับเบสยีน rbcL จาก มะขามทั้ง 6 พันธุ์ปลูกที่ติดเชื้อรา

และได้รับรังสีต่างกัน ซึ่งเกิดจากวิธีปลูกต่างกัน 2 วิธี

ตัวแปรที่ต้องควบคุม : อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีตลอดจนเทคนิควิธีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองทุกขั้นตอน เช่น วิธีสกัดจีโนมิกDNA เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA เครื่องวัดปริมาณ DNA การตรวจสอบคุณภาพ

ของจีโนมที่เอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส การใช้ไพรเมอร์ ความเข้มข้นและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทุกขั้นตอน เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส ฯลฯ

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

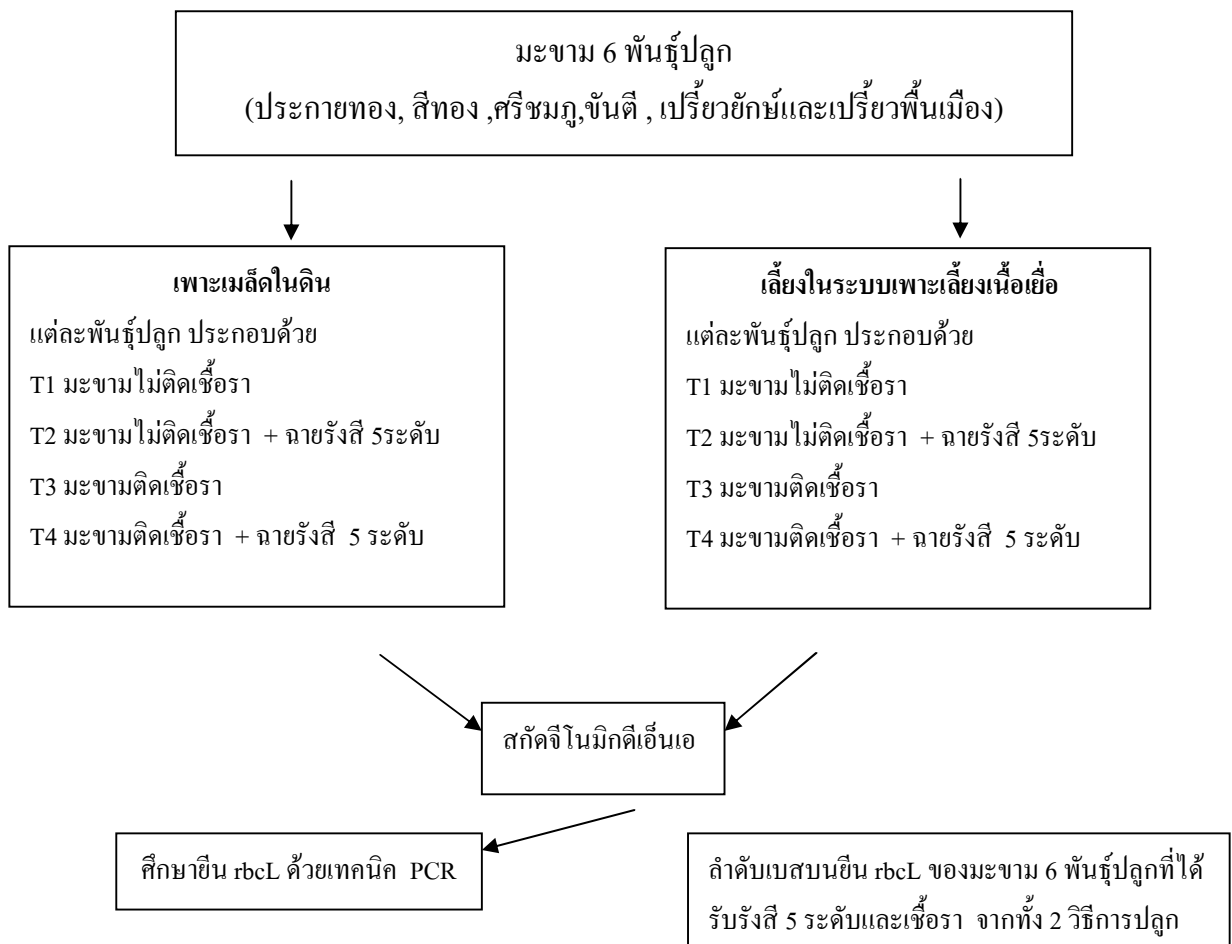
ทฤษฎี 1 : เทคนิคการศึกษาเครื่องหมายระดับโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน rbcL ในคลอโรพลาสต์ และ DNA ในนิวเคลียสบน 5.8S rDNA (nuclear ribosomal DNA) ที่บริเวณ ITS1 (Internal transcribed spacer 1) และ ITS2 ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RFLP หรือ RAPD และ/หรือเทคนิคอื่น ๆ จะสามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การเกิดการกลาย การจำแนกชนิดและวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogeny) ของพืชได้

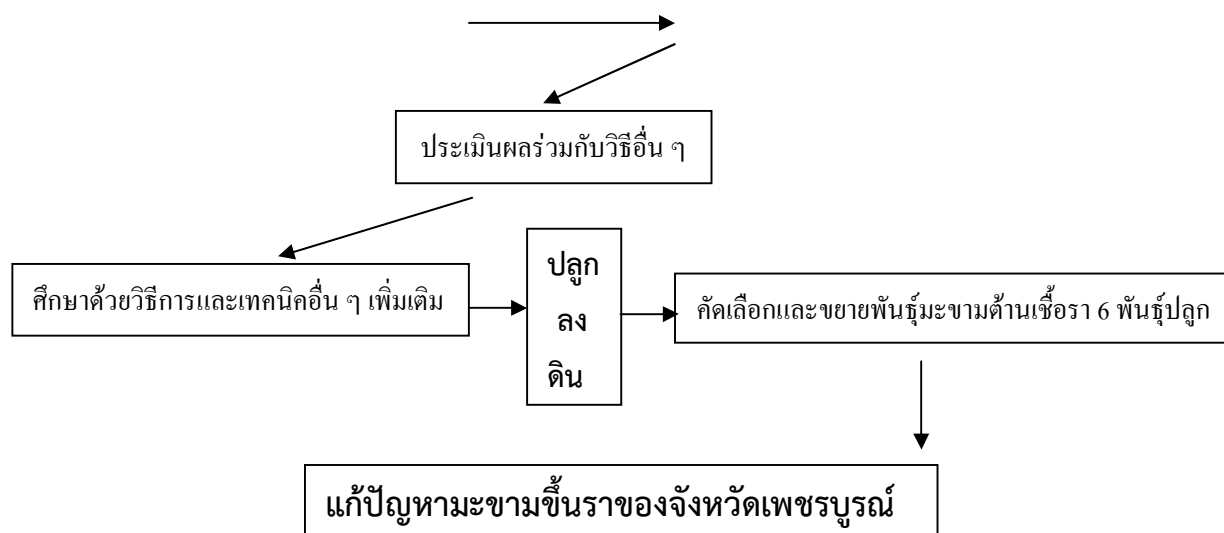
ทฤษฎี 2 : รังสีแกมมาความเข้มที่เหมาะสมสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายลักษณะที่ดีในพืชได้

สมมุติฐาน1 : ถ้ายีนต้านเชื้อราของมะขามอยู่บนดีเอ็นเอช่วงที่เป็นยีน rbcL ที่ทำการศึกษา จะพบความแตกต่างของลำดับเบส จากทริทเมนต์ใดทริทเมนต์หนึ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

สมมุติฐาน2 : ถ้าวางรังสีแกมมาความเข้มที่เหมาะสมสามารถก่อให้เกิดการกลายที่ดีในพืชได้ รังสีความเข้ม 4 ระดับที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ 5,10,15 และ 20 Kr น่าจะมีความเข้มระดับระดับหนึ่งก่อให้เกิดการกลายที่ดีในมะขามทั้ง 6 พันธุ์ปลูกได้(การกลายที่ต้องการคือ ต้านเชื้อราและมีต้นเตี้ยแข็งแรงไม่ล้มง่าย)

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย





ข้อตกลงเบื้องต้น

รายงานการวิจัยนี้ไม่แสดงรายละเอียดข้อมูลการเจริญเติบโตของการปลูกมะขามทุกทรีทเมนต์เนื่องจากต้องการศึกษาลำดับเบสของยีนrbCL ที่ถูกกระทำตามทรีทเมนต์ต่าง ๆ และไม่สามารถแสดงผลทางด้านสัญญาณวิทยาของมะขามอันเป็นผลจากการถูกเชื้อราและรังสีทั้ง 4 ระดับ เนื่องจากมะขามเป็นพืชที่เจริญเติบโตช้า และมีวงชีวิตยาวนาน ยังไม่เห็นความแตกต่าง 1-2 ปีแรกของการทดลอง

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1. ได้Molecular marker หรือลำดับเบสของ Primer 1 คู่ ขนาด 21 bp ที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้จำแนกพันธุ์ได้ถึงระดับพันธุ์ปลูก(cultivar)ของมะขาม ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาท้องถิ่นในจังหวัดเพชรบูรณ์
2. ได้ข้อมูลในการกลายของมะขามที่เกิดจากเชื้อราและรังสีแกมมา 4 ระดับ
3. ได้ข้อมูลในการทำวิจัยต่อยอดเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์มะขามจังหวัดเพชรบูรณ์ในอนาคตต่อไป

บทที่ 2

เอกสารอ้างอิงและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะขามทุกพันธุ์ปลูก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* L. จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีถิ่นกำเนิดในแอฟริกาตะวันออกและเอเชียใต้ (Polhill and Raven, 1981) ในประเทศไทยปลูกได้ทั่วไปทุกภาค มีรสชาติเปรี้ยว เปรี้ยวอมหวาน และหวานสนิท

การศึกษาพันธุกรรมของมะขามในระดับโมเลกุล

วิชัย บุญแสง และคณะ(2547) ได้อธิบายไว้ว่า การตรวจลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) คือการตรวจรูปแบบของ แถบชั้น DNA ที่ถูกแยกออกจากกันบนตัวกลางตามโครงสร้างของ DNA ของพืช ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะต้นหรือเฉพาะคน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twin) หรือพืชโคลนเดียวกันหรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ หรือลูกผสมเดียวกัน ซึ่งลายพิมพ์ DNA ดังกล่าวในพืชแต่ละต้นจะสามารถตรวจสอบซ้ำและให้ผลที่เหมือนกันตลอด ดังนั้นข้อดีของการตรวจลายพิมพ์ DNA คือสามารถตรวจสอบหาลายพิมพ์ DNA ที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชแต่ละต้นได้ สามารถทำซ้ำ ๆ กันและได้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง และลายพิมพ์ DNA จะไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย(Morris, 1994)

การเกิดรูปแบบลายคัลย DNA ที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้อธิบายไว้ว่า การทำให้เกิดรูปแบบลายคัลย DNA มี 3 วิธีดังนี้

1. Hybridization-based methods เป็นวิธีใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายจีโนมิก DNA ได้เป็นชิ้น DNA ขนาดต่างๆ ตามความจำเพาะในการตัด DNA ของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ แยกชิ้น DNA ที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) และตรวจสอบด้วยการจับ (hybridization) กับ DNA ตรวจจับ (DNA probe) ที่เป็น DNA คู่สม (complementary DNA) ซึ่งติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีหรือสารเคมี จะได้รูปแบบของชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายตำแหน่ง (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 เป็นวิธีที่ใช้การเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) หรือไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับและดำเนินปฏิกิริยา PCR สร้าง DNA

เป้าหมายขึ้นมาใหม่ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส จะได้รูปแบบหรือชิ้น DNA ที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้จำแนกความหลากหลายของพืชได้

การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล(2545)ได้สรุปประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA ไว้ดังนี้

1. เพื่อใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (Molecular Marker) ในการจำแนกพันธุ์พืช
2. เพื่อให้เห็นความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของพืช ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยการมองด้วย

สายตา

3. เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้ โดย

3.1 ช่วยในการตรวจสอบ Somaclonal Variation ในกรณีที่มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อ

3.2 ช่วยในการตรวจสอบ linkage ระหว่าง DNA marker กับลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อพันธุ์พืช

เช่น ต้านทานโรคและแมลง ฯลฯ เพื่อช่วยในการคัดเลือกและหาตำแหน่งยีนบนโครโมโซม

3.3 ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอเวลาออกดอกหรือผล

4. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืช

วิธีการจัดจำแนกพันธุ์ปลูกพืชในระดับโมเลกุล

ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ(2550)ได้อธิบายไว้ว่า การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์หรือพันธุ์ปลูกของพืชโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชนั้น อาจมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการหาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือ DNA ได้แก่

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Weber และ Helentjaris, 1989)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Wiesman, 1998)

STS(Sequence-Tagged Site)(Daniel และคณะ, 1998)

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) (Vos และคณะ,1995)

DNA Fingerprinting analysis การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA (Nyborn และคณะ, 1990)

เทคนิคเหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับ DNA ซึ่งใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ ชิ้น DNA ที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายของลักษณะใดลักษณะหนึ่งเรียกว่า molecular marker ซึ่ง

หมายถึงการใช้ DNA เป็นเครื่องหมายในการตรวจและใช้ประโยชน์จากการเกิดความแตกต่างหรือ polymorphism ของลำดับ DNA ที่แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาทางชีวโมเลกุล

เครื่องหมายDNA คือ ชิ้นDNAสายสั้น ๆ ที่ลำดับเบสสามารถจับกันหรือเข้าคู่กับช่วงใดช่วงหนึ่งบนสาย DNA หรือโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย ทำให้สามารถกำหนดหรือระบุตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตได้ ความแตกต่างที่พบจากการใช้เครื่องหมาย DNAตรวจสอบสารพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดหรือต่างพันธุ์กัน เกิดขึ้นจากการเรียงตัวของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาระหว่างเครื่องหมาย DNA ชนิดต่าง ๆ ตำแหน่งการวางตัวและปริมาณของแถบ DNA (DNA band) ที่ปรากฏบนตัวกลางในการตรวจสอบภายหลังจากการทำปฏิกิริยาจึงแตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่นำมาทำการศึกษได้

เครื่องหมาย DNA ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบหาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามหลักการคือ

1. วิธีการ RFLP
2. เทคนิค PCR

วิธีการ RFLP

อภิชาติ วรรณวิจิตร (2550) ได้อธิบายวิธีการ RFLP ว่า เป็นวิธีที่ใช้ DNA ตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วน DNA สายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบสและทำการติดฉลากสารกัมมันตรังสีเพื่อใช้ในการติดตามผล นำมาทำปฏิกิริยากับ DNA ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจที่ถูกแยกเป็นเส้นเดี่ยวและถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์คัตจำเพาะ (restriction enzymes) โดยอาศัยความสามารถของ DNA ตรวจสอบที่สามารถเข้าคู่หรือจับกับสาย DNA เป้าหมายตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (DNA hybridization) กันได้

ผลที่ได้จากการตรวจสอบคือ แถบ DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันที่เกิดจากการเข้าคู่ระหว่างชิ้น DNA ขนาดต่าง ๆ ที่สามารถเข้าคู่กับชิ้น DNA ตรวจสอบได้ บนแผ่นเมมเบรนพิเศษจากการทำปฏิกิริยาของสารกัมมันตรังสีบนชิ้น DNA ตรวจสอบ ซึ่งขนาดของชิ้น DNA ที่ได้ เป็นผลมาจากความหลากหลายของตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์คัตจำเพาะบนสายDNA นั้น ๆ

นอกจากนี้ ชีววรรณ ชันทอง (ม.ป.พ.) ได้อธิบายเพิ่มเติมว่า การใช้เทคนิค RFLP ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างบุคคล มีหลักการว่า ในระหว่าง restriction endonuclease site ของแต่ละคนซึ่งมาจากครอบครัวต่างกัน อาจมี mutation หรือลำดับ DNA ข้าง ๆ ที่ทำให้ชิ้น DNA ที่ได้จากการตัดด้วย restriction endonuclease เดียวกันมีขนาดแตกต่างกันเมื่อแยก DNA แล้วตรวจด้วย DNA probe ที่จำเพาะ จะทำให้ได้ลักษณะของ restriction fragment ที่แตกต่างกัน

ตัวอย่างเช่น ส่วนหนึ่งของยีนที่สนใจ มีช่วงของ DNA ที่แตกต่างกันสองแบบ คือ

Morph 1 มี restriction endonuclease site 3 ตำแหน่ง เมื่อตัดชิ้น DNA ส่วนนี้แล้วนำมาจับด้วย DNA probe จะได้ชิ้น DNA ขนาดเล็ก 2 ชิ้น

Morph 2 มี restriction endonuclease site 2 ตำแหน่ง เมื่อตัดชิ้น DNA ส่วนนี้แล้วนำมาจับด้วย DNA probe จะได้ชิ้น DNA ขนาดใหญ่ 1 ชิ้น

Restriction fragment ของคนที่เป็น homozygote แบบ morph 1 เมื่อนำมาตรวจจับด้วย DNA probe จะเห็นเป็นแถบ DNA สองแถบ

Restriction fragment ของคนที่เป็น homozygote แบบ morph 2 เมื่อนำมาตรวจจับด้วย DNA probe จะเห็นเป็นแถบ DNA หนึ่งแถบ

Restriction fragment ของคนที่เป็น heterozygote เมื่อนำมาตรวจจับด้วย DNA probe จะเห็นเป็นแถบ DNA สามแถบตรงกันกับตำแหน่งของ DNA ทั้ง morph 1 และ morph 2 ด้วยการศึกษ Restriction fragment length polymorphism จึงทำให้เราทราบได้ว่าแต่ละคนมี genotype เป็นแบบใด

เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่มีความจำเพาะขึ้นในหลอดทดลองโดยทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ จากการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่าง สาร 4 ชนิด ดังนี้

1. เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย DNA
2. DNA สายสั้น ๆ 2 สายหรือไพรเมอร์ (DNA primer) ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ DNA สายใหม่เป็นตัวกำหนดขนาดของ DNA ที่ทำการสังเคราะห์
3. นิวคลีโอไทด์อิสระ (d NTPs)
4. สาย DNA ต้นแบบในหลอดทดลอง (Template)

ภายหลังการทำปฏิกิริยาจะได้สาย DNA ใหม่จำนวนมากที่ถูกกำหนดขนาดตามระยะห่างของไพรเมอร์ทั้ง 2 สายที่เข้าจับบนสายต้นแบบเมื่อเริ่มปฏิกิริยาสังเคราะห์

เครื่องหมาย DNA ที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

ก. ประเภทที่มี ไพรเมอร์ ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้มีบริเวณจับบนสาย DNA ที่สนใจในตำแหน่งที่แน่นอน ได้แก่ sequence tagged site (STS) และ SSLP (simple sequence length polymorphism) หรือ microsatellite

ข. ประเภทที่มี ไพรเมอร์ ชนิดที่ไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) เครื่องหมายชนิดนี้สามารถจับกับสาย DNA ได้หลาย ๆ ตำแหน่ง ได้แก่ RAPDs (random amplified polymorphic DNAs) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism)

ผลที่ได้จากการตรวจสอบคือ แถบ DNA ขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น โดยขนาดของชิ้น DNA จะถูกกำหนดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์ ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์จับบนสาย DNA จุดจับของ ไพรเมอร์ บนสาย DNA ที่ต่างกันจึงทำให้ชิ้น DNA ที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เป็นการศึกษาถึงไปถึงความแตกต่างในระดับของยีนซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายระดับ DNA จึงได้นำมาใช้ในงานหลาย ๆ ด้าน เช่น การสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (DNA fingerprint) การแยกสายพันธุ์ (varietal identification) การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic mapping) การหาตำแหน่งของยีน (gene tagging) และการนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์

การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่จาก DNA ต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ DNA สายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง DNA ติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากสาย DNA ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลาก DNA และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ DNA ได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรกเรียกว่า denaturing เป็นการแยกสาย DNA ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C

ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60°C

ขั้นที่สามเรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบน DNA ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA โพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75°C เอนไซม์ DNA โพลีเมอร์เรสที่ใช้ควรจะสามารถจับคู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็น DNA สายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีก

หลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณ DNA ได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสาร DNA ได้ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

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

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ DNA สายใหม่
2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ DNA ให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
3. Primer เป็น DNA เริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของ DNA ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ
4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุสมแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย
5. Template คือ DNA ต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่าง DNA ที่ต้องการนำมาตรวจหา DNA จำเพาะ

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

เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (PCR machine)

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 DNA โดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา PCR

DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหา DNA ผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหา DNA โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ DNA สามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ DNA ที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอัลตราไวโอเล็ตซึ่งจะเห็นแถบ DNA เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

ประโยชน์ของ PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรค

ปัจจุบันนี้พบว่า PCR เป็นเทคนิคสำคัญมากในงานอนุชีวโมเลกุล ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ ไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตรสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน ทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจศึกษาให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็วและเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย

ประโยชน์ของ PCR ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค (เช่น โรคเอดส์, วัณโรค, มาเลเรีย) การตรวจหายีนก่อมะเร็ง (เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่) ซึ่งประโยชน์ของ PCR ทางทางการแพทย์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ทางด้านการเกษตร PCR มีบทบาทมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การตรวจสอบสายพันธุ์พืช การตรวจวินิจฉัยโรคสายพันธุ์พืชต้านทานโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรครวมทั้งศึกษายีนกับตัวอื่น ๆ ของพืชและเชื้อโรค และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ ซึ่งเทคนิค PCR นี้ช่วยให้เข้าใจถึงพันธุกรรมของเชื้อโรคพืชและพืชอาศัย ตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส หรือเชื้อสาเหตุโรคอื่น ๆ

การศึกษาระดับโมเลกุลของมะขามในประเทศไทย

ปฏิกานี ชันธโชค (2550) ได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบลำดับเบสหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในมะขาม 3 พันธุ์ปลูก (ศรีชมภู, ชันตีและเปรี้ยวยักษ์) สรุปได้ดังนี้

1. มะขามหวานศรีชมภู และชันตี มีขนาดเท่ากับ 1,428 bp
2. มะขามเปรี้ยวยักษ์ มีขนาดเท่ากับ 1,398 bp
3. ทั้ง 3 พันธุ์มีลำดับของยีน *rbcl* แตกต่างจาก ลำดับของยีน *rbcl* ใน *T.indica* ที่มีอยู่ใน Gene Bank ทั้งหมด 24 ตำแหน่ง (1.75%)
4. ทั้ง 3 พันธุ์ปลูกมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 31, 43, 44, 696, 850, 885, 1,060, 1,061 และ 1,064
5. ศรีชมภู มีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากชันตีและเปรี้ยวยักษ์ 5 ตำแหน่ง
6. เปรี้ยวยักษ์ มีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากศรีชมภูและชันตี 4 ตำแหน่ง
7. นิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* จำนวน 9 ตำแหน่ง สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามชนิดหวานและชนิดเปรี้ยวได้
8. ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ในบริเวณ ITS ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุวนิดา อัญจิรวโรจน์ (2550)
9. การศึกษาลายพิมพ์ DNA ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ด้วยเทคนิค RAPD-PCR ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ คือ SD-03, SO-10, SO-16, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-13, OPA-16, OPA-20 โดยมี *Phyllanthus urinaria* เป็น out group หรือพันธุ์อ้างอิง

10. OPA-13 เป็นไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบของแถบDNAของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกแตกต่างกันอย่างชัดเจนมากที่สุด

11. ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index, S%) ระหว่างมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภู , ชันตี และมะขามเปรี้ยว = 0.7284-0.8722

12. จากภาพเดนโดรแกรมที่สร้างด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) สามารถแบ่งพันธุ์ปลูกของมะขามได้เป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL

13. จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL ร่วมกับลายพิมพ์DNAของมะขามที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD-PCR ในการจำแนก สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ มะขามหวานได้แก่พันธุ์ปลูกศรีชมภูและชันตี กับมะขามเปรี้ยว ได้แก่ พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์

14. การใช้ปริมาณกรดทาร์ทริกร่วมกับการวิเคราะห์ลายพิมพ์DNAใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์มะขามต่างพันธุ์ปลูกได้

15. ยาระบายในเนื้อมะขามประกอบด้วย กรดทาร์ทริก มาลิก และซิตริก โดยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ร่วมกัน

ข้อดีของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL ในการศึกษาความสัมพันธ์วิวัฒนาการ (phylogeny) หรือจำแนกชนิดของพืช เนื่องจาก

1. ยีน rbcL มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอน (unambiguous)
2. ไม่มี intron แทรกอยู่ภายในยีน
3. เกิดการเพิ่มหรือการขาดหายไปของเบส (indels) ต่ำ

DNAส่วน ITS เป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ หรือจำแนกชนิดของพืช เช่นเดียวกับยีน rbcL เพราะเป็นDNAที่พัฒนาได้เร็ว ถึงแม้จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) สูงก็ตาม และสามารถใส่จำแนกพืชได้ (ปฐวิภาณี ชันธโกศ, 2550 และสุนิดา อัญจิระโรจน์, 2550)

นอกจากนี้ สุนิดา อัญจิระโรจน์, 2550 ได้ศึกษาการโอโทปและชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่ามะขามทุกพันธุ์ปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์ มีจำนวนชุดของโครโมโซม $2n = 24$ โครโมโซม และสามารถใช้ในการมีแซทเทลไลต์เฉพาะที่โครโมโซมบางตัวเป็นเครื่องหมายระดับโครโมโซมในการจำแนกชนิดของมะขามได้ นอกจากนี้ยังใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสในDNAบริเวณ ITS ของ rDNA ในนิวเคลียส เพื่อหาความแตกต่างของมะขามหวาน 10 พันธุ์ปลูก พบว่าลำดับเบสและแถบDNAที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 0.05

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้แบ่งออกเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 การเพาะเมล็ดรวมกับการฉายรังสี

1. เก็บฝักมะขามแก่อายุ 8-10 เดือน จาก 6 พันธุ์ปลูก ทั้งจากต้นที่ไม่ติดเชื้อราหรือไม่ขึ้นรา และต้นที่ขึ้นราหรือติดเชื้อรา รวมเป็น 12 พันธุ์ปลูก คือ ปรกาทองไม่ติดเชื้อรา, ปรกาทองติดเชื้อรา, สีทองไม่ติดเชื้อรา, สีทองติดเชื้อรา, ศรีชมภูไม่ติดเชื้อรา, ศรีชมภูติดเชื้อรา, ชันติไม่ติดเชื้อรา, ชันติติดเชื้อรา, เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชื้อรา, เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชื้อรา, เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชื้อรา และเปรี้ยวยักษ์ติดเชื้อรา พันธุ์ปลูกละ 5 ต้นๆ ละ 20 ฝัก แต่ละฝักสุ่มเพียง 5 เมล็ดรวมเป็น 500 เมล็ดต่อพันธุ์ปลูก แบ่งเป็น 5 กอง ๆ ละ 100 เมล็ด

2. แต่ละพันธุ์ปลูกนำไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน (acute radiation) 5 ระดับ (ทริทเมนต์) คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 Kr ระดับละ 100 เมล็ด จากนั้นนำเพาะลงในถุงดำเพื่อหาอัตราการงอก และเลือกลงกระถางดินปลูก 20 ต้นต่อทริทเมนต์ต่อพันธุ์ปลูก รวมเป็นจำนวนทริทเมนต์ทั้งสิ้นเท่ากับ 12 พันธุ์ปลูก x รังสี 5 ระดับ เท่ากับ 60 ทริทเมนต์คอมบินเนชัน โดยแต่ละพันธุ์ปลูกจะมี 10 ทริทเมนต์ ดังนี้

พันธุ์ปลูกปรกาทอง

- ทริทเมนต์ที่ 1. ปรกาทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 0 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 2. ปรกาทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 5 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 3. ปรกาทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 10 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 4. ปรกาทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 15 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 5. ปรกาทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 6. ปรกาทองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 0 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 7. ปรกาทองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 5 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 8. ปรกาทองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 10 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 9. ปรกาทองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 15 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 10. ปรกาทองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น

พันธุ์ปลูกสีทอง

- ทริทเมนต์ที่ 1. สีทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 0 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 2. สีทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 5 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 3. สีทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 10 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 4. สีทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 15 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 5. สีทองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 6. สีทองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 0 Kr จำนวน 20 ต้น

ทริทเมนต์ 10. สีทองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น

พริทามเบรต์ 10, ซีรีซเบรต์ 10, ซีรีซเบรต์ 20, ซีรีซเบรต์ 20 Kr จำนวน 20 ตัว

អត្រាប្រេង 10 ទំព័រ តើគិតថ្លៃប៉ុន្មាន ឈាត់ទំព័រ 20 Kr ចំនួន 20 ទំព័រ

พริทเมนต์ที่ 4. เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชื้อรา. ภาวะรังสี 15 Kr จำนวน 20 ต้น

- ทริทเมนต์ที่ 5. เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 6. เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 0 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 7. เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 5 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 8. เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 10 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 9. เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 15 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 10. เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชื้อรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น

พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์

- ทริทเมนต์ที่ 1. เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 0 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 2. เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 5 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 3. เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 10 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 4. เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 15 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 5. เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 6. เปรี้ยวยักษ์ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 0 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 7. เปรี้ยวยักษ์ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 5 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 8. เปรี้ยวยักษ์ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 10 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 9. เปรี้ยวยักษ์ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 15 Kr จำนวน 20 ต้น
- ทริทเมนต์ที่ 10. เปรี้ยวยักษ์ติดเชื้อรา, ฉายรังสี 20 Kr จำนวน 20 ต้น

3. ทุกทริทเมนต์จากทุกพันธุ์ปลูก เก็บใบอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ โดยเก็บจากยอดอ่อนลงมาถึงใบที่ 4 และเก็บในช่วงเวลาระหว่าง 9.45-10.15 น. เท่านั้น เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งถึงเวลาที่จะทำการสกัด DNA

ตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี

ก. การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเพาะเลี้ยง

1. เก็บฝักมะขามแก่อายุ 8-10 เดือน จาก 6 พันธุ์ปลูก (ประกายทอง, สีทอง, ศรีชมภู, ชันดี, เปรี้ยวยักษ์และเปรี้ยวพื้นเมือง) พันธุ์ปลูกละ 5 ต้นๆ ละ 15 ฝัก แต่ละฝักสุ่มเพียง 3 เมล็ดลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS พื้นฐาน โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ฝักมะขามจะใช้ทั้งจากต้นที่ไม่ติดเชื้อรา และต้นที่ติดเชื้อราของทั้ง 6 พันธุ์ปลูก ทำให้เกิด 12 ทริทเมนต์ๆ ละ 5 ต้นๆ ละ 15 ขวด แต่ละขวดมี 3 เมล็ด ดังนี้

- ทริทเมนต์ที่ 1 = ปรกาศทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 1 = PKT1.1N, PKT1.2N, PKT1.3N,PKT1.15N
 ปรกาศทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 2 = PKT2.1N, PKT2.2N, PKT2.3N,PKT2.15N
 ปรกาศทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 3 = PKT3.1N, PKT3.2N, PKT3.3N,PKT3.15N
 ปรกาศทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 4 = PKT4.1N, PKT4.2N, PKT4.3N,PKT4.15N
 ปรกาศทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 5 = PKT5.1N, PKT5.2N, PKT5.3N,PKT5.15N
- ทริทเมนต์ที่ 2 = ปรกาศทองดิดเชื้ร่าตันที่ 1 = PKT1.1P, PKT1.2P, PKT1.3P,PKT1.15P
 ปรกาศทองดิดเชื้ร่าตันที่ 2 = PKT2.1P, PKT2.2P, PKT2.3P,PKT2.15P
 ปรกาศทองดิดเชื้ร่าตันที่ 3 = PKT3.1P, PKT3.2P, PKT3.3P,PKT3.15P
 ปรกาศทองดิดเชื้ร่าตันที่ 4 = PKT4.1P, PKT4.2P, PKT4.3P,PKT4.15P
 ปรกาศทองดิดเชื้ร่าตันที่ 5 = PKT5.1P, PKT5.2P, PKT5.3P,PKT5.15P
- ทริทเมนต์ที่ 3 = สืทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 1 = ST1.1N, ST1.2N, ST1.3N,ST1.15N
 สืทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 2 = ST2.1N, ST2.2N, ST2.3N, ST2.15N
 สืทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 3 = ST3.1N, ST3.2N, ST3.3N,ST3.15N
 สืทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 4 = ST4.1N, ST4.2N, ST4.3N, ST4.15N
 สืทองไม่วดเชื้ร่าตันที่ 5 = ST5.1N, ST5.2N, ST5.3N, ST5.15N
- ทริทเมนต์ที่ 4 = สืทองดิดเชื้ร่าตันที่ 1 = ST1.1P, ST1.2P, ST1.3P,ST1.15P
 สืทองดิดเชื้ร่าตันที่ 2 = ST2.1P, ST2.2P, ST2.3P,ST2.15P
 สืทองดิดเชื้ร่าตันที่ 3 = ST3.1P, ST3.2P, ST3.3P,ST3.15P
 สืทองดิดเชื้ร่าตันที่ 4 = ST4.1P, ST4.2P, ST4.3P,ST4.15P
 สืทองดิดเชื้ร่าตันที่ 5 = ST5.1P, ST5.2P, ST5.3P,ST5.15P
- ทริทเมนต์ที่ 5 = ศรีชมภูไม่วดเชื้ร่าตันที่ 1 = SCP1.1N, SCP1.2N, SCP1.3N,SCP1.15N
 ศรีชมภูไม่วดเชื้ร่าตันที่ 2 = SCP2.1N, SCP2.2N, SCP2.3N,SCP2.15N
 ศรีชมภูไม่วดเชื้ร่าตันที่ 3 = SCP3.1N, SCP3.2N, SCP3.3N,SCP3.15N
 ศรีชมภูไม่วดเชื้ร่าตันที่ 4 = SCP4.1N, SCP4.2N, SCP4.3N,SCP4.15N
 ศรีชมภูไม่วดเชื้ร่าตันที่ 5 = SCP5.1N, SCP5.2N, SCP5.3N, SCP5.15N
- ทริทเมนต์ที่ 6 = ศรีชมภูดิดเชื้ร่าตันที่ 1 = SCP1.1P, SCP1.2P, SCP1.3P,SCP1.15P
 ศรีชมภูดิดเชื้ร่าตันที่ 2 = SCP2.1P, SCP2.2P, SCP2.3P,SCP2.15P
 ศรีชมภูดิดเชื้ร่าตันที่ 3 = SCP3.1P, SCP3.2P, SCP3.3P,SCP3.15P
 ศรีชมภูดิดเชื้ร่าตันที่ 4 = SCP4.1P, SCP4.2P, SCP4.3P,SCP4.15P
 ศรีชมภูดิดเชื้ร่าตันที่ 5 = SCP5.1P, SCP5.2P, SCP5.3P, SCP5.15P
- ทริทเมนต์ที่ 7 = ขันตีไม่วดเชื้ร่าตันที่ 1 = KT1.1N, KT1.2N, KT1.3N,KT1.15N
 ขันตีไม่วดเชื้ร่าตันที่ 2 = KT2.1N, KT2.2N, KT2.3N,KT2.15N

- ชั้นที่ไม่ติดเชือราตั้นที่ 3 = KT3.1N, KT3.2N, KT3.3N,KT3.15N
- ชั้นที่ไม่ติดเชือราตั้นที่ 4 = KT4.1N, KT4.2N, KT4.3N,KT4.15N
- ชั้นที่ไม่ติดเชือราตั้นที่ 5 = KT5.1N, KT5.2N, KT5.3N,KT5.15N
- ทริทเมนต์ที่ 8 = ชั้นติดเชือราตั้นที่ 1 = KT1.1P, KT1.2P, KT1.3P,KT1.15P
- ชั้นติดเชือราตั้นที่ 2 = KT2.1P, KT2.2P, KT2.3P,KT2.15P
- ชั้นติดเชือราตั้นที่ 3 = KT3.1P, KT3.2P, KT3.3P,KT3.15P
- ชั้นติดเชือราตั้นที่ 4 = KT4.1P, KT4.2P, KT4.3P,KT4.15P
- ชั้นติดเชือราตั้นที่ 5 = KT5.1P, KT5.2P, KT5.3P,KT5.15P
- ทริทเมนต์ที่ 9 = เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชือราตั้นที่ 1 = PPM1.1N, PPM1.2N, PPM1.3N,..... PPM1.15N
- เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชือราตั้นที่ 2 = PPM2.1N, PPM2.2N, PPM2.3N,..... PPM2.15N
- เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชือราตั้นที่ 3 = PPM3.1N, PPM3.2N, PPM3.3N,.....PPM3.15N
- เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชือราตั้นที่ 4 = PPM4.1N, PPM4.2N, PPM4.3N,.....PPM4.15N
- เปรี้ยวพื้นเมืองไม่ติดเชือราตั้นที่ 5 = PPM5.1N, PPM5.2N, PPM5.3N,.....PPM5.15N
- ทริทเมนต์ที่ 10 = เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชือราตั้นที่ 1 = PPM1.1P, PPM1.2P, PPM1.3P,.....PPM1.15P
- เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชือราตั้นที่ 2 = PPM2.1P, PPM2.2P, PPM2.3P,.....PPM2.15P
- เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชือราตั้นที่ 3 = PPM3.1P, PPM3.2P, PPM3.3P,.....PPM3.15P
- เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชือราตั้นที่ 4 = PPM4.1P, PPM4.2P, PPM4.3P,.....PPM4.15P
- เปรี้ยวพื้นเมืองติดเชือราตั้นที่ 5 = PPM5.1P, PPM5.2P, PPM5.3P,.....PPM5.15P
- ทริทเมนต์ที่ 11 = เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชือราตั้นที่ 1 = PRY1.1N, PRY1.2N, PRY1.3N,..... PRY1.15N
- เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชือราตั้นที่ 2 = PRY2.1N, PRY2.2N, PRY2.3N,..... PRY2.15N
- เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชือราตั้นที่ 3 = PRY3.1N, PRY3.2N, PRY3.3N,.....PRY3.15N
- เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชือราตั้นที่ 4 = PRY4.1N, PRY4.2N, PRY4.3N,.....PRY4.15N
- เปรี้ยวยักษ์ไม่ติดเชือราตั้นที่ 5 = PRY5.1N, PRY5.2N, PRY5.3N,.....PRY5.15N
- ทริทเมนต์ที่ 12 = เปรี้ยวยักษ์ติดเชือราตั้นที่ 1 = PRY1.1P, PRY1.2P, PRY1.3P,.....PRY1.15P
- เปรี้ยวยักษ์ติดเชือราตั้นที่ 2 = PRY2.1P, PRY2.2P, PRY2.3P,.....PRY2.15P
- เปรี้ยวยักษ์ติดเชือราตั้นที่ 3 = PRY3.1P, PRY3.2P, PRY3.3P,.....PRY3.15P
- เปรี้ยวยักษ์ติดเชือราตั้นที่ 4 = PRY4.1P, PRY4.2P, PRY4.3P,.....PRY4.15P
- เปรี้ยวยักษ์ติดเชือราตั้นที่ 5 = PRY5.1P, PRY5.2P, PRY5.3P,.....PRY5.15P

ความหมายของสัญลักษณ์ที่ใช้ในตอนที 2 ก

PKT	หมายถึง	พันธุ์ปลูกประกายทอง
ST	หมายถึง	พันธุ์ปลูกสีทอง
SCP	หมายถึง	พันธุ์ปลูกศรีชมภู
KT	หมายถึง	พันธุ์ปลูกขันตี
PPM	หมายถึง	พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง
PRY	หมายถึง	พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์

ตัวเลขหน้าจุดทศนิยม หมายถึง ต้นที่..... (ทุกพันธุ์ปลูกมี 5 ต้น)

ตัวเลขหลังจุดทศนิยมหมายถึง ขวดที่หรือฝักที่....(ทุกพันธุ์ปลูกมี15ขวด แต่ละขวดมี3เมล็ด)

N หมายถึง negative ไม่ติดเชื้อราหรือไม่ติดเชื้อรา

P หมายถึง positive ติดเชื้อราหรือขึ้นรา

เช่น ST4.1N หมายถึง พันธุ์ปลูกสีทอง ต้นที่ 4 ฝักที่ 1 หรือขวดที่ 1 ไม่ติดเชื้อรา

PM2.3Pหมายถึง พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง ต้นที่ 2 ฝักที่ 3 หรือขวดที่ 3 ติดเชื้อรา

ข. การเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนร่วมกับการฉายรังสี

1. นำต้นอ่อนมะขามมาจาก ข้อ ก. อายุ 3 สัปดาห์ ตัดออกเป็น 4 ชนิดเอกซ์แพลนต์(ยอดอ่อนหรือshoot tip, ลำต้นเหนือใบเลี้ยง, ขั้วใบเลี้ยง, และลำต้นใต้ใบเลี้ยง) ลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS + NAA 0.5 ppm. + BA 1.0 ppm. โดยลงเลี้ยงเพียง 3 ชนิดเอกซ์แพลนต์ ยกเว้นลำต้นเหนือใบเลี้ยง เมื่อต้นอ่อนที่เกิดใหม่ในหลอดแก้ว (plant let) อายุ 12 สัปดาห์ นำไปฉายรังสีแกมมา 5 ระดับ (0,5,10,15และ20 Kr.) โดยจัดทรีทเมนต์ใหม่เป็น 5 กลุ่มหรือต้น/พันธุ์ปลูก กลุ่มละ 3 ขวด/ต้น/พันธุ์ปลูก ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงการจัดทรีทเมนต์เพื่อนำต้นอ่อนไปฉายรังสี

มะขามพันธุ์ปลูก	ปริมาณรังสีแกมมา				
	Control(0Kr)	ระดับที่1(5Kr)	ระดับที่2(10Kr)	ระดับที่3(15Kr)	ระดับที่4(20Kr)

ปรกัทยทอ้งไม่ติด เชือร่า	PKT1.1-3N PKT2.1-3N PKT3.1-3N PKT4.1-3N PKT5.1-3N	PKT1.4-6N PKT2.4-6N PKT3.4-6N PKT4.4-6N PKT5.4-6N	PKT1.7-9N PKT2.7-9N PKT3.7-9N PKT4.7-9N PKT5.7-9N	PKT1.10-12N PKT2.10-12N PKT3.10-12N PKT4.10-12N PKT5.10-12N	PKT1.13-15N PKT2.13-15N ST3.13-15N ST4.13-15N ST5.13-15N
ปรกัทยทอ้งติด เชือร่า	PKT1.1-3P PKT2.1-3P PKT3.1-3P PKT4.1-3P PKT5.1-3P	PKT1.4-6P PKT2.4-6P PKT3.4-6P PKT4.4-6P PKT5.4-6P	PKT1.7-9P PKT2.7-9P PKT3.7-9P PKT4.7-9P PKT5.7-9P	PKT1.10-12P PKT2.10-12P PKT3.10-12P PKT4.10-12P PKT5.10-12P	PKT1.13-15P PKT2.13-15P ST3.13-15P ST4.13-15P ST5.13-15P
สีทอ้งไม่ติดเชือร่า	ST1.1-3N ST2.1-3N ST3.1-3N ST4.1-3N ST5.1-3N	ST1.4-6N ST2.4-6N ST3.4-6N ST4.4-6N ST5.4-6N	ST1.7-9N ST2.7-9N ST3.7-9N ST4.7-9N ST5.7-9N	ST1.10-12N ST2.10-12N ST3.10-12N ST4.10-12N ST5.10-12N	ST1.13-15N ST2.13-15N ST3.13-15N ST4.13-15N ST5.13-15N
สีทอ้งติดเชือร่า	ST1.1-3P ST2.1-3P ST3.1-3P ST4.1-3P ST5.1-3P	ST1.4-6P ST2.4-6P ST3.4-6P ST4.4-6P ST5.4-6P	ST1.7-9P ST2.7-9P ST3.7-9P ST4.7-9P ST5.7-9P	ST1.10-12P ST2.10-12P ST3.10-12P ST4.10-12P ST5.10-12P	ST1.13-15P ST2.13-15P ST3.13-15P ST4.13-15P ST5.13-15P

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

มะขามพันธุ์ปลูก	ปริมาณรังสีแกมมา				
	Control(0Kr)	ระดับที่ 1(5Kr)	ระดับที่2(10Kr)	ระดับที่3(15Kr)	ระดับที่4(20Kr)

ชั้นดีไม่ติดเข็รรา	KT1.1-3N KT2.1-3N KT3.1-3N KT4.1-3N KT5.1-3N	KT1.4-6N KT2.4-6N KT3.4-6N KT4.4-6N KT5.4-6N	KT1.7-9N KT2.7-9N KT3.7-9N KT4.7-9N KT5.7-9N	KT1.10-12N KT2.10-12N KT3.10-12N KT4.10-12N KT5.10-12N	KT1.13-15N KT2.13-15N KT3.13-15N KT4.13-15N KT5.13-15N
ชั้นดีติดเข็รรา	KT1.1-3P KT2.1-3P KT3.1-3P KT4.1-3P KT5.1-3P	KT1.4-6P KT2.4-6P KT3.4-6P KT4.4-6P KT5.4-6P	KT1.7-9P KT2.7-9P KT3.7-9P KT4.7-9P KT5.7-9P	KT1.10-12P KT2.10-12P KT3.10-12P KT4.10-12P KT5.10-12P	KT1.13-15P KT2.13-15P KT3.13-15P KT4.13-15P KT5.13-15P
เปรี้ยวพื้นเมือง ไม่ติดเข็รรา	PPM1.1-3N PPM2.1-3N PPM3.1-3N PPM4.1-3N PPM5.1-3N	PPM1.4-6N PPM2.4-6N PPM3.4-6N PPM4.4-6N PPM5.4-6N	PPM1.7-9N PPM2.7-9N PPM3.7-9N PPM4.7-9N PPM5.7-9N	PPM1.10-12N PPM2.10-12N PPM3.10-12N PPM4.10-12N PPM5.10-12N	PPM1.13-15N PPM2.13-15N PPM3.13-15N PPM4.13-15N PPM5.13-15N
เปรี้ยวพื้นเมือง ติดเข็รรา	PPM1.1-3P PPM2.1-3P PPM3.1-3P PPM4.1-3P PPM5.1-3P	PPM1.4-6P PPM2.4-6P PPM3.4-6P PPM4.4-6P PPM5.4-6P	PPM1.7-9P PPM2.7-9P PPM3.7-9P PPM4.7-9P PPM5.7-9P	PPM1.10-12P PPM2.10-12P PPM3.10-12P PPM4.10-12P PPM5.10-12P	PPM1.13-15P PPM2.13-15P PPM3.13-15P PPM4.13-15P PPM5.13-15P
เปรี้ยวยักซ์ ไม่ติดเข็รรา	PRY1.1-3N PRY2.1-3N PRY3.1-3N PRY4.1-3N PRY5.1-3N	PRY1.4-6N PRY2.4-6N PRY3.4-6N PRY4.4-6N PRY5.4-6N	PRY1.7-9N PRY2.7-9N PRY3.7-9N PRY4.7-9N PRY5.7-9N	PRY1.10-12N PRY2.10-12N PRY3.10-12N PRY4.10-12N PRY5.10-12N	PRY1.13-15N PRY2.13-15N PRY3.13-15N PRY4.13-15N PRY5.13-15N
เปรี้ยวยักซ์ ติดเข็รรา	PRY1.1-3P PRY2.1-3P PRY3.1-3P PRY4.1-3P PRY5.1-3P	PRY1.4-6P PRY2.4-6P PRY3.4-6P PRY4.4-6P PRY5.4-6P	PRY1.7-9P PRY2.7-9P PRY3.7-9P PRY4.7-9P PRY5.7-9P	PRY1.10-12P PRY2.10-12P PRY3.10-12P PRY4.10-12P PRY5.10-12P	PRY1.13-15P PRY2.13-15P PRY3.13-15P PRY4.13-15P PRY5.13-15P

ค. ทำการสกัด DNA จากใบอ่อนจากทุกทริทเมนต์

ทำการสกัด DNA จากใบอ่อนจากทุกทริทเมนต์ในตารางที่ 3.1 ด้วยวิธี CTAB ในรูปของชุด Kit เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน rbcL ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำ PCR product ส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท First Base ประเทศมาเลเซีย

ตอนที่ 3 การศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน rbcL

ในการศึกษาลำดับเบสของยีน rbcL ใช้ใบอ่อนมะขามที่เกิดจากเพาะเลี้ยงในดินตอนที่ 1 และในหลอดทดลองจากระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตอนที่ 2 ทุกพันธุ์ปลูก ทุกทริทเมนต์ ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสในยีน rbcL ที่ได้จากทั้ง 2 วิธีปลูก

การทดลองในขั้นตอนนี้ ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยการใช้ Primer rbcL Tam F03 กับ rbcL Tam R04 ในการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase / oxygenase (rbcL) ในคลอโรพลาสต์ของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง, สีทอง, ศรีชมภู, ชันดี, เปரியัพน์เมือง และเปรี้ยวยักษ์ โดยใช้ต้นที่ไม่ติดเชื้อรา ต้นที่ไม่ติดเชื้อราฉายรังสี , ต้นที่ติดเชื้อรา และต้นที่ติดเชื้อราฉายรังสีอย่างละ 5 ต้น ของทุกพันธุ์ปลูกจากการทดลองทั้ง ตอนที่ 1 และ 2 โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. สกัดจีโนมิก DNA โดยใช้ชุด kit “Real Genomic GP50” ของ บริษัท RBC Bioscience Crop Taiwan จีโนมิก DNA ที่สกัดได้ เก็บไว้ที่ -20°C

การสกัดจีโนมิก DNA โดยใช้ชุด Kit มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้น Tissue dissociation

- 1.1 ตัดใบพืชให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ 50-100 mg ใบสด/ใบแช่แข็ง (ถ้าแห้งใช้ 5 mg – 100 mg)
- 1.2 บดตัวอย่างใน Liquid N_2 จนละเอียดเป็นผง
- 1.3 ใช้ข้อดูดสารชนิดโลหะที่สะอาดตักผงใบพืชใส่ลงในหลอด microcentrifuge

ขั้น Lysis

- 1.4 ใส่ 400 μl GP1 buffer
- 1.5 ใส่ 5 μl RNase A (10 mg/ml) ปั่นด้วย vortexing ห้ามผสม GP1 buffer กับ RNase ก่อนใช้
- 1.6 incubate ที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างนั้นกลับหลอดทุก 5 นาที
- 1.7 ใส่ 100 μl GP2 buffer ผสมด้วย vortexing
- 1.8 แช่ในน้ำแข็งทุบละเอียด 3 นาที
- 1.9 วาง filter column ลงในหลอด collection ขนาด 2 ml แล้วเทสารนี้ผ่าน filter
- 1.10 ปั่นเป็นเวลา 3 นาที ที่ 13,000 rpm
- 1.11 ทิ้ง filter column ค่อย ๆ เทซูเปอร์นาแต้นท์จาก collection tube ลงในหลอด microcentrifuge tube อันใหม่

ขั้น DNA binding

- 1.12 ใส่ GP3 buffer (isopropanol) ประมาณ 1.5 เท่า เขย่าด้วย vortexing 5 นาที (ตัวอย่าง ใส่ 750 ul GP3 ลงใน 500 ul ของ lysate)
- 1.13 วาง GD column บน collection tube ขนาด 2 ml
- 1.14 ใส่ 700 ul ของ ของผสม (รวมทั้งของที่ตกตะกอน) จาก step ก่อน บน GD column
- 1.15 ปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 1.16 เทของใส่ทิ้ง แล้ววาง GD column กลับลงใน collection tube
- 1.17 ทำข้อ 14-16 อีกครั้ง เทของผสมส่วนที่เหลือ ลงไปใน GD column
- 1.18 เทส่วนใส่ทิ้ง แล้ววาง GD column กลับลงใน collection tube

ขั้น Wash

- 1.19 ใส่ 400 ul ของ W1 buffer ลงใน GD column
- 1.20 ปั่นที่ 13,000 rpm 30 วินาที
- 1.21 รินส่วนใส่ทิ้ง ใส่ GD column กลับลงใน collection tube
- 1.22 ใส่ 600 ul ของ wash buffer (ethanol ลงใน GD column)
- 1.23 ปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 1.24 รินส่วนใส่ทิ้ง ใส่ GD column กลับลงใน collection tube
- 1.25 ปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ตัวอย่างแห้ง

ขั้น DNA Elution

- 1.26 ย้าย GD column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge อันใหม่ที่ตัดฝาทิ้ง
- 1.27 ใส่ 100 ul ของ preheated elution buffer ตรงกลางของ column
- 1.28 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ในอุณหภูมิห้อง
- 1.29 นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 1.30 ย้ายสารละลาย DNA ที่กรองได้ใส่ 1.5 ml microtube อันใหม่ ปิดฝานำไปแช่ใน -20°C
- 1.31 ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิก DNA ที่สกัดได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 30 นาที ในสารละลาย Tris-acetate (TAE) buffer, pH 5.0 (Tris-acetate 0.04 โมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1.0 % เป็นตัวกลาง และใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น marker ย้อมแผ่นอะกาโรสเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel documentation รุ่น Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Canada)

2. การเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (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%)

MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ TaqDNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมิกDNA 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยา ลูโซโฟลิเมอเรส(Swift.Maxfro.Thermal Cyclers,ESCO,Singapore)ตั้งโปรแกรม ดังนี้

ขั้นที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

ขั้นที่ 3 Primer annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

ขั้นที่ 4 Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นที่ 5 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

นำผลผลิตDNAที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูปริมาณ DNA ด้วยเครื่องวัดปริมาณ DNA ยี่ห้อ Cubit ของบริษัท Marcogen ประเทศสิงคโปร์

การออกแบบไพร์เมอร์ (Primer design)

ยีนเป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้ คือยีน 1,5- ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase (rbcL) เป็นยีนที่พบในคลอโรพลาสต์ ออกแบบไพร์เมอร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน rbcL ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL ของ *Arabidopsis thaliana* (accession no. NC_000932) ที่มีแล้วใน GenBank เป็นต้นแบบไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL สังเคราะห์โดยบริษัท MARCROGEN ประเทศเกาหลีใต้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 2 ตำแหน่งของไพร์เมอร์บนยีน rbcL ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.1

การเพิ่มปริมาณDNAด้วยปฏิกิริยาลูโซโฟลิเมอเรสและการหาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ของDNA เป้าหมาย (DNA amplification and nucleotide sequencing of rbcL gene)มีรายละเอียดดังนี้

เตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ Taq DNA polymerase จำนวน 1.5 ยูนิต และจีโนมิกDNA 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูโซโฟลิเมอเรส โดยตั้งโปรแกรดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

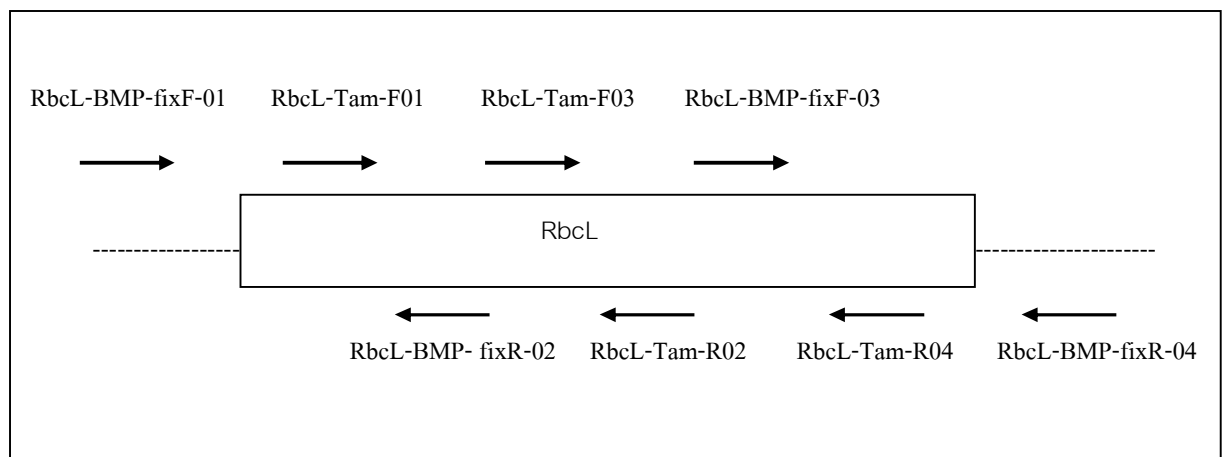
ขั้นที่ 4 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นที่ 5 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

} 35 รอบ

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณDNAและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

Primers	Nucleotide sequences 5' to 3'
RbcL-Tam-F01	TGG GTT CAA AGC TGG TGT TA
RbcL-Tam-R02	CAA GCT AGT ATT TGC GGT GAA T
RbcL-Tam-F03	CAT GGG AAG AAA TGA TAA AAA
RbcL-Tam-R04	GCA GCA GCT AAT TCA GGA CTC
RbcL-BMP-fixF-01	GTC GAG TAG ACC TTG TTG TTT TG
RbcL-BMP-fixR-02	TGC CCT TTG ATT TAC CCT GTT TC
RbcL-BMP-fixF-03	GTT GCT TCG GGA GGT ATT CAC G
RbcL-BMP-fixR-04	ATT CGG CTC AAT CCT TTT AGT A



ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณDNAของยีน *RbcL*: *RbcL-Tam-F01*, **แผนภาพที่ 3.1** แสดงตำแหน่งของยีน *rbcl* ในคลอโรพลาสต์ของมะขาม พรีเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์: *RbcL-Tam-R02*, *RbcL-Tam-F03* และ *RbcL-Tam-R04*; *Rbc-BMP-fixF-01*, *RbcL-BMP--fixR-02*, *RbcL-BMP-fixF-03* และ *RbcL -BMP-fixR-04* ที่มา (ปฏิภาณ ขันธโกก, 2550)

การศึกษาตรวจสอบขนาดของแถบDNAด้วยเทคนิค PCRและวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (NaCl 50 มิลลิโมลาร์; Tris-HCl, pH 9 , 0.50 มิลลิโมลาร์ และ blue-yellow dye) MgCl₂ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.33 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ 2 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 3) Taq DNA polymerase จำนวน 2 ยูนิต และจีโนมิกDNA 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาอุณหภูมิไซโคลิเมอร์ โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที	
ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	} 40 รอบ
ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 4 ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 5 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 6 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 7 ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที	

ตรวจสอบผลผลิตDNAวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ในสารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้กะโรสเจล ความเข้มข้น 1.0% เป็นตัวกลาง และใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น marker ย้อมแผ่นอะกาโรสเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบแถบDNAภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel documentation รุ่น Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Canada)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL (Nucleotide analysis of rbcL gene)

เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน RbcL ของมะขาม 6 พันธุ์ปลูกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน RbcL ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160) โดยใช้โปรแกรม ‘Multiple sequence alignment with hierarchical clustering’ (Corpet, 1989) และ BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) ลงทะเบียน (submitted) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างผ่านทางฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

การวิเคราะห์ข้อมูลและประมวลผลเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน rbcL

โดยใช้โปรแกรม BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) และสร้างแผนภาพเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta version 10 (Sinauer Assoc, Inc., USA) ด้วยวิธี Neighborjoining (NJ) เป็นวิธีที่ใช้ระยะทางสร้างเดนโดรแกรมโดยอาศัยความสัมพันธ์ในเชิงความเหมือนของลำดับในวงศ์วานวิวัฒนาการ (Sneath และ Sokal, 1973 และ Sokal และ Rohlf, 1981)

สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

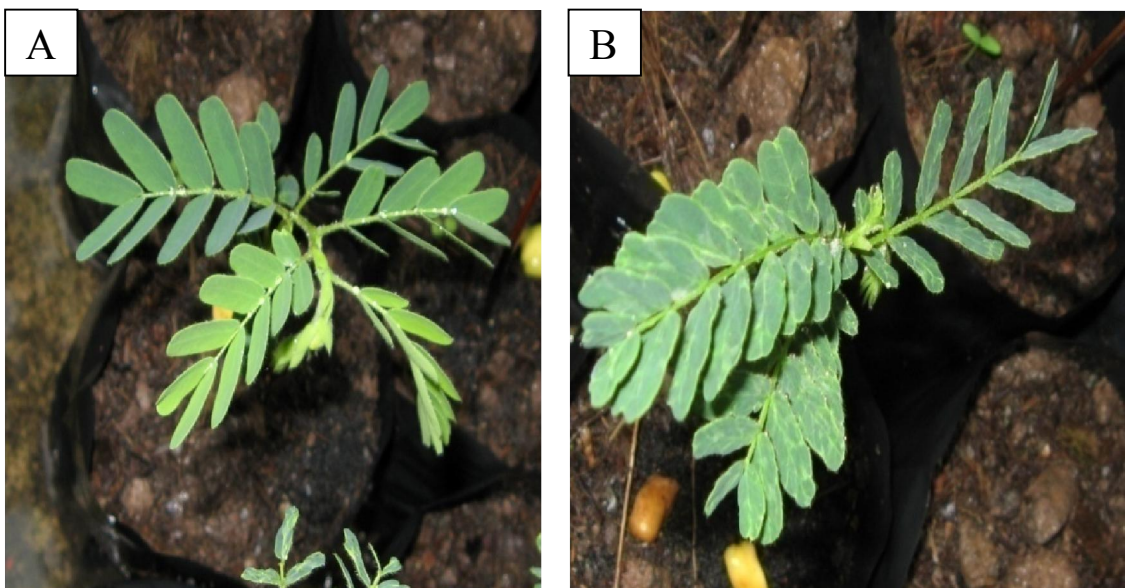
1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรภ.เพชรบูรณ์
2. ห้องปฏิบัติการDNAเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรภ.เพชรบูรณ์
3. เรือนเพาะชำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรภ.เพชรบูรณ์
4. สวนมะขามของเกษตรกร จังหวัดเพชรบูรณ์

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตอนที่ 1 การเพาะเมล็ดร่วมกับการฉายรังสี

จากการนำ มะขาม 6 พันธุ์ปลูก ทั้งจากต้นที่ด้านเชื้อราหรือไม่ขึ้นรา และต้นที่ขึ้นราหรือติดเชื้อรา รวมเป็น 12 พันธุ์ปลูก คือ ปรกกายทองด้านเชื้อรา, ปรกกายทองขึ้นรา, สีทองด้านเชื้อรา, สีทองขึ้นรา, ศรีชมภูด้านเชื้อรา, ศรีชมภูขึ้นรา, ชันติด้านเชื้อรา, ชันติขึ้นรา, เปรี้ยวยักษ์ด้านเชื้อรา, เปรี้ยวยักษ์ขึ้นรา, เปรี้ยวพื้นเมืองด้านเชื้อรา และเปรี้ยวพื้นเมืองขึ้นรา เมื่อทำการแกะเมล็ดทั้ง 12 พันธุ์ปลูกๆ ละ 50 ฝัก รวมทั้งหมด 600 ฝัก พบว่าฝักที่มีราขึ้นบริเวณหัวฝักและขึ้นยาวไปตามสาแหรก เชื้อราเจริญอยู่บนผิวเนื้อเยื่อ และเชื้อราทำลายเนื้อเยื่อไม่ถึง 50% เมล็ดจะยังสามารถงอกได้ดี แต่บางฝักที่มีราขึ้นอยู่ภายในเนื้อเยื่อ ไม่พบราที่หัวฝักและสาแหรก เนื้อเยื่อถูกทำลายมากเกินไป 50 % จะมีอัตราการงอกต่ำมาก ทำให้ตั้งข้อสังเกตได้ว่า การติดเชื้อราของมะขามน่าจะมี 2 แบบ คือเชื้อราเข้าทางรอยตัดของฝักแล้วเจริญไปตามสาแหรกเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อ กับการติดเชื้อราตั้งแต่เป็นดอก โดยเชื้อราเข้าไปเจริญในรังไข่ แล้วเจริญผ่านตัวพร้อมไปกับเนื้อเยื่อที่พัฒนา(development)กลายเป็นฝัก มะขาม ทำให้ไม่สามารถควบคุมหรือทราบอัตราการถูกทำลายของฝักมะขามแต่ละฝักหรือแต่ละพันธุ์ปลูกให้เริ่มต้นเท่ากันก่อนนำไปฉายรังสีได้ จึงนำเมล็ดจากฝักมะขามที่ไม่ขึ้นราเท่านั้นนำไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน(acute radiation) 5 ระดับ (ทรีทเมนต์) คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 Kr โดยใช้พันธุ์ปลูกละ 500 เมล็ดต่อการฉายรังสีทั้ง 5 ระดับ หรือพันธุ์ปลูกละ 100 เมล็ดต่อรังสี 1 ระดับ รวมเป็น 30 ทรีทเมนต์คอมบินเนชัน ทำการเพาะเมล็ดในแกลบและถุงดำที่ปลอดเชื้อ และเลี้ยงในเรือนเพาะชำที่สะอาด ผลการทดลองพบว่า ทุกต้นทุกทรีทเมนต์ที่โดนรังสีทุกระดับมีใบลายทั้งสิ้น ดังภาพที่ 4.1 จากนั้นเก็บใบอ่อนอายุ 4 สัปดาห์จากทุกทรีทเมนต์ เก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการสกัด DNA และวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไป



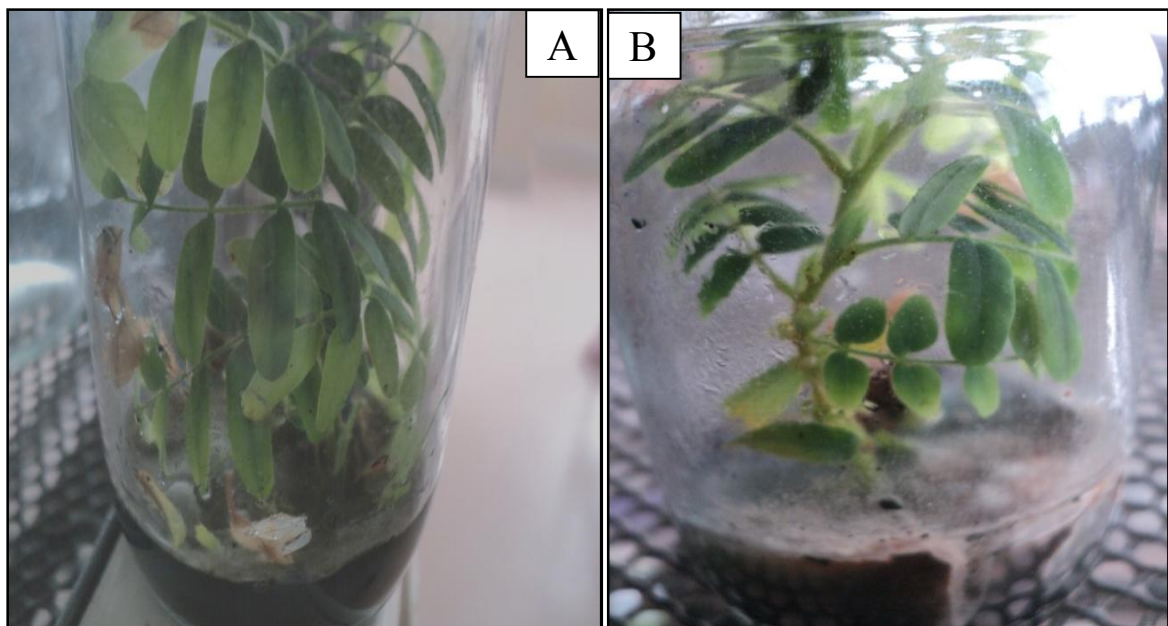
ภาพที่ 4.1 ต้นอ่อนมะขามทุกพันธุ์ปลูกอายุ 1 เดือน

A. ต้นอ่อนปกติ(ชุดควบคุมไม่โดนรังสี)

B. ต้นอ่อนที่ได้รับรังสี 5-20 K มีใบแท้ชุดแรกเป็นใบลาย หนา ขอบใบหยิก ปลายยอดหยิกงอ มีลักษณะเหมือนกันหมดทุกพันธุ์ปลูก โดยมีอัตราการงอกและการเจริญต่างกันในแต่ละพันธุ์ปลูก

ตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี

จากการทดลองโดยการเตรียมเนื้อเยื่อจากต้นอ่อนมะขาม 6 พันธุ์ปลูกซึ่งได้แก่ พันธุ์ปลูกประกายทอง, สีทอง, ศรีชมภู, ชันดี, เปี้ยวยักษ์และเปรี้ยวพื้นเมือง ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา 5 ระดับ คือ 0,5,10,15 และ20 Kr โดยนำไปฉายรังสีแบบเรื้อรัง(chronic radiation)เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่ ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ดังการจัดทรีตเมนต์ในตารางที่ 3.1 และแสดงตัวอย่างของต้นอ่อนในขวดแก้วดังภาพที่ 4.2 ซึ่งเป็นเพียงส่วนหนึ่งของการทดลองทั้งหมด เนื่องจากต้นอ่อนมะขามในขวดมีลักษณะคล้ายกันจนแยกความแตกต่าง ด้วยสายตาได้ยาก จึงไม่แสดงภาพซ้ำคล้ายคลึงกัน เมื่อนำใบอ่อนจากทุกทรีตเมนต์ในตารางที่ 3.1 ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Kit เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน rbcL ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำ PCR product ส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท First Base ประเทศมาเลเซีย ได้ผลการทดลองตอนที่ 3



ภาพที่ 4.2 ต้นอ่อนมะขามที่เลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือในหลอดแก้ว

A. ต้นอ่อนมะขามที่ไม่ขึ้นรา

B. ต้นอ่อนมะขามที่ขึ้นรา

ตอนที่ 3 การศึกษาลำดับเบสของยีน rbcL

จากการเก็บใบมะขามทุกพันธุ์ปลูกทุกทรีตเมนต์ อายุ 4 สัปดาห์ ไปทำการสกัด DNA โดยวิธี CTAB

โดยใช้ชุด kit Real Genomics ของบริษัท RBC Bioscience Crop ประเทศไต้หวัน ซึ่งเป็นวิธีประยุกต์จากวิธี CTAB ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR และใช้ คู่ primer rbcL tam F03 และ rbcL tam R04 จากนั้นส่งไป sequence ที่ บริษัท FIRST BASE ประเทศมาเลเซีย ได้ผลการ sequence ในรูปของ FASTA Format ดังนี้

กลุ่มประกายทอง

มะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง ใช้อักษรย่อ PKT(Prakaitong) ได้ส่ง DNA ไปหาลำดับเบส (sequence) จำนวน 8 ทรีทเมนต์ คือ

1. PKT1 = Prakaitong, ประกายทองต้นปกติ
2. PKTM = Fungal Prakaitong, ประกายทองต้นที่ขึ้นรา
3. PKTF1 = 1st Fungal Resistant Prakaitong, ประกายทองต้านเชื้อราต้นที่ 1
4. PKTF2 = 2nd Fungal Resistant Prakaitong, ประกายทองต้านเชื้อราต้นที่ 2
5. PKT5 = Treated with 5 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแตรด)
6. PKT10 = Treated with 10 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแตรด)
7. PKT15 = Treated with 15 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแตรด)
8. PKT20 = Treated with 20 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 20 Kr (กิโลแตรด)

นอกจากนี้ยังได้ down load ลำดับเบสในยีน rbcL ของ *T.indica* จาก GenBank มาไว้อ้างอิง และเปรียบเทียบดังนี้

>*T.indica* chloroplast rbcL gene (จาก GenBank) 570bp

```
AGTGGTTGGGTTCAAAGCTGGTGTTAAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCTGACT
ATGAAACCAAGGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGT
TCCGCCCCGAAGAAGCAGGTGCCGAGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACA
ACTGTGTGGACCGACGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACA
TCGAGCCCCTTGCTGGAGAAGAAAATCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGA
CCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTCTTT
GGGTTCAAGGCCCTGCGCGCTCTACGTCTGGAGGATTTGCGAATCCCTACTTCTTATA
TTAAAACTTTCCAGGGTCCGCCTCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAA
GTATGGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAG
AATTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTC
```

สำหรับประกายทองทั้ง 8 ทรีทเมนต์ได้ผลดังนี้

1. ประกายทองต้นปกติ(PKT1)(ภาพที่4.3) มีลำดับเบสในยีน rbcLดังนี้

>PKT1_

TCATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGCAAAATTTTCGAGGAGGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGA
CTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACT
TCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCG
TGTA TAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAA
ACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAA
GATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCCGTTGCT
TCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACTA
CAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTA
GCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATT
ATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATAGCCT

2. ปรกษยทองต่นที่ข่นรห(PKTM) (ภษพที่4.4) มีล่ำดบเบสในย่น rbcLด่งนี้

>PKTM_

TCATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGCTACAATTGCGGGAGAATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCA
TGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCT
ACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTT
TCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGG
TAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGA
AAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCCGT
TGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGT
ACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCG
AGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGA
AATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCCAGCTGCAAGTTCCTGAATAG
CCTGCTGCAAGTGAACGACCCTATCCCTCACGGTTAAGAAATGGCATCCTGAAATTTTCTTCCCAT
GCAAGA

3. ปรกษยทองต่นเช้อรหต่นที่ 1 (PKTF1)มีล่ำดบเบสในย่น rbcLด่งนี้

>PKTF1_

TCATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGCAAAATTTTCGAGGAGGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGA
CTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACT
TCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCG
TGTA TAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAA

ACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAA
AGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTGC
TTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACT
ACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGT
AGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAAT
TATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATAGCCTGCTGCAAGTTCCTGAATAGCCTGCTGCAA
GT

4. ปรกษยทองต่นซื่อรต่นที่ 2 (PKTF2)มีล่ำดับเบสในยีน rbcLดั่งนี้

>PKTF2_

TCATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGCGGGAAATGCGAGGGATTGGGAGTTTCTATCGTAATGCA
TGACTIONAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCT
ACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAG
CGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAA
GAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGTTGCTTCG
GGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACTACAA
TTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCT
CTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATC
CCGAGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATAGCCTGCGTAA

5. ปรกษยทองต่นที่ด่ำรับรังสี 5 Kr (กิโลเรต) มีล่ำดับเบสในยีน rbcLดั่งนี้

>PKT5_

GGGGGTTTGCGAAAATGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACGTCGC
TAAATACTAGCTTGTGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTAGCTTCTTCACATCCATCGTGCAAT
GATGCAGGTTATCCGATAGTTCCTACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGC
GTTACGTTTGTCTGAGTGGAGATCATATGTCAAACGCTGAGTACCTGTAGTAGGTAACTGCAGAA
GACCCGGGAAAGAGACCCAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATCGATTTTATTGAAA
AAGATCGAAGCCGCGGTAAATTTATTTACCTCAAGTGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCC
CGTTTAGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGATCTCCGCTCTGACAAACGTAGATCTTTAG
GTAGTACATGAAATTCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCAC
GATCGATGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGT
GATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATAGCCTGCT
GCAAAAACAGCTCTTTTTATCATTTCTTTCCCATGA

6. ปรกษยทองต่นที่ด่ำรับรังสี 10 Kr (กิโลเรต) มีล่ำดับเบสในยีน rbcLดั่งนี้

>PKT10_

TCTGCCCTCCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTGTCTTGCATATAATTGGCGCATTCTCTCTCCATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCCCTTATCGATAGACAGAACAATCATGGTATGCATTTTCTTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGA GGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCAGGAGTGCGACTCCTT

7. ปรกษยทองต่นท่ได้ร้บร้งส่ 15 Kr (ก่ล่เรด) ล่ำด่บเบสในย่่น rbcLด่งน่

>PKT15_

TTTTCAATTGGATTAAGTGATAAAAAATAGCTGTTTTACCTCAAGGATTATTAAGTTTCTATCTTCCTGCATGTCTAGTTAAAGGGGGGATTCTCCGCAAATACTAGCTTGGGTCAATTATTGTCGGGATGATGGTGCTACTTCTTCACCTCCGTCTGGCACTGCGTGCCTTTATCGATAGACAGAAGAATTCATGGTTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATACTTTGGAGATGATTCCCGTACTAACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCAAAACCCCTTGA GTAAGAGT

8. ปรกษยทองต่นท่ได้ร้บร้งส่ 20 Kr (ก่ล่เรด) ล่ำด่บเบสในย่่น rbcLด่งน่

>PKT20_

TCATGGGAAAGAATGATAAAAAGGGCAATTTGCCGAGGGAAAGGAGTTCTATCGTACGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTGCTTCG

GGAGGTATTACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTAACAA
TTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCT
CTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATC
CGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCAAAA

เมื่อทำการ blast ลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้กับลำดับเบสของยีน rbcL ในมะขามที่มีใน GenBank ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก1 ตารางที่ ผ1.1)

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity)ของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามหวาน พันธุ์ปลูกประกายทอง จำนวน 8 ทรีทเมนต์ กับ *T.indica* จาก GenBank

หมายเหตุ *T.indica* = PKT0, *Tamarindus indica* L.มะขามที่มีลำดับเบสของยีน rbcL ใน GenBank
PKT1 = Prakaitong, ประกายทองต้นปกติ
PKTM = Fungal Prakaitong, ประกายทองต้นที่ขึ้นรา
PKTF1 = 1st Fungal Resistant Prakaitong, ประกายทองต้านเชื้อราต้นที่ 1

Seq->	<i>T.indica</i>	PKT1	PKTM	PKTF1	PKTF2	PKT5	PKT10	PKT15	PKT20
<i>T.indica</i>	100.00								
PKT1	98.30	100.00							
PKTM	98.90	98.70	100.00						
PKTF1	98.30	100.00	98.70	100.00					
PKTF2	98.50	97.70	98.50	97.70	100.00				
PKT5	95.80	95.00	95.60	95.00	95.80	100.00			
PKT10	97.50	96.20	96.80	96.20	96.40	94.50	100.00		
PKT15	94.70	94.30	94.30	94.30	94.10	91.60	93.90	100.00	
PKT20	97.00	98.30	97.20	98.30	96.80	94.10	95.40	94.10	100.00

PKTF2 = 2nd Fungal Resistant Prakaitong, ประกายทองต้านเชื้อราต้นที่ 2

PKT5 = Treated with 5 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแรด)

PKT10 = Treated with 10 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแรด)

PKT15 = Treated with 15 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแรด)

PKT20 = Treated with 20 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 20 Kr (กิโลแรด)

Seq-> = Sequence bases in rbcL of Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม

การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามพันธุ์ปลูก

ประกายทองทั้ง 8 ทรีทเมนต์ จากตารางที่4.1 ได้ผลดังนี้

1. มะขามพันธุ์ปลูกประกายทองต้นปกติ PKT1 , ต้นขึ้นราPKTM,ต้นด้านเชื้อราต้นที่1 PKTF1 และต้นด้านเชื้อราต้นที่2 PKTF2 มีความเหมือนกัน 98.30, 98.90, 98.30และ98.50 % ตามลำดับ ทุกทริทเมนต์ต่างกันไม่เกิน 5 % (เชื้อราไม่มีผลต่อยีนrbclและ ยีนด้านเชื้อราไม่ได้อยู่ในยีนrbcl

2. มะขามพันธุ์ปลูกประกายทองต้นที่ได้รับรังสี ทั้ง 4 ระดับ คือ 5,10,15และ 20 Kr มีความเหมือนกัน 95.80, 97.50, 94.70 และ 97.00 % ตามลำดับ ทุกทริทเมนต์ต่างจากต้น *T.indica*จาก GenBank (100%)ไม่เกิน 5% ยกเว้นต้นที่ได้รับรังสี 15 Kr(94.70) จะแตกต่างจากต้น *T.indica*จาก GenBank(100%)เกิน 5%คือต่างกัน5.3%

3.มะขามพันธุ์ปลูกประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 15 Kr มีความแตกต่างจากทริทเมนต์อื่น ๆ เกิน 5% ทั้ง 7 ทริทเมนต์ คือ เหมือนกับต้นปกติ PKT1, ต้นขึ้นรา PKTMและต้นด้านเชื้อราต้นที่1 PKTF1 = 94.3% คือต่างกัน 5.7 % และเหมือนกับต้นด้านเชื้อราต้นที่2 PKTF2 = 94.1% ต่างกัน 5.9% นอกจากนี้ยังเหมือนกับต้นที่ได้รับรังสี 5 Kr 91.60% ต่างกัน 8.4% เหมือนกับต้นที่ได้รับรังสี 10 Kr 93.90% ต่างกัน 6.10% และเหมือนกับต้นที่ได้รับรังสี 20 Kr 94.10 % ต่างกัน 5.9 % (ดูรายละเอียดจากภาคผนวก 1)

4. เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์ปลูกประกายทองที่ขึ้นรา PKTM กับกลุ่มต่าง ๆ ที่ไม่ได้รับรังสี 4 กลุ่ม จะต่างกันไม่เกิน 5% คือ เมื่อเทียบกับ *T.indica*จาก GenBank เหมือนกัน 98.90% ต่างกัน 1.10% เปรียบเทียบกับ ต้นปกติ PKT1 และต้นด้านเชื้อรา PKTF1 จะมีความเหมือนกัน 98.70%ต่างกัน 1.30%เท่ากัน และเมื่อเทียบกับต้นด้านเชื้อรา PKTF2มีความเหมือนกัน 98.50%ต่างกัน 1.50% และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการฉายรังสี 4 ระดับ คือ 5, 10, 15 และ 20 Kr พบว่ามีความแตกต่างกันเกิน5%เพียงทริทเมนต์เดียวคือทริทเมนต์ที่ได้รับรังสี 15 Kr โดยเหมือนกัน 94.3%ต่างกัน5.70% นอกนั้นต่างกันไม่เกิน 5%คือเมื่อเทียบกับต้นที่ได้รับรังสี 5 Kr เหมือนกัน 95.60% ต่างกัน 4.40% เทียบกับต้นที่ได้รับรังสี 10 Kr เหมือนกัน 96.80% ต่างกัน 3.20% และเมื่อเทียบกับต้นที่ได้รับรังสี 20 Kr เหมือนกัน 97.20% ต่างกัน 2.80% (เชื้อราไม่มีผลต่อยีนrbcl,รังสี 15Krทำให้ลำดับเบสของยีน rbcl เปลี่ยนไป 5.7%-8.4%)

5. เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์ปลูกประกายทองต้นปกติPKT1กับต้นด้านเชื้อราPKTF1จะเหมือนกัน 100% และเมื่อเทียบกับต้นด้านเชื้อราต้นที่ 2 คือ PKTF2พบว่าเหมือนกัน97.70%ต่างกัน 2.30% (ประกายทอง ยีนด้านเชื้อราไม่ใช่ rbcl)

นอกจากนี้ ถ้านำลำดับเบสของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทองทั้ง 8 ทริทเมนต์จากจังหวัดเพชรบูรณ์ เปรียบเทียบกันเอง โดยไม่เทียบกับลำดับเบสที่มีใน NCBI เนื่องจากในมิได้ระบุว่าเป็นพันธุ์ปลูกใด ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.2 ดังนี้

Seq->	PKT1	PKTM	PKTF1	PKTF2	PKT5	PKT10	PKT15	PKT20	ตารางที่
PKT1	100.00								4.2
PKTM	99.60	100.00							เปรียบเทียบ
PKTF1	100.00	99.19	100.00						ยบ
PKTF2	99.80	99.80	99.80	100.00					เปอร์เซ็นต์
PKT5	99.60	99.60	99.60	99.40	100.00				ความ
PKT10	99.19	99.40	99.19	99.19	99.19	100.00			เหมือน
PKT15	86.90	86.90	86.90	86.90	86.29	86.29	100.00		(%
PKT20	99.60	99.19	99.60	99.40	99.19	99.19	87.10	100.00	Identity)

ของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามหวาน

พันธุ์ปลูกประกายทอง จำนวน 8 ทรีทเมนต์ โดยเปรียบเทียบกันเอง จำนวน 496bp เท่ากัน
ด้วยโปรแกรม Clustal W2 (ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวก 1.1.1)

หมายเหตุ	PKT1	=	Prakaitong, ประกายทองต้นปกติ
	PKTM	=	Fungal Prakaitong, ประกายทองต้นที่ขึ้นรา
	PKTF1	=	1 st Fungal Resistant Prakaitong, ประกายทองต้านเชื้อราต้นที่ 1
	PKTF2	=	2 nd Fungal Resistant Prakaitong, ประกายทองต้านเชื้อราต้นที่ 2
	PKT5	=	Treated with 5 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแรด)
	PKT10	=	Treated with 10 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแรด)
	PKT15	=	Treated with 15 Kr Prakaitong, ประกายทองต้นที่ได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแรด)

PKT20 = Treated with 20 Kr Prakaitong, ปรุ่กายทองตันที่ด้รับรังสี 20 Kr (กิโ่เรต)

Seq-> = Sequence bases in rbcL of Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 ซึ่งทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของมะขามจังหวัดเพชรบูรณ์ 8 ตรีทเมนต์ โดยการำalignment จำนวน 496 bpเท่ากัน โดยใช้โปรแกรม BioEdit ได้ผลสรุปดังนี้

1. DNAของปรุ่กายทองตันที่ขึ้นรา (PKTM)เมื่อเทียบกับต้นปกติ(PKT1) เหมือนกัน 99.60 % ต่างกันเพียง0.40% ถือว่าไม่เกิดการกลาย และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบเป็นรายจุด(single nucleotide analysis)ที่ เกิดการแทนที่ของเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit พบว่า เกิดการแทนที่ของเบสเพียง 2 จุด คิดเป็น0.04%ของ 496bp(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1.1.2) ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/18	G=Guanine
2/19	A=Adenine

2. ปรุ่กายทองตันเชื้อราตันที่ 1(PKTF1) มีลำดับเบสเหมือนต้นปกติ (PKT1) ทุกปรุ่การ 100%

3. ปรุ่กายทองตันเชื้อราตันที่ 2(PKTF2) มีลำดับเบสเหมือนต้นปกติ (PKT1) 99.80% ต่างกันเพียง 0.20% และเมื่อวิเคราะห์เป็นรายจุด พบว่า PKTF2 มีการถูกแทนที่เพียงจุดเดียว คือ ตำแหน่งที่ 18 ถูกแทนที่ด้วยG=Guanine(ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวกที่1.1.2)

4. สำหรับปรุ่กายทองที่นำไปฉายรังสี 4 ระดับ คือ 5,10,15และ20 Kr.พบว่า รังสีระดับ5,10และ 20 Kr.ไม่ก่อให้เกิดการกลาย คือ มีลำดับเบสเหมือนต้นปกติ 99.19 % เพียงแต่ก่อให้เกิดการแทนที่ของเบสในตำแหน่งที่ต่างกันเท่านั้น คือเกิดความผิดปกติ 2 จุด ,4จุด และ 4 จุด ตามลำดับ สำหรับความเข้ม 15 Kr. ก่อให้เกิดการกลายสูงสุด 75 ตำแหน่ง คิดเป็น 15.12%ของ496bp (ดูรายละเอียดในตารางภาคผนวกที่1.1.2) ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่ของเบสมีดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
PKT5 1/ 14	G=Guanine
2/ 19	A=Adenine
PKT10 1/ 15	T=Thymine
2/ 16	T=Thymine
3/ 18	C=Cytosine
4/ 496	A=Adenine
PKT20 1/ 12	G=Guanine
2/ 13	C=Cytosine

	3/ 14	A=Adenine
	4/ 15	T=Thymine
PKT15	1/ 1	T=Thymine
	2/ 3	T=Thymine
	3/ 4	C=Cytosine
	4/ 7	T=Thymine
	5/ 9	T=Thymine
	6/ 11	A=Adenine
	7/ 13	T=Thymine
	8/ 16	G=Guanine
	9/ 17	A=Adenine
	10/ 18	T=Thymine
	11/ 19	A=Adenine
	12/ 20	G=Guanine
	13/ 21	T=Thymine
	14/ 35	T=Thymine
	15/ 37	A=Adenine
	16/ 99	T=Thymine
	17/ 101	C=Cytosine
	18/ 105	C=Cytosine
	19/ 106	A=Adenine
	20/ 107	T=Thymine

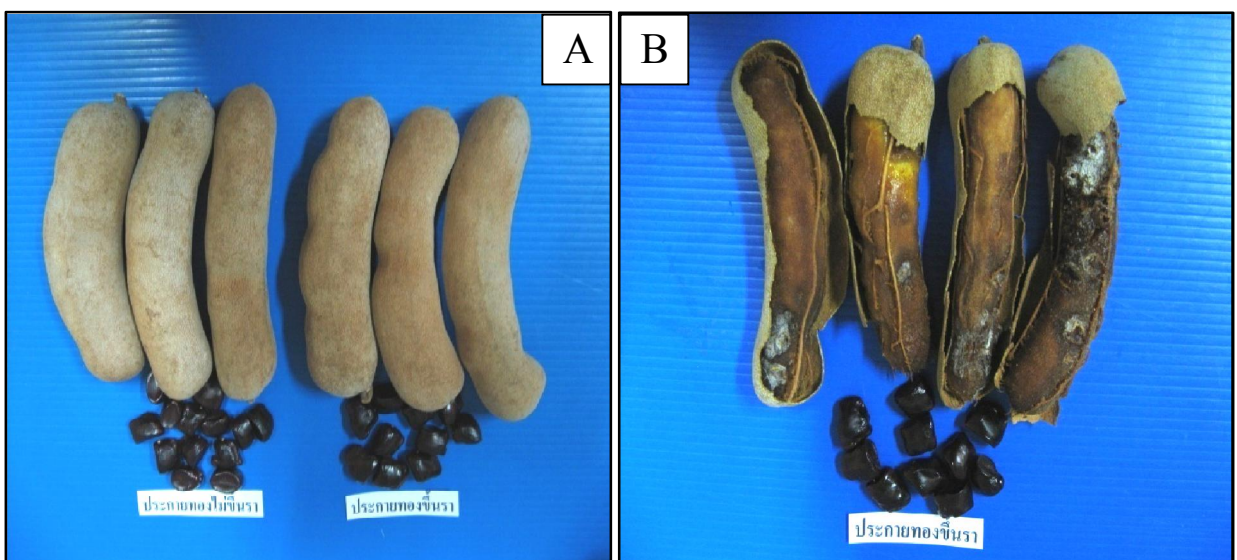
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
21/ 108	G=Guanine
22/ 109	C=Cytosine
23/ 376	C=Cytosine
24/ 377	T=Thymine
25/ 389	G=Guanine
26/ 390	A=Adenine
27/ 392	G=Guanine
28/ 393	A=Adenine
29/ 406	G=Guanine
30/ 410	G=Guanine
31/ 412	A=Adenine
32/ 413	T=Thymine
33/ 414	T=Thymine
34/ 416	G=Guanine
35/ 417	C=Cytosine
36/ 419	C=Cytosine
37/ 426	T=Thymine
38/ 428	G=Guanine
39/ 429	A=Adenine
40/ 431	A=Adenine
41/ 433	A=Adenine
42/ 434	C=Cytosine
43/ 435	C=Cytosine
44/ 436	T=Thymine
45/ 444	A=Adenine
46/ 445	G=Guanine
47/ 447	T=Thymine
48/ 450	A=Adenine
49/ 451	T=Thymine
50/ 453	G=Guanine
51/ 454	G=Guanine

52/ 455	A=Adenine
53/ 457	C=Cytosine
54/ 458	C=Cytosine
55/ 459	C=Cytosine
56/ 461	A=Adenine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
57/ 464	A=Adenine
58/ 465	T=Thymine
59/ 466	C=Cytosine
60/ 467	G=Guanine
61/ 471	G=Guanine
62/ 472	T=Thymine
63/ 474	C=Cytosine
64/ 475	A=Adenine
65/ 476	A=Adenine
66/ 478	C=Cytosine
67/ 479	C=Cytosine
68/ 483	A=Adenine
69/ 485	A=Adenine
70/ 487	C=Cytosine
71/ 488	C=Cytosine
72/ 489	T=Thymine
73/ 490	G=Guanine
74/ 491	A=Adenine
75/ 494	A=Adenine



ภาพที่ 4.3 ฝักและเมล็ดมะขามหวานพันธุ์ปลุกประกายทองจากต้นปกติ



ภาพที่ 4.4 ฝักและเมล็ดของมะขามหวานพันธุ์ปลุกประกายทองจากต้นไม่ขึ้นราและต้นขึ้นรา

- A. ฝักมะขามประกายทองไม่ขึ้นรา(ซ้าย)เปรียบเทียบกับฝักที่ขึ้นรา(ขวา) ซึ่งดูจากภายนอกจะไม่พบความแตกต่างกัน ไม่สามารถทราบได้ว่าฝักใดขึ้นราหรือไม่ขึ้นรา
- B. ฝักมะขามประกายทองขึ้นราที่แกะเปลือกออก(นำมาจากกลุ่มขวาของภาพ A)

กลุ่มสีทอง

มะขามพันธุ์ปลูกลีทอง ใช้อักษรย่อ ST(Seetong) มะขามหวานในกลุ่มนี้ ชาวสวนมะขามในจังหวัดเพชรบูรณ์ ได้สังเกตระยะเวลาในการสุก และรูปร่างของฝัก เรียกชื่อมะขามในกลุ่มนี้แตกต่างกันเป็น 3 ชื่อ คือ ลีทองเบา(STB) เป็นพันธุ์ปลูกลีที่ฝักสุกเร็ว(ประมาณเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคมก็จะสามารถเก็บฝักไปขายได้ ราคาดี ไม่มีคู่แข่ง เพราะพันธุ์อื่น ๆ ยังไม่สุก(ภาพที่4) ประมาณต้นมกราคมจนถึงเดือนมีนาคม พันธุ์ปลูกลีอื่น ๆ จะทยอยกันสุกจนหมด ออกมาขายแข่งกันในด้านรสชาติ สีส่นของเนื้อมะขาม และขนาดของฝัก หลังจากนี้จะมีพวกพันธุ์หนักคือสุกช้า ได้แก่ เพชรบัวทอง และลีทองหนัก(STN)(ภาพที่4.5)จึงจะมีฝักสุกออกมาขายตอนปลายเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม นอกจากนี้ยังมีมะขามอีกพันธุ์ปลูกลีหนึ่ง รูปร่างฝักมีส่วนโหนกคล้ายหัวจุก จึงถูกเรียกว่า ลีทองหัวจุก (STJ)(ภาพที่4.6)มีปะปนมากับพันธุ์ปลูกลีทองหนัก ทำให้ถูกสงสัยว่าจะเป็นพันธุ์ปลูกลีเดียวกับลีทองหนัก เพียงแต่ฝักได้รับอาหารไปหล่อเลี้ยงในขณะเจริญเติบโตไม่เท่ากัน จึงทำให้มีรูปร่างแปลกออกไป แต่ก็ได้จัดลีทองจุกเป็นทริทเมนต์หนึ่งเพื่อหาลำดับเบสด้วย นอกจากนี้ได้นำลีทองหนักขึ้นราไปทำการสกัด DNA เพื่อดูว่าเชื้อรามีผลต่อลำดับเบสในยีน rbcL หรือไม่ (ภาพที่4.7) ได้ส่งDNAของมะขามพันธุ์ปลูกลีทองไปทำการหาลำดับเบส (sequence) ทั้งสิ้น จำนวน 8 ทริทเมนต์ ได้ผลดังนี้

1. ลีทองเบา(STB) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>STB_

```
TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGGGCTATATGCGAGAGAATTGGGAGTTTCTATCGTGATGCATGA
CTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACT
TCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCG
TGTA TAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAA
ACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAA
AGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCGTTGC
TTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACT
ACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGT
AGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAAT
TATACCGTGGGAAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCA
```

2. ลีทองหนัก(STN) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>STN_

```
CACGGCACGGGATTGGCGAGAGATGGGAGTTCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTTC
ACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCA
ATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTA
CGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAA
ATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATT
TATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCGTTGTTCTGGGAGGTATTCACGTTT
GGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTT
```

TGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTAC
AAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAAT
GGAGTCCTGAATAGCCTGCTGCAAAA

3. สีนทองจุก(STJ)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>STJ_

TGTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTGGGGATGATAACTGCTGATTAGCTAGCGTGCT
GCTCGAGAACTTAACTGCGGGTAATCTGCTGCAAATACTATCTAGGCTCAGTATTGTCGGGATAAT
GGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATG
CATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTA
GTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTT
ATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTG
CCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGAT
TCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCT
AATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACGAAGCTCGTGAATGAGGGACGTGCATCTTGCTCGTGAG
GGTAATGAAATTATCCGTGATGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCA

4. สีนทองขึ้นรา(STM)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>STM_

TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGGGGAATTGCGAGAGAATTGGGAGTTCCTATCGTAAT
GCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGG
TCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCA
TTTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGT
AGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTAT
TGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCC
CGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTC
CGTACTACAATTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAA
TCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAA
TGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAGAATGGAGTCCTGAATAGCCTGCTGCAAAA

5. สีนทองที่ได้รับรังสี 5Kr (ST5)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>ST5_

TTTTTCTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGGGAATCGCGAGAGAATGCGGAGTTCCTATCGT
AATGCATGACTACTTAACAGGGGAGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATA
ATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTA
TGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTG

TAGTAGGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATT
TTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCT
TGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGC

6. สีนทองที่ได้รับรังสี 10Kr (ST10)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>ST10_

TTCAGGGGTTTCGCGATGATGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCC
GCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATG
CATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGT
TTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATC
ACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTAT
TTCCTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGG
CATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTG
GGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAA
GCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGG
AGTCCTGAATTAGCCTGCTGCAAAA

7. สีนทองที่ได้รับรังสี 15Kr (ST15)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>ST15_

TATCCTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGCGAAGGGAATCAGAGATGCGGCGTTCC
ATGCGTAATGCATGACTACTTAACGGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCG
GGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCA
TGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGG
TACTGTAGTAGGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGA
TGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGG
TGTTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGG
AGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGC
CGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGATCGTGATCTTGCTT
CGTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCAA

8. สีนทองที่ได้รับรังสี 20Kr (ST20)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>ST20_

TTATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGGGGGATTGCGATAGATGCTGATTAGCTTGCGTGCTGGTT
 GACTACTTAACGCGGCAGATTCACCGCGAATACTAGCTTGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCT
 ACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTT
 TCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGG
 TAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGA
 AAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGTGTTCTGCCCGT
 TGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGT
 ACTACAATTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCG
 AGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCCGTGAGGGTAATG
 AAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCATTAGGCC

เมื่อนำลำดับเบสของยีน rbcL จากมะขามพันธุ์ปลุกสีทองทั้ง 8 ทรีทเมนต์ เปรียบเทียบหา
 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) โดยใช้พันธุ์ปลุกสีทองหนัก(STN)เป็นหลักในการเปรียบเทียบ(100%)
 จำนวน 549 bp ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) ของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามหวาน
 พันธุ์ปลุกสีทอง จำนวน 8 ทรีทเมนต์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 2 ตารางที่ พ 2.1)

Seq->	STN	STB	STJ	STM	ST5	ST10	ST15	ST20
STN	100.00							
STB	98.18	100.00						
STJ	93.82	93.62	100.00					
STM	98.18	98.00	93.08	100.00				
ST5	97.83	97.45	93.08	97.63	100.00			
ST10	97.45	97.45	93.08	97.09	96.72	100.00		
ST15	97.63	96.54	93.62	97.09	97.45	97.45	100.00	
ST20	93.26	93.44	95.63	92.31	92.71	92.53	92.71	100.00

หมายเหตุ STB = Seetongbow, สีทองเบา
 STN = Seetongnak, สีทองหนัก
 STJ = Seetongjuk, สีทองจุก
 STM = Fungal Seetongnak, สีทองหนักขึ้นรา
 ST5 = Treated with 5 Kr Seetongnak, สีทองหนักได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแตรด)
 ST10 = Treated with 10 Kr Seetongnak, สีทองหนักได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแตรด)

- ST15 = Treated with 15 Kr Seetongnak, สีสทองหนักได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแตรด)
- ST20 = Treated with 20 Kr Seetongnak, สีสทองหนักได้รับรังสี 20 Kr (กิโลแตรด)
- Seq-> = Sequence bases in rbcL of Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม

จากตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน rbcL ของมะขามพันธุ์ปลุกสีทองทั้ง 7 ทริทเมนต์ คือ สีสทองเบา(STB), สีสทองจุก(STJ), สีสทองหนักขึ้นรา (STM), สีสทองหนักได้รับรังสี 5 Kr (ST5), สีสทองหนักได้รับรังสี 10 Kr (ST10), สีสทองหนักได้รับรังสี 15 Kr(ST15)และสีทองหนักได้รับรังสี 20 Kr(ST20) กับลำดับเบสของยีนrbcL ในมะขามพันธุ์ปลุกสีทองหนัก(STN)(100%)ได้ผลดังนี้

1. ถ้าให้สีทองหนัก(STN)มีลำดับเบสเป็น 100% พันธุ์ปลุกอื่นอีก 7 ทริทเมนต์จะมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับพันธุ์ปลุกสีทองหนัก = 98.18%, 93.82%, 98.18%, 97.83%, 97.45%, 97.63% และ 93.26% ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันเกิน 5%เพียง 2 พันธุ์ปลุกคือ พันธุ์ปลุกสีทองจุก(STJ)ซึ่งมีความแตกต่างกัน 6.18%กับสีทองที่ ได้รับรังสี 20 Kr ซึ่งมีความต่างกัน 6.74 % นอกนั้นต่างกันไม่เกิน 5 %

2. สีสทองเบา(STB)กับสีทองหนัก(STN)เป็นพันธุ์ปลุกเดียวกัน แต่เป็นคนละพันธุ์ปลุกกับสีทองจุก (STJ)โดยมีลำดับเบสยีนrbcL แตกต่างกัน1.82% และ6.38%ตามลำดับ ดังนั้นสีทองจุก(STJ)จึงเป็นคนละพันธุ์ปลุกกับสีทองหนัก(STN)และสีทองเบา(STB)

3. สีสทองที่ติดเชื้อรา(STM)มีลำดับเบสต่างจากสีทองปกติทั้ง 2 พันธุ์ปลุก คือสีทองหนัก (STN) กับ สีสทองเบา(STB)ไม่เกิน 5% คือต่างกันเพียง 1.82% และ 2.00% แต่แตกต่างจากสีทองจุก(STJ)เท่ากับ 6.92% (เชื้อรา มีผลต่อลำดับเบสของยีนRbcLในมะขามหวานพันธุ์ปลุกสีทองจุกเท่านั้น)

4. รังสีทั้ง 4 ระดับคือ 5,10,15 และ20Kr มีผลต่อสีทองจุก (STJ)เพียง 3 ระดับ คือความเข้ม 5-15Kr โดยก่อให้เกิดความแตกต่างของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์สูงกว่า 5 % ทั้งสิ้น โดยก่อให้เกิดความแตกต่างระหว่าง 6.38% - 6.92% ยกเว้นรังสี 20Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างในพันธุ์ปลุกสีทองจุก 4.37% ไม่เกิน5 % แต่ก็เป็นเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างสูงมาก นอกจากนี้ รังสีทั้ง 3 ระดับดังกล่าวไม่มีผลที่ก่อให้เกิดการกลายในสีทองหนัก(STN), สีสทองเบา(STB) และสีทองที่ติดเชื้อรา(STM) คือก่อให้เกิดความแตกต่างเพียง 2.17-2.55 % แต่สำหรับรังสี 20Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างในทั้ง 7 ทริทเมนต์ของพันธุ์ปลุกสีทอง โดยก่อให้เกิดความแตกต่างระหว่าง 4.37% ถึง 7.47%

นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสเป็นรายจุด(single nucleotide analysis)ที่ เกิดการแทนที่ของเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit โดยใช้พันธุ์ปลุกสีทองหนัก(STN)เป็นหลักในการเทียบจำนวน 549 bp ได้ผลดังนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 2 ตารางที่ ผ2.2)

1. พันธุ์ปลุกสีทองเบา(STB) เกิดการแทนที่ 10 จุด คิดเป็น 1.82%ของ549 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 2	C=Cytosine
2/ 30	A=Adenine

3/ 31	G=Guanine
4/ 32	A=Adenine
5/ 33	T=Thymine
6/ 509	C=Cytosine
7/ 521	G=Guanine
8/ 528	A=Adenine
9/ 541	T=Thymine
10/ 542	G=Guanine

2. พันธุ์ปลุกสีทองขึ้นรา(STM) เกิดการแทนที่ 10 จุด คิดเป็น 1.82%ของ 549 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 2	C=Cytosine
2/ 33	A=Adenine
3/ 509	C=Cytosine
4/ 521	A=Adenine
5/ 522	G=Guanine
6/ 525	C=Cytosine
7/ 526	T=Thymine
8/ 527	A=Adenine
9/ 529	C=Cytosine
10/ 542	G=Guanine

3. พันธุ์ปลุกสีทองจุก(STJ) เกิดการแทนที่ 35 จุด คิดเป็น 6.38 % ของ 549 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 2	C=Cytosine
2/ 26	A=Adenine
3/ 27	T=Thymine
4/ 28	T=Thymine
5/ 29	G=Guanine
6/ 34	A=Adenine
7/ 35	A=Adenine

8/ 36	T=Thymine
9/ 41	G=Guanine
10/ 43	T=Thymine
11/ 45	G=Guanine
12/ 51	C=Cytosine
13/ 52	G=Guanine
14/ 58	C=Cytosine
15/ 60	G=Guanine
16/ 68	C=Cytosine
17/ 481	T=Thymine
18/ 490	T=Thymine
19/ 496	T=Thymine
20/ 499	G=Guanine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
21/ 501	A=Adenine
22/ 502	A=Adenine
23/ 505	G=Guanine
24/ 506	C=Cytosine
25/ 514	T=Thymine
26/ 516	G=Guanine
27/ 518	T=Thymine
28/ 519	T=Thymine
30/ 521	G=Guanine
31/ 522	G=Guanine
32/ 524	G=Guanine
33/ 528	A=Adenine
34/ 541	T=Thymine
35/ 542	G=Guanine

4. พันธุ์ปลุกสีทองที่ได้รับรังสี 5 Kr.(ST5) เกิดการแทนที่ 13 จุด คิดเป็น 2.37%ของ 549 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
---------------------------------------	-------------------------

1/ 2	C=Cytosine
2/ 33	A=Adenine
3/ 520	T=Thymine
4/ 521	A=Adenine
5/ 523	T=Thymine
6/ 525	G=Guanine
7/ 526	A=Adenine
8/ 527	T=Thymine
9/ 528	A=Adenine
10/ 529	G=Guanine
11/ 530	C=Cytosine
12/ 541	T=Thymine
13/ 542	G=Guanine

5. พันธุ์ปลุกสีทองที่ได้รับรังสี 10 Kr.(ST10)เกิดการแทนที่ 14 จุด คิดเป็น 2.55 % ของ 549 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 2	C=Cytosine
2/ 27	T=Thymine
3/ 28	T=Thymine
4/ 29	C=Cytosine
5/ 31	G=Guanine
6/ 32	A=Adenine
7/ 38	C=Cytosine
8/ 525	C=Cytosine
9/ 526	C=Cytosine
10/ 527	G=Guanine
11/ 528	A=Adenine

12/ 533	A=Adenine
13/ 534	G=Guanine
14/ 541	T=Thymine

6. พันธุ์ปลุกสีทองที่ได้รับรังสี 15 Kr.(ST15)เกิดการแทนที่ 13 จุด คิดเป็น 2.37 % ของ 549 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 2	C=Cytosine
2/ 26	A=Adenine
3/ 27	T=Thymine
4/ 28	C=Cytosine
5/ 499	G=Guanine
6/ 518	G=Guanine
7/ 520	T=Thymine
8/ 525	G=Guanine
9/ 526	C=Cytosine
10/ 527	T=Thymine
11/ 529	C=Cytosine
12/ 534	G=Guanine
13/ 541	T=Thymine

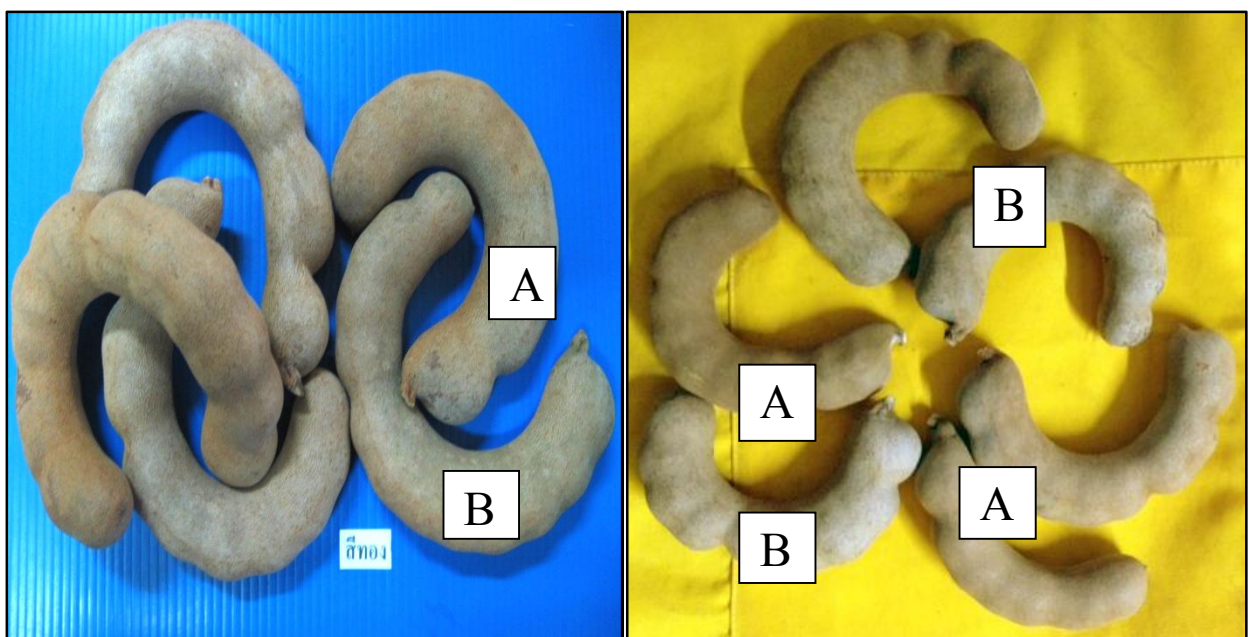
7. พันธุ์ปลุกสีทองที่ได้รับรังสี 20 Kr.(ST20)เกิดการแทนที่ 37 จุด คิดเป็น 6.74 % ของ 549 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 26	T=Thymine
2/ 27	T=Thymine
3/ 29	G=Guanine
4/ 30	A=Adenine
5/ 33	T=Thymine
6/ 34	G=Guanine

7/ 35	A=Adenine
8/ 36	T=Thymine
9/ 37	C=Cytosine
10/ 38	G=Guanine
11/ 39	T=Thymine
12/ 41	G=Guanine
13/ 43	G=Guanine
14/ 44	A=Adenine
15/ 45	C=Cytosine
16/ 46	T=Thymine
17/ 482	T=Thymine
18/ 485	G=Guanine
19/ 492	T=Thymine
20/ 496	T=Thymine
21/ 499	G=Guanine
22/ 502	A=Adenine
23/ 503	A=Adenine
24/ 505	G=Guanine
25/ 506	C=Cytosine
26/ 514	T=Thymine
27/ 516	G=Guanine
28/ 518	T=Thymine
29/ 519	T=Thymine
30/ 520	C=Cytosine
31/ 521	C=Cytosine
32/ 522	G=Guanine
33/ 524	G=Guanine
34/ 525	C=Cytosine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
35/ 528	A=Adenine
36/ 541	T=Thymine
37/ 542	G=Guanine



ภาพที่ 4.5 ฝักและเมล็ดของมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองเบา(STB)



ภาพที่ 4.6 ฝักมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทอง

A.สีทองหัวจุก(STJ) B.สีทองหนัก(STN)



ภาพที่ 4.7 เมล็ดและฝักมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองหัวจุกหรือสีทองจุก (STJ)



ภาพที่ 4.8 เมล็ดและฝักมะขามหวานพันธุ์ปลูกสีทองหนักขึ้นรา (STM)

กลุ่มศรีชมภู

สำหรับมะขามหวานกลุ่มศรีชมภู ใช้ชื่อย่อ SCP (SRICHOMPOO) ซึ่งชื่อนี้มาจากนามสกุลของอาจารย์ อดุม ศรีชมภู ผู้พัฒนาและเผยแพร่พันธุ์ปลูกนี้เป็นคนแรกของจังหวัดเพชรบูรณ์ จากการสังเกตของชาวสวนมะขามจังหวัดเพชรบูรณ์ในเวลาต่อมาที่พบว่ามะขามหวานพันธุ์ปลูกศรีชมภูมีรูปร่าง 2 แบบ คือ แบบฝักแบน มีลวดลายคล้ายทองปลิง เรียกว่าศรีชมภูทองปลิงหรือศรีชมภูปลิง(SCPP)(ภาพที่ 4.9)และแบบมีรูปร่างกลมยาว มีสีส้ม ลักษณะของสาแหรก การล่อนของเนื้อส่วนที่ติดกับเปลือกและรสชาติเหมือนศรีชมภูปลิงทุกประการ แต่มีรสอมเปรี้ยวมากกว่า และแยกต้นชัดเจนจากศรีชมภูปลิงเรียกว่า ศรีชมภูทองกลมหรือศรีชมภูกลม(SCPK)(ภาพที่ 4.10) ไม่มีหลักฐานปรากฏแน่ชัดว่า พันธุ์ปลูกใดเกิดก่อน ใครกลายพันธุ์มาจากใคร การเปรียบเทียบ DNA ของ 2 พันธุ์ปลูกนี้เพื่อดูว่า ทั้ง 2 พันธุ์ปลูกนี้มีลำดับเบสของยีน *rbcL* เหมือนกันหรือไม่ และเนื่องจากมะขามพันธุ์ปลูกนี้มีรสชาติหวานอมเปรี้ยว จึงไม่ค่อยพบฝักขึ้นราหรือต้นขึ้นรา นอกจากเกิดฝนตกผิดปกติในช่วงฝักสุก และจะติดเชื้อราเฉพาะฝักที่แตก หรือเชื้อราเข้าทางรอยตัดของข้อผล และจากการทดลองปลูกมะขามนับเป็นพันต้นพบว่า ฝักใดหรือผลใดที่ติดเชื้อราทั้งพันธุ์ปลูกศรีชมภูทองปลิงหรือศรีชมภูปลิง(SCPP)และศรีชมภูทองกลมหรือศรีชมภูกลม(SCPK) จะไม่สามารถงอกได้ และยังพบอีกว่า พันธุ์ปลูกศรีชมภูทั้ง 2 พันธุ์ปลูกงอกยาก ข้า อัตราการอยู่รอดต่ำกว่าพันธุ์ปลูกอื่น ๆ ในที่นี้จึงไม่นำพันธุ์ปลูกศรีชมภูที่ขึ้นรามาศึกษา และนำเฉพาะฝักศรีชมภูปลิงไปฉายรังสี 5-20 Kr เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป รวมทั้งสิ้น 6 ทริทเมนต์ ได้ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบส ดังนี้

1. พันธุ์ปลูกศรีชมภูกลม (SCPK)มีลำดับเบสในยีน *rbcL*ดังนี้

>SCPK_

```
GGGGCGGGGGGGGACTGATAGCTGCTGCATTAGCTGCTAGCGAGTCCTCGAATTAGCTGCTGCATT
AGCTGCTGCGAGTCCTCGAATTAGCTGCTGCATTAGCTGCTGCGAGTCCTCGAATTAGCTGCTGCA
TTAGCTGCTGCGAGTCCTCGAATTAGCTGCTGCATTAGCTGCTGCGAGTCCTCGAATTAGCTGCTG
CATTAGCTGCTGCAGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCATTAGCTGCTGCAAGTCCAGTATTAAGGTG
CAAGGATAAATCACTTTAAGTTTTGAAGATTTACTACCTGTTGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGC
CGCGGTATTTATTTCCACTTCAAGATTGGGTACTACTCTACCAGGGTGATTCTGCCCGTTGCTTCG
GGAGGTACTTCACGCTTTGGCATAGTGCCCGACTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACT
ACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGT
AGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGAATCTTGCTCGTGAGTGGTAATGAA
ATTATCCGTGAGGAACTAGAAATGGATCCTGAATTAGCTGCTGCAAA
```

2. พันธุ์ปลูกศรีชมภูปลิง (SCPP)มีลำดับเบสในยีน *rbcL*ดังนี้

>SCPP_

```
GGGTTTTTTTTTTTTTCCGTGGGGCAAGGAAAAGGGTAAAAAGAGCTGTATTTGCGAGAGAATTGG
GAGTTCCTATCGCCATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGCTCATT
```

ATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGGGCCCTGCATGCAGTTATCGATAGACAGA
AGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTC
ACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTAC
TACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTC
TACCGGGTGTTCGCCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGA
TCTTTGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCAC
CCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATC
TTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTTAACTGCTGCA
AGCTCCCCAA

3. พันธุ์ปลุกศรัสมภูได้รับรังสี 5Kr (SCP5)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>SCP5_

TGTTTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGGCGAAACGGATGATGCTGAGTTCGTATGC
GTGATGCATGACTACTTAACGGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGAT
AATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGT
ATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACT
GTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGAT
TTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTC
CTGCCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGAT
GATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTA
GCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAG
GGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCATTA

4. พันธุ์ปลุกศรัสมภูได้รับรังสี 10Kr (SCP10)มีลำดับเบสในยีน rbcLดังนี้

>SCP10_

TTTTTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGGGGGGACGATGCTGCTGATTAGCTGCTGC
GGTCCAGAACTTTCTGCGGCATTTCTGGTGCATGCCCTGTTGGCTCAGTAGTGTGCGGATAATGG
TCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCA
TTTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGT
AGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTAT
TGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCGCCC
CGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTC
CGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAA
TCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAA
TGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCATT

5. พันธุ์ปลุกศรีชมภูได้รับรังสี 15Kr (SCP15)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>SCP15_

TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGGGGCGGGACGGATAGCTGCTGCGTTAGCTGCT
GCTGCTTCTGTACTTCTGCGGCATATTCTGGTGCAAATGCTCTGTTGGCTCATTATTGTCGGGATA
ATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTA
TGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTG
TAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTACTACGTGATGATT
TTATTGAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTT
TGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATG
ATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAG
CTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGG
GTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCATTGCCA

6. พันธุ์ปลุกศรีชมภูได้รับรังสี 20Kr (SCP20)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>SCP20_

TCATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGGGCGATGCGAGGATTGGGAGTTCCTATCGTA
ATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAAT
GGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATG
CATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTA
GTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTACTACGTGATGATTTT
ATTGAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTG
CCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGAT
TCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCT
AATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGT
AATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATA

เมื่อนำลำดับเบสของยีน rbcL จากมะขามพันธุ์ปลุกศรีชมภูทั้ง 6 ทริทเมนต์ เปรียบเทียบหา
เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) โดยใช้พันธุ์ปลุกศรีชมภูท้องถิ่นหรือศรีชมภูกลม(SCPK)เป็นหลักในการ
เปรียบเทียบ(100%)จำนวน 347 bp ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity)ของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามหวาน
พันธุ์ปลุกศรีชมภู จำนวน 6 ทริทเมนต์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 3 ตารางที่ ผ3.1)

Seq->	SCPK	SCPP	SCP5	SCP10	SCP15	SCP20
SCPK	100.00					

SCPP	84.73	100.00				
SCP5	84.15	99.14	100.00			
SCP10	82.71	96.83	97.012	100.00		
SCP15	55.91	53.60	53.89	53.31	100.00	
SCP20	85.88	98.85	98.27	96.83	53.31	100.00

หมายเหตุ SCPK = Srichompooklom, ศรีชมภูท้องถิ่น/ศรีชมภูกลม
 SCPP = Srichompoopling, ศรีชมภูท้องถิ่น/ศรีชมภูปลิง
 SCP5 = Treated with 5 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแตรด)
 SCP10 = Treated with 10 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแตรด)
 SCP15 = Treated with 15 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแตรด)
 SCP20 = Treated with 20 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 20 Kr (กิโลแตรด)
 Seq-> = Sequence bases in rbcL of Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม



ภาพที่ 4.9 ฝักมะขามพันธุ์ปลุกศรีชมภูท้องถิ่นหรือศรีชมภูปลิง(SCPP)



ภาพที่ 4.10 ฝักมะขามพันธุ์ปลิงศรีชมภูท้องปลิงเปรียบเทียบกับศรีชมภูท้องกลม

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามพันธุ์ปลิงศรีชมภูทั้ง 6 ทริทเมนต์ในตารางที่ 4.4 ได้ผลดังนี้

1. พันธุ์ปลิงศรีชมภูทั้ง 2 พันธุ์ปลิง คือ ศรีชมภูท้องปลิง (SCPP) กับ ศรีชมภูท้องกลม (SCPK) ในตารางที่ 4.4 พบว่า ลำดับเบสมีความเหมือนกัน 84.73% แตกต่างกัน 15.27% ซึ่งถือว่าเป็นคนละพันธุ์ปลิงกัน เนื่องจากแตกต่างกันเกิน 5 %

2. รังสีทั้ง 4 ระดับคือ 5, 10, 15 และ 20 Kr มีผลทำให้ลำดับเบสของยีนในมะขามพันธุ์ปลิงศรีชมภูท้องปลิง มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน 99.14% , 96.83% , 53.60% และ 98.85% ซึ่งแตกต่างกัน 0.86%, 3.17%, 46.40% และ 1.15% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า รังสีเข้ม 15 Kr เพียง ทริทเมนต์เดียวที่ก่อให้เกิดการกลายในพันธุ์ปลิงศรีชมภูปลิง 15 (SCP15) เกิดความแตกต่างสูงสุดถึง 46.40% สำหรับพันธุ์ปลิงศรีชมภูท้องกลมมิได้นำไปฉายรังสีเนื่องจากในตอนแรกคิดว่าพันธุ์ปลิงศรีชมภูทั้ง 2 พันธุ์ปลิงเป็นพันธุ์ปลิงชนิดเดียวกัน

นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสเป็นรายจุด (single nucleotide analysis) ที่เกิดการแทนที่ของเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit โดยใช้พันธุ์ปลิงศรีชมภูกลม (SCPK) เป็นหลักในการเทียบจำนวน 347 bp ได้ผลดังนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 3 ตารางที่ ผ 3.2)

1. ศรีชมภูท้องปลิง (SCPP) เกิดการแทนที่ของเบส 55 จุด คิดเป็น 15.85% ของ 347 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 2	G=Guanine

2/ 4	A=Adenine
3/ 5	T=Thymine
4/ 6	C=Cytosine
5/ 7	A=Adenine
6/ 8	T=Thymine
7/ 9	G=Guanine
8/ 15	A=Adenine
9/ 16	T=Thymine
10/ 17	T=Thymine
11/ 19	T=Thymine
12/ 22	T=Thymine
13/ 25	A=Adenine
14/ 28	A=Adenine
15/ 29	G=Guanine
16/ 30	C=Cytosine
17/ 32	A=Adenine
18/ 34	A=Adenine
19/ 35	G=Guanine
20/ 36	C=Cytosine
21/ 38	T=Thymine
22/ 40	A=Adenine
23/ 42	G=Guanine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
24/ 45	T=Thymine
25/ 50	G=Guanine
26/ 51	G=Guanine
27/ 52	A=Adenine
28/ 55	A=Adenine
29/ 58	T=Thymine
30/ 60	C=Cytosine
31/ 63	G=Guanine
32/ 65	A=Adenine
33/ 69	T=Thymine
34/ 71	G=Guanine
35/ 75	G=Guanine
36/ 77	A=Adenine
37/ 78	T=Thymine
38/ 79	G=Guanine
39/ 81	A=Adenine
40/ 84	G=Guanine
41/ 85	G=Guanine
42/ 86	G=Guanine
43/ 88	A=Adenine
44/ 91	A=Adenine
45/ 93	A=Adenine
46/ 94	A=Adenine
47/ 100	G=Guanine
48/ 107	T=Thymine
49/ 108	T=Thymine
50/ 119	G=Guanine
51/ 122	A=Adenine
52/ 338	C=Cytosine
53/ 345	A=Adenine
54/ 346	G=Guanine

55/ 347	G=Guanine
---------	-----------

เนื่องจากมีได้นำพันธุ์ปลุกศรีชมภูกลม(SCPK)ไปทำการฉายรังสี จึงทำการหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) โดยใช้พันธุ์ปลุกศรีชมภูทองปลิง(SCPP)เป็นหลักในการเปรียบเทียบ(100%)จำนวน 347 bp ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก3.1 ตารางที่ ผ3.1.1)

ตารางที่ 4.4.1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity)ของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามหวาน พันธุ์ปลุกศรีชมภู จำนวน 5 ทรีทเมนต์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 3 ตารางที่ ผ3.1.1)

Seq->	SCPP	SCP5	SCP10	SCP15	SCP20
SCPP	100.00				
SCP5	99.14	100.00			
SCP10	96.83	97.12	100.00		
SCP15	53.60	53.89	53.31	100.00	
SCP20	98.85	98.27	96.83	53.31	100.00

หมายเหตุ SCPP = Srichompoopling, ศรีชมภูทองปลิง/ศรีชมภูปลิง
 SCP5 = Treated with 5 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแรด)
 SCP10 = Treated with 10 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแรด)
 SCP15 = Treated with 15 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแรด)
 SCP20 = Treated with 20 Kr Srichompoopling, ศรีชมภูปลิงได้รับรังสี 20 Kr (กิโลแรด)
 Seq-> = Sequence bases in rbcLof Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม

นอกจากนี้ยังนำพันธุ์ปลุกศรีชมภูทองปลิงที่ได้รับรังสี 5,10,15และ 20 Kr(SCP5, SCP10, SCP15และ SCP20) ไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบเป็นรายจุด(single nucleotide analysis)ที่เกิดการแทนที่ของเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit โดยใช้พันธุ์ปลุกศรีชมภูปลิง(SCPP)เป็นหลักในการเทียบจำนวน 347 bp ได้ผลดังนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก3.1 ตารางที่ ผ3.1.2)

1. พันธุ์ปลุกศรีชมภูที่ได้รับรังสี 5 Kr เกิดการแทนที่ด้วยเบส 5 จุด จาก 347 bp คิดเป็น 1.44% ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 338	A=Adenine
2/ 339	G=Guanine
3/ 340	T=Thymine
4/343	A=Adenine

5/ 345	G=Guanine
--------	-----------

2. พันธุ์ปลุกศรีชมภูที่ได้รับรังสี 10 Kr เกิดการแทนที่ด้วยเบส 13 จุด จาก 347 bp คิดเป็น 3.75% ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 290	G=Guanine
2/ 293	C=Cytosine
3/ 315	G=Guanine
4/ 318	G=Guanine
5/ 320	T=Thymine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
6/ 321	C=Cytosine
7/ 338	A=Adenine
8/ 339	G=Guanine
9/ 340	T=Thymine
10/ 343	A=Adenine
11/ 344	A=Adenine
12/ 345	T=Thymine
13/ 346	A=Adenine

3. พันธุ์ปลุกศรีชมภูที่ได้รับรังสี 15 Kr เกิดการแทนที่ด้วยเบส 180 จุด จาก 347 bp คิดเป็น 51.87% ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 1	T=Thymine
2/ 4	G=Guanine
3/ 5	G=Guanine
4/ 7	G=Guanine
5/ 8	A=Adenine
6/ 15	G=Guanine
7/ 16	C=Cytosine
8/ 18	A=Adenine
9/ 19	G=Guanine
10/ 22	C=Cytosine
11/ 24	C=Cytosine
12/ 25	T=Thymine
13/ 26	T=Thymine
14/ 28	G=Guanine
15/ 29	A=Adenine
16/ 32	C=Cytosine
17/ 33	G=Guanine
18/ 34	C=Cytosine
19/ 37	A=Adenine

20/ 40	G=Guanine
21/ 41	T=Thymine
22/ 43	C=Cytosine
23/ 44	A=Adenine
24/ 45	G=Guanine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
25/ 46	C=Cytosine
26/ 52	C=Cytosine
27/ 56	A=Adenine
28/ 57	G=Guanine
29/ 58	G=Guanine
30/ 59	A=Adenine
31/ 60	T=Thymine
32/ 62	C=Cytosine
33/ 63	A=Adenine
34/ 65	T=Thymine
35/ 68	C=Cytosine
36/ 69	C=Cytosine
37/ 71	C=Cytosine
38/ 72	C=Cytosine
39/ 74	T=Thymine
40/ 76	A=Adenine
41/ 77	G=Guanine
42/ 79	C=Cytosine
43/ 82	T=Thymine
44/ 83	C=Cytosine
45/ 84	A=Adenine
46/ 85	T=Thymine
47/ 86	C=Cytosine
48/ 92	T=Thymine
49/ 93	C=Cytosine
50/ 94	T=Thymine
51/ 95	G=Guanine
52/ 99	G=Guanine
53/ 101	A=Adenine
54/ 103	A=Adenine
55/ 104	G=Guanine

56/105	C=Cytosine
57/106	A=Adenine
58/107	A=Adenine
59/108	A=Adenine
60/110	G=Guanine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
61/ 112	A=Adenine
62/ 113	C=Cytosine
63/ 114	T=Thymine
64/ 116	G=Guanine
65/11 7	G=Guanine
66/ 118	A=Adenine
67/ 120	C=Cytosine
68/ 121	A=Adenine
69/ 123	C=Cytosine
70/ 124	A=Adenine
71/ 125	C=Cytosine
72/ 126	C=Cytosine
73/ 127	G=Guanine
74/ 128	G=Guanine
75/ 131	G=Guanine
76/ 132	A=Adenine
77/ 137	G=Guanine
78/ 140	G=Guanine
79/ 141	A=Adenine
80/ 142	A=Adenine
81/ 143	A=Adenine
82/ 146	A=Adenine
83/ 149	T=Thymine
84/ 150	T=Thymine
85/152	T=Thymine

86/154	T=Thymine
87/159	C=Cytosine
88/161	A=Adenine
89/ 162	G=Guanine
90/ 163	T=Thymine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
91/ 164	A=Adenine
92/ 166	A=Adenine
93/ 169	A=Adenine
94/ 171	C=Cytosine
95/ 172	A=Adenine
96/ 173	A=Adenine
97/ 177	T=Thymine
98/ 179	T=Thymine
99/ 181	T=Thymine
100/ 182	C=Cytosine
101/ 183	C=Cytosine
102/ 184	T=Thymine
103/ 186	A=Adenine
104/ 188	T=Thymine
105/ 190	T=Thymine
106/ 191	C=Cytosine
107/ 195	A=Adenine
108/ 198	T=Thymine
109/ 205	C=Cytosine
110/ 208	A=Adenine
111/ 210	T=Thymine
112/ 211	A=Adenine
113/ 212	A=Adenine
114/ 213	C=Cytosine
115/ 214	G=Guanine
116/217	T=Thymine
117/218	G=Guanine
118/220	T=Thymine
119/221	A=Adenine
120/223	C=Cytosine
121/ 224	C=Cytosine

122/ 226	T=Thymine
123/ 227	G=Guanine
124/ 228	C=Cytosine
125/ 232	A=Adenine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
126/ 233	T=Thymine
127/ 234	T=Thymine
128/ 235	T=Thymine
129/ 237	G=Guanine
130/ 238	T=Thymine
131/ 239	C=Cytosine
132/ 240	T=Thymine
133/ 243	A=Adenine
134/ 244	T=Thymine
135/ 245	T=Thymine
136/ 248	G=Guanine
137/ 261	G=Guanine
138/ 263	G=Guanine
139/ 264	G=Guanine
140/ 265	A=Adenine
141/ 266	G=Guanine
142/ 267	T=Thymine
143/ 268	A=Adenine
144/ 269	C=Cytosine
145/ 271	T=Thymine
146/ 273	C=Cytosine
147/ 274	C=Cytosine
148/ 275	A=Adenine
149/ 276	A=Adenine
150/ 277	A=Adenine
151/ 278	A=Adenine
152/ 282	A=Adenine
153/ 285	C=Cytosine
154/ 286	T=Thymine
155/ 287	G=Guanine
156/ 289	A=Adenine

157/ 294	T=Thymine
158/ 295	G=Guanine
159/ 299	A=Adenine
160/ 302	T=Thymine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
161/ 304	T=Thymine
162/ 305	G=Guanine
163/ 306	A=Adenine
164/ 307	T=Thymine
165/ 308	T=Thymine
166/ 312	A=Adenine
167/ 315	T=Thymine
168/ 316	A=Adenine
169/ 318	T=Thymine
170/ 321	C=Cytosine
171/ 323	A=Adenine
172/ 331	T=Thymine
173/ 333	T=Thymine
174/ 336	T=Thymine
175/ 339	T=Thymine
176/ 340	T=Thymine
177/ 342	C=Cytosine
178/ 344	A=Adenine
179/ 345	T=Thymine
180/ 347	A=Adenine

4. พันธุ์ปลุกศรีชมภูที่ได้รับรังสี 20 Kr เกิดการแทนที่ด้วยเบส 4 จุด จาก 347 bp คิดเป็น 1.15% ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 338	A=Adenine
2/ 345	T=Thymine
3/ 346	A=Adenine
4/ 347	A=Adenine

กลุ่มขันธ์

มะขามหวานพันธุ์ปลุกขันธ์ ใช้อักษรย่อ KT (Khunttee) เกษตรกรพื้นบ้านชาวจังหวัดเพชรบูรณ์

แบ่งมะขามกลุ่มนี้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ชันตีหยวก(KTY)(ภาพที่4.11) และชันตีสร้อย(KTS) (ภาพที่ 4.12) ซึ่งมีลักษณะของฝักเหมือนกัน สีส้น และรสชาติของเนื้อฝักคล้ายกันจนแยกไม่ออก เพียงแต่ขนาดต่างกัน และความดกในการติดฝักต่างกัน คือ ชันตีหยวกจะมีขนาดใหญ่กว่า และการติดฝักไม่ดกเท่าชันตีสร้อย ชันตีสร้อยจะติดฝักเป็นพวงตามลักษณะช่อดอกไม่เป็นฝักเดี่ยว ๆ เหมือนชันตีหยวก การมีขนาดใหญ่เล็กหรือการติดฝักดกหรือไม่ น่าจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม คือการแสดงออกของยีนผันแปรไปตามสิ่งแวดล้อม ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับตัวยีนหรือสารพันธุกรรม อย่างไรก็ตามจึงศึกษาดู DNA ของยีน rbcL ของชันตีทั้งสองกลุ่มเปรียบเทียบกัน นอกจากนี้ยังศึกษา DNA ชันตีหยวกต้นที่ขึ้นรา(KTYM) และชันตีสร้อยที่ขึ้นรา (KTSM) พร้อมทั้งศึกษา DNA ของพันธุ์ปลูกชันตีที่นำไปฉายรังสี 5-20 Kr เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปด้วย โดยได้นำ DNA ของมะขามพันธุ์ปลูกชันตีไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส รวมทั้งสิ้น 8 ทรินาเมนต์ ได้ผลดังนี้

1. พันธุ์ปลูกชันตีหยวก(KTY)มีลำดับเบสในยีน rbcLดังนี้

>KTY_

```
TCATGGGAAAGAATGATAAAAAGAGCTGGGAATTGGCCAGAGAATGGGAGGTTCTATCGTTATGC
ATGACTACTTAACAGGGGGATTACCCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTC
TACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATT
TTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAG
GTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTG
AAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCG
TTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCG
TACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATC
GAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATG
AAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCAAAA
```

2. ชันตีหยวกขึ้นรา (KTYM)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>KTYM_

```
TTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGGGGTATTTGCGAGAGAATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCA
TGACTACTTAACAGGGGGATTACCCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCT
ACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTT
TCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGG
TAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGA
AAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCGT
TGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGT
ACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCG
AGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGA
AATATATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATAGCTGCTGCAAAA
```

3. ชั้นดีสรี้อย(KTS)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>KTS_

TTTCCATGGGGAAGAAAAAGTAAAAAGAGCTGTATCTGCGAGAGAATTGGGAGTTCTATCCTGATG
GATGTCAACTCCACCGGGGATTCTCGGCCAATACTAGCTTGGCTCACTATTGTAGGGATGGTGGT
CTACTTCTTCCCCTTGGGGTGGCCCTGACTGCCTCCATCGATTGATAGTACAATATTGGCTTGCATT
TTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAG
GTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTG
AAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCG
TTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCG
TACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATC
GAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGTATCTTGCTCGTGAGGGGTA
ATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCGAAATTTAAACCTGCTGCAA

4. ชั้นดีสรี้อยขึ้นรา(KTSM)มีลำดับเบสในยีน rbcLดังนี้

>KTSM_

TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGGGGGAATTGCGAGAGGATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCA
TGACTIONTAAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCT
ACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTT
TCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGG
TAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGA
AAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCGT
TGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGT
ACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCG
AGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGA
AATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCAAAA

5. ชั้นดีได้รับรังสี 5 Kr (KT5)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>KT5_

TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGGATTAATTGCGATAGAATGCGGAGTTCCTATCGTAATGCA
TGACTIONTAAACAGGGGAGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTC
TACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATT
TTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAG
GTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTG
AAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCG
TTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCG

TACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATC
GAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGAGGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATG
AAATTATCCGTGGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCA

6. ลำดับที่ 10 Kr (KT10) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>KT10_

TCATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGGGGGAACGGCGAAAGAATTGCTGCGTTCGTATGCGTGAT
GCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGG
TCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCA
TTTTCGTGTAAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGT
AGGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTAT
TGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCC
CGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTC
CGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAA
TCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGAGCGTGATCTTGCTCGTGAGGGTA
ATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAAT
GGAGTCCTGAATTACCTGCTGCATT

7. ลำดับที่ 15 Kr (KT15) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>KT15_

TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGTGGGGGATTTGCGAGAGAATTGGGAGTTCTATCGAAT
GCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGA
TAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAA
TCATGGTATGCATTTTCGTGTAAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATAT
TCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGT
TGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCA
AGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCA
TATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAAC
TTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGC
ATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCG
TGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCAAA

8. ลำดับที่ 20 Kr (KT20) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>KT20_

AGTCCTGAATTAGCTGCTGCAAATCTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGC
 GAGAGAATTGGGAGTTCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAA
 TACTAGCTTGGCTCATTATTGTCTGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAAT
 GCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGC
 GTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGG
 GGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGA
 TCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCGT
 TGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGA
 TTCCGTACTIONACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGC
 CGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCT
 TGCTCGTGAGGGTATGAAAATATACCGGAGGGTGCAAGAGGGG

เมื่อนำลำดับเบสของยีน rbcL จากมะขามพันธุ์ปลุกชั้นดีทั้ง 8 ทรีทเมนต์ เปรียบเทียบหา
 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) โดยใช้พันธุ์ปลุกชั้นดีห้วยวก(KTY)เป็นหลักในการเปรียบเทียบ(100%)
 จำนวน 490 bp ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(Identity)ของลำดับเบสในยีนrbcLของมะขามหวานพันธุ์
 ปลุกชั้นดี จำนวน 8 ทรีทเมนต์ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 4 ตารางที่ ผ4.1)

หมายเหตุ KTY = Khunteeyouk, ขันตีหยวก, KTS = Khunteesoy, ขันตีสร้อย
 KTYM = Fungal Khunteeyouk, ขันตีหยวกขึ้นรา

Seq->	KTY	KTYM	KTS	KTSM	KTY5	KTY10	KTY15	KTY20
KTY	100.00							
KTYM	99.39	100.00						
KTS	89.80	90.00	100.00					
KTSM	99.59	99.80	89.80	100.00				
KTY5	98.98	99.39	90.20	99.39	100.00			
KTY10	99.39	99.59	90.20	99.39	99.39	100.00		
KTY15	99.59	99.39	89.59	99.59	98.78	98.78	100.00	
KTY20	99.80	99.59	89.80	99.39	98.98	99.39	99.39	100.00

KTSM = Fungal Khunteesoy, ขันตีสร้อยขึ้นรา

KTY5 = Treated with 5 Kr Khunteeyouk, ขันตีหยวกได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแรด)

KTY10 = Treated with 10 Kr Khunteeyouk, ขันตีหยวกได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแรด)

KTY15 = Treated with 15 Kr Khunteeyouk, ขันตีหยวกได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแรด)

KTY20 = Treated with 20 Kr Khunteeyouk, ขันตีหยวกได้รับรังสี 20 Kr (กิโลแรด)

Seq-> = Sequence bases in rbcL of Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม



ภาพที่ 4.11 เมล็ดและฝักของมะขามหวานพันธุ์ปลูกขันตีหยวก(KTY)



ภาพที่ 4.12 เมล็ดและฝักของมะขามหวานพันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อย(KTS)

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามพันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อยทั้ง 8 ทริทเมนต์ในตารางที่ 4.5 ได้ผลดังนี้

1.พันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อย(KTY)มีลำดับเบสเหมือนกับขันตีสร้อย(KTS) 89.80% ต่างกัน10.20% ถือว่าเป็นคนละพันธุ์ปลูกลง

2.พันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อย(KTY)มีลำดับเบสเหมือนกับขันตีสร้อยที่ขึ้นรา(KTYM) 99.39% ต่างกัน0.61% ถือว่าเชื้อราไม่มีผลต่อขันตีสร้อย(KTY) แต่สำหรับขันตีสร้อย(KTS)มีลำดับเบสเหมือนกับขันตีสร้อยที่ขึ้นรา(KTSM) 89.80% ต่างกัน 10.20 % ถือว่าเชื้อราไม่มีผลต่อขันตีสร้อย(KTS)

3. รังสีทั้ง 5 ระดับ คือ 5,10,15และ 20Kr มีผลทำให้ลำดับเบสของยีนในมะขามพันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อย (KTY) แตกต่างกัน 1.02%,0.61%,0.41%และ0.20% ตามลำดับ แสดงว่า รังสี 5-20 Kr ไม่มีผลต่อการกลายของพันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อย แต่สำหรับผลของรังสีทั้ง 5 ระดับต่อพันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อย(KTS) จะก่อให้เกิดความแตกต่าง 9.80%,9.80%,10.41และ10.20% ตามลำดับ ถือว่ารังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายในมะขามขันตีสร้อย โดยที่ความเข้มของรังสี 15 Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 10.41 %

4. รังสีทั้ง 5 ระดับ คือ 5,10,15และ 20Kr มีผลทำให้ลำดับเบสของยีนในมะขามพันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อยที่ขึ้นรา(KTYM) แตกต่างกัน 0.61%,0.41%,0.61%และ0.41% ตามลำดับ แสดงว่ารังสีทั้ง 5 ระดับไม่มีผลต่อการกลายในมะขามขันตีสร้อยที่ขึ้นรา สำหรับผลของรังสีทั้ง 5 ระดับต่อพันธุ์ปลูกลงขันตีสร้อยที่ขึ้นรา(KTSM) ก่อให้เกิดความแตกต่าง 0.61%,0.61%,0.41%และ0.61% ตามลำดับ ถือว่ารังสีทุกระดับไม่มีผลต่อขันตีสร้อยที่ขึ้นราเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสเป็นรายจุด(single nucleotide analysis)ที่เกิดการแทนที่ของเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit โดยใช้พันธุ์ปลุกชั้นดีหยวก(STY)เป็นหลักในการเทียบจำนวน 490 bp ได้ผลดังนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 4 ตารางที่ ผ 4.2)

1. ชั้นดีหยวกชั้นรา(KTYM) เกิดการแทนที่ของเบส 3 จุดคิดเป็น0.61% จาก 490 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 29	G=Guanine
2/ 30	A=Adenine
3/ 36	T=Thymine

- 2.ชั้นดีสร้อยชั้นรา(KTSM) เกิดการแทนที่ของเบส 4 จุดคิดเป็น0.82% จาก 490 bp เมื่อเทียบกับชั้นดีหยวกปกติ ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 29	G=Guanine
2/ 30	A=Adenine
3/ 32	G=Guanine
4/ 36	T=Thymine

- 3.ชั้นดีสร้อย(KTS) เกิดการแทนที่ของเบส 53 จุดคิดเป็น 10.82% จาก 490 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 1	C=Cytosine
2/ 8	C=Cytosine
3/ 13	A=Adenine
4/ 14	A=Adenine
5/ 15	G=Guanine
6/ 25	C=Cytosine
7/ 26	G=Guanine
8/ 28	A=Adenine
9/ 29	G=Guanine

10/ 30	A=Adenine
11/ 36	T=Thymine
12/ 39	T=Thymine
13/ 40	C=Cytosine
14/ 41	G=Guanine
15/ 55	C=Cytosine
16/ 83	T=Thymine
17/ 84	A=Adenine
18/ 85	T=Thymine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
19/ 89	G=Guanine
20/ 113	C=Cytosine
21/ 119	T=Thymine
22/ 120	G=Guanine
23/ 130	G=Guanine
24/ 139	T=Thymine
25/ 141	G=Guanine
26/ 430	C=Cytosine
27/ 437	C=Cytosine
28/ 438	C=Cytosine
29/ 446	G=Guanine
30/ 447	A=Adenine
31/ 449	G=Guanine
32/ 453	A=Adenine
33/ 455	A=Adenine
34/ 458	C=Cytosine
35/ 460	A=Adenine
36/ 463	A=Adenine
37/ 464	T=Thymine
38/ 466	G=Guanine
39/ 467	C=Cytosine
40/ 468	A=Adenine
41/ 473	G=Guanine
42/ 476	T=Thymine
43/ 477	G=Guanine
44/ 478	G=Guanine
45/ 480	G=Guanine
46/ 481	T=Thymine
47/ 482	G=Guanine
48/ 483	A=Adenine
49/ 485	C=Cytosine

50/ 486	C=Cytosine
51/ 487	T=Thymine
52/ 488	T=Thymine
53/ 490	G=Guanine

4.ชั้นดีที่ได้รับรังสี 5 Kr (KT5) เกิดการแทนที่ของเบส 6 จุดคิดเป็น 1.22 % จาก 490 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 23	G=Guanine
2/ 24	C=Cytosine
3/ 25	T=Thymine
4/ 28	G=Guanine
5/ 30	A=Adenine
6/ 36	T=Thymine

5.ชั้นดีที่ได้รับรังสี 10 Kr (KT10) เกิดการแทนที่ของเบส 3 จุดคิดเป็น 0.61 % จาก 490 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 28	G=Guanine
2/ 30	A=Adenine
3/ 36	T=Thymine

6.ชั้นดีที่ได้รับรังสี 15 Kr (KT15) เกิดการแทนที่ของเบส 4 จุดคิดเป็น 0.78 % จาก 490 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 23	G=Guanine
2/ 25	A=Adenine
3/ 26	T=Thymine
4/ 28	G=Guanine

7.ชั้นดีที่ได้รับรังสี 20 Kr (KT20) เกิดการแทนที่ของเบส 3 จุดคิดเป็น 0.61 % จาก 490 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 29	G=Guanine
2/ 31	A=Adenine
3/ 32	G=Guanine

กลุ่มเปรี้ยวพื้นเมือง



ภาพที่ 4.13 มะขามพันธุ์ปลุกเปรี้ยวพื้นเมือง (PPM)

มะขามเปรี้ยวพันธุ์พื้นเมือง ใช้ตัวย่อ PPM (Preao-puen-muang) มะขามชนิดนี้มีรสเปรี้ยวจัด เนื่องจากมีกรดทาทารริกสูงมาก(ภาพที่ 12) ไม่พบฝักและต้นที่ขึ้นรา แม้จะมีฝนตกผิดฤดู แต่ถ้าหลังฝนตกแล้ว มีแสงแดด มะขามเปรี้ยวจะไม่ติดเชื้อรา แต่อาจพบบางฝักที่มีรอยแตก หรือมีมอดและหนอนเจริญอยู่ภายใน เมล็ด ก็พบเชื้อราบ้าง แต่ไม่มาก การทดลองในที่นี้ได้นำมะขามเปรี้ยวพันธุ์เมืองที่ขึ้นราไปตรวจ DNA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ขึ้นราด้วยเพื่อดูว่าเชื้อรามีผลต่อลำดับเบสในยีน rbcL หรือไม่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษา DNA

ของพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่นำไปฉายรังสี 5-20 Kr เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยได้นำ DNA ของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส รวมทั้งสิ้น 6 ทรินเมนต์ ได้ผลดังนี้

1. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง(PPM)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PPM_

```
GGCGTTTGGGGGGGTAGGAGGCGTTCTATCCCCAGGCAGGTCTACTTCCCAGGTGGGAGCTTGTC
ACCGCAATACTAGCTTGGCTCACTCGTGTCTGGGATGGTGCCGTCTACTTCTTCCCCCGGGTGGC
CCTGAGTGCCTCCACCCAATAGTCGGTCTGAATGGTCTGCATTGATCCCGGTACTAACTGGCATAG
GCGTTACGTTTGTACCTGGTGGAGCATCGGGCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAACTGGA
AGGGGAAAGAGAAATCACTGCTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGAT
CGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTTCAAGATTGGGTACTACTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTGC
TTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATGCTTTGGATGATGATTCCGTA
CTACAATTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGA
GTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGAATCTTGCTCGTGAGGAGTAATG
AAATTATCCGTGAGGAACTAGCAAATGGAGTCCTGAATTTACCGCTGCTGCAACATTTTCCTTCCC
ATGGAGAGAA
```

2. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองขึ้นรา(PPMM)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PPMM_

```
TCATGGGAAAGAAATGATAAAAAGAGGGGGGTTTTCGAGAGTGGGGAGTTTTATCGTAATGCATG
ACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCTGGGATAATGGTCTAC
TTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTC
GTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTA
AACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAA
AAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTG
CTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTAC
TACAATTTGGTGGAGGAACCTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAG
```

TAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAA
TTATTCGTGAGGCAAGCAAATGGAGTCCTGAATTGCCTGCTGCAAAAA

3. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 5 Kr (PPM5) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PPM5_

TTCTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGCGAGGGGAATGGGATGATGCTGCGTTACT
ATGCGGAATGCATGACTACTTAACGGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCG
GGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCA
TGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGG
TACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGA
TGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGG
TGTTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGG
AGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGC
CGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTGC
GTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGGCTGCTGCC

4. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 10 Kr (PPM10) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PPM10_

TTCAGGGGAAAGGGATGATAAAAAGGAGCTGTATTTGCGAGAGAATTGGGAGTTCCTATGCGTAAT
GCATGACTACTATAACAGGGGAGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAAT
GGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATG
CATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTA
GTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTT
ATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTG
CCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGAT
TCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCT
AATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGAGT
CATGAAGTTAGCGCTGAGGATTGCAAATGGAGTCCT

5. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 15 Kr (PPM15) มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PPM15_

TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATGGGCGACGATAGCTGCTGCATTAGCTGCTGCGAGT
CCTGACTACTTAGCTGCGGCATAAGCTGCTGCATGTCCTAGCTAGTCTCATGCTGTGTCGGGATAA
TGGTCTACTTCTTCACCTCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTAT
GCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGT
AGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTT

TATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTC
 GCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGA
 TTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGC
 TAATGCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGG
 GTAATGAAATTATCCGTGAGGCATTAGCAAATGCGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCA

6. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 20 Kr (PPM20)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PPM20_

AATACAGCTCTTTTTATCATTCTTCCCATGGGGGGTTGCCcGAGATTGGGAGTTCTATCGTATGCA
 TGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGTTCATTATTGTCGGGATAATGGTCT
 ATCTTCTTCACACCGTCCATCGTGCAATGCATGTGTCACAGTTATCGATAGACAGAAAGAATCATG
 GTATGCATTTTCGTGTAGCTAGCTAACAGCGTTACGTTTGTCTGAAGTGGAGATCATATTCACGCT
 GGTACTGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGACAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACG
 TGATTGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATATTTACATCAAGAGATTGGGTCTC
 TTTCTACCGGGTGTCTGCACCCGTTGCTTCGGGAGAATGGTATTCACGTTTGGCATATGCCTCG
 CTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGTATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGAGAACTTTGGGACACCC
 TTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAA
 TGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGA
 ATTGCCTGCTGCAAA

เมื่อนำลำดับเบสของยีน rbcLจากมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง 6 ทริทเมนต์ เปรียบเทียบหา
 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) โดยใช้พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง (PPM)เป็นหลักในการเปรียบเทียบ
 (100%)จำนวน 492 bp ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity)ของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามพันธุ์ปลูก
 เปรี้ยวพื้นเมืองจำนวน 6 ทริทเมนต์(ดูรายละเอียดในภาคผนวก 5 ตารางที่ ผ5.1)

Seq->	PPM	PPMM	PPM5	PPM10	PPM15	PPM20
PPM	100.00					
PPMM	97.15	100.00				
PPM5	97.97	95.53	100.00			
PPM10	96.95	98.37	95.93	100.00		
PPM15	83.13	85.57	83.13	84.96	100.00	
PPM20	96.75	99.59	95.12	97.97	86.18	100.00

หมายเหตุ PPM = Preao puen muang,เปรี้ยวพื้นเมือง
 PRMM = Fungal Preao puen muang,เปรี้ยวพื้นเมือง
 PPM5 = Treated with 5 Kr Preao puen muang,เปรี้ยวพื้นเมืองได้รับรังสี 5 Kr (กิโรรัด)
 PPM10 = Treated with 10 Kr Preao puen muang,เปรี้ยวพื้นเมืองได้รับรังสี10Kr(กิโรรัด)
 PPM15 = Treated with 15 Kr Preao puen muang,เปรี้ยวพื้นเมืองได้รับรังสี15Kr(กิโรรัด)
 PPM20 = Treated with 20 Kr Preao puen muang,เปรี้ยวพื้นเมืองได้รับรังสี20Kr(กิโรรัด)
 Seq-> = Sequence bases in rbcL of Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองทั้ง 6 ทริทเมนต์ในตารางที่ 4.6 ได้ผลดังนี้

1. มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง(PPM)มีลำดับเบสเหมือนกับเปรี้ยวพื้นเมืองที่ขึ้นรา(PPMM) 97.15% ต่างกัน 2.85% ถือว่าเชื้อราไม่มีผลก่อให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง(PPM)

2. รังสีทั้ง 4 ระดับ คือ 5,10,15และ 20Kr มีผลทำให้ลำดับเบสของยีนในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง(PPM)แตกต่างกัน 2.03 %,3.05%,16.87%และ3.25% ตามลำดับ แสดงว่ารังสีไม่มีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง ยกเว้นรังสีระดับ 15Krเพียงทริทเมนต์เดียว โดยที่ความเข้มของรังสี 15Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 16.87 % สำหรับผลของรังสีทั้ง 4 ระดับต่อพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ขึ้นรา (PPMM) จะก่อให้เกิดความแตกต่าง 6.30%,8.70%,9.40%และ12.40% ตามลำดับ โดยที่ความเข้มของรังสี 20 Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 12.40 % ถือว่ารังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายของมะขามทั้งพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง(PPM)และเปรี้ยวพื้นเมืองที่ขึ้นรา(PPMM)

นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสเป็นรายจุด(single nucleotide analysis)ที่เกิดการแทนที่ของเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit โดยใช้พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองปกติ(PPM)เป็นหลักในการเทียบจำนวน 492 bp ได้ผลดังนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 5 ตารางที่ ผ5.2)

1.พันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองขึ้นรา(PPMM)เกิดการแทนที่ของเบส17จุดคิดเป็น3.46%ของ 492bpดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 78	A=Adenine
2/ 81	A=Adenine
3/ 84	C=Cytosine
4/ 85	A=Adenine

5/ 88	C=Cytosine
6/ 89	A=Adenine
7/ 90	G=Guanine
8/ 95	G=Guanine
9/ 101	T=Thymine
10/ 102	C=Cytosine
11/ 103	A=Adenine
12/ 481	T=Thymine
13/ 482	A=Adenine
14/ 483	A=Adenine
15/ 487	A=Adenine
16/ 488	T=Thymine
17/ 489	A=Adenine

2. พันธุ์ปลุกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 5 Kr (PPM5) เกิดการแทนที่ของเบส 11 จุดคิดเป็น 2.24% ของ 492bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 469	T=Thymine
2/ 480	C=Cytosine
3/ 481	T=Thymine
4/ 482	C=Cytosine
5/ 484	T=Thymine
6/ 485	G=Guanine
7/ 486	G=Guanine
8/ 488	T=Thymine
9/ 490	A=Adenine
10/ 491	A=Adenine
11/ 492	T=Thymine

3. พันธุ์ปลุกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 10 Kr (PPM10) เกิดการแทนที่ของเบส 17 จุดคิดเป็น 3.46% ของ 492bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 20	A=Adenine
2/ 78	A=Adenine
3/ 81	A=Adenine
4/ 84	C=Cytosine
5/ 85	A=Adenine
6/ 88	C=Cytosine
7/ 89	A=Adenine
8/ 90	G=Guanine
9/ 95	G=Guanine
10/ 101	T=Thymine
11/ 102	C=Cytosine
12/ 103	A=Adenine
13/ 479	T=Thymine
14/ 484	T=Thymine
15/ 486	T=Thymine
16/ 489	A=Adenine
17/ 491	A=Adenine

4. พันธุ์ปลุกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 15 Kr (PPM15) เกิดการแทนที่ของเบส 86 จุด คิดเป็น 17.48% ของ 492bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 1	T=Thymine
2/ 2	C=Cytosine
3/ 4	G=Guanine
4/ 6	G=Guanine
5/ 7	A=Adenine
6/ 8	G=Guanine
7/ 11	A=Adenine
8/ 14	G=Guanine
9/ 15	A=Adenine
10/ 18	G=Guanine

11/ 19	C=Cytosine
12/ 22	A=Adenine
13/ 27	G=Guanine
14/ 29	T=Thymine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
15/ 30	G=Guanine
16/ 32	C=Cytosine
17/ 33	T=Thymine
18/ 37	C=Cytosine
19/ 38	G=Guanine
20/ 39	C=Cytosine
21/ 41	T=Thymine
22/ 44	G=Guanine
23/ 45	T=Thymine
24/ 50	T=Thymine
25/ 78	T=Thymine
26/ 81	A=Adenine
27/ 84	C=Cytosine
28/ 85	A=Adenine
29/ 88	C=Cytosine
30/ 89	A=Adenine
31/ 90	G=Guanine
32/ 95	G=Guanine
33/ 101	T=Thymine
34/ 102	C=Cytosine
35/ 103	A=Adenine
36/ 401	G=Guanine
37/ 403	C=Cytosine
38/ 406	A=Adenine
39/ 407	A=Adenine
40/ 410	A=Adenine
41/ 411	C=Cytosine

42/ 413	T=Thymine
43/ 414	G=Guanine
44/ 415	C=Cytosine
45/ 416	A=Adenine
46/ 419	T=Thymine
47/ 420	T=Thymine
48/ 422	G=Guanine
49/ 423	A=Adenine
50/ 426	C=Cytosine
51/ 428	T=Thymine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
52/ 430	A=Adenine
53/ 434	G=Guanine
54/ 435	C=Cytosine
55/ 436	T=Thymine
56/ 438	G=Guanine
57/439	C=Cytosine
58/ 441	C=Cytosine
59/ 442	T=Thymine
60/ 443	G=Guanine
61/ 447	G=Guanine
62/ 450	G=Guanine
63/ 451	T=Thymine
64/ 452	T=Thymine
65/ 453	G=Guanine
66/ 454	A=Adenine
67/ 455	A=Adenine
68/ 460	T=Thymine
69/ 461	G=Guanine
70/ 465	A=Adenine
71/ 467	C=Cytosine
72/ 468	T=Thymine

73/ 469	G=Guanine
74/ 471	A=Adenine
75/ 473	T=Thymine
76/ 475	C=Cytosine
77/ 477	A=Adenine
78/ 479	A=Adenine
79/ 481	C=Cytosine
80/ 482	T=Thymine
81/ 484	G=Guanine
82/ 485	C=Cytosine
83/ 486	A=Adenine
84/ 488	T=Thymine
85/ 490	G=Guanine
86/ 493	A=Adenine

5. พันธุ์ปลุกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ได้รับรังสี 20 Kr (PPM20) เกิดการแทนที่ของเบส 19 จุดคิดเป็น 3.86% ของ 492bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 3	A=Adenine
2/ 4	T=Thymine
3/ 78	A=Adenine
4/ 81	A=Adenine
5/ 84	C=Cytosine
6/ 85	A=Adenine
7/ 88	C=Cytosine
8/ 89	A=Adenine
9/ 90	G=Guanine
10/ 95	G=Guanine
11/ 101	T=Thymine
12/ 102	C=Cytosine
13/ 103	A=Adenine
14/ 481	T=Thymine

15/ 482	A=Adenine
16/ 483	A=Adenine
17/ 487	A=Adenine
18/ 488	T=Thymine
19/ 489	A=Adenine

กลุ่มเปรี้ยวยักษ์



ภาพที่ 4.14 มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์(PRY)



ภาพที่ 4.15 มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ขึ้นรา(PRYM)

มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ ใช้อักษรย่อ PRY (Preao Yak) เป็นมะขามที่มีขนาดใหญ่และยาว บางฝักมีขนาดยาวถึง 10 นิ้ว กว้าง 2 นิ้ว มีรสเปรี้ยวจัด(ภาพที่ 4.13) นิยมใช้ทำมะขามแช่อิ่มและมะขามหยี ไม่พบต้นขึ้นรา แต่บางฝักที่มีรอยแตกร้าว พบการขึ้นราบ้าง(ภาพที่ 4.14) การทดลองในที่นี้ได้้นำมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ขึ้นราไปตรวจ DNA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ขึ้นราด้วย เพื่อดูว่าเชื้อรามีผลต่อลำดับเบสในยีน rbcL หรือไม่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษา DNA ของพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่นำไปฉายรังสี 5-20 Kr เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยได้นำ DNA ของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส รวมทั้งสิ้น 6 ทรินเมนต์ ได้ผลดังนี้

1. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์(PRY)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PPY_

```
TTCCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGCGAGAGAATTGGGAGTTCCTCTCGCCAGGC
ATGACACCTTCCTCGGGGATTCTCGGCCAATACTATCTTGGGCTCACTCTTGTAGGGACTGTGGC
CTACTTCTTCACCCCCAGGGTGGCCCAAAGTTCCTCCATCAAATTGATAGTACAGAAGAATCATGG
CTTGCAATATTCCTGTACTAGCTGAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTAC
TGTAGTAGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGA
TTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGT
TCTGCCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGA
TGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGT
AGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGACTCGTAATGAGGGACGTAGATCTTGCATCG
TGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGATTTAACCTGCTGCAA
```

2. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ขึ้นรา(PRYM)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PRYM_

```
TATCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGGGGATTTGCGAGAGGATTGGGAGTTCCTATCGTAAT
GCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCTGGGATAATGG
TCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCA
TTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGT
AGGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTAT
TGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCC
CGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTC
CGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAA
```

TCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAA
TGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGGCTGCTGCAAAA

3. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ได้รับรังสี 5 Kr (PRY5)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PRY5_

CTTCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGGATTTGCGAGAGAATTGGGAGTTCCTATCGTAATGC
ATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTGCGGATAATGGTC
TACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATT
TTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAG
GTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTG
AAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCG
TTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCG
TACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCCTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATC
GAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATG
AAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTGGCTGCTGCAAA

4. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ได้รับรังสี 10 Kr (PRY10)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PRY10_

TCATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGGGGGTTTTCGAGAGAATTGGGAGTTCCTATCGTAATGC
ATGACTACTTAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTGCGGATAATGGTC
TACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATT
TTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAG
GTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTG
AAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCG
TTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCG
TACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCCTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATC
GAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATG
AAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCAAAA

5. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ได้รับรังสี 15 Kr (PRY15)มีลำดับเบสในยีน rbcLดังนี้

>PRY15_

ATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTATTTGCGGGGGGATTGATGAGTGCTGATTCGCTGCTGC
ATGTCGGACTTAAGTGCAGCATTTCCGGCGCATACTATCTTGGCTCAGTAGTATCGGGATAATGGT

CTACTTCTTCACATCCATCATGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCAT
 TTTCTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTA
 GGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATT
 GAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCC
 GTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCC
 GTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAAT
 CGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGCTACAAGCTCGTCAATGAGGGACGTGCATCTTGCTCGTGAGGGT
 AATGAAATTATCGCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCAAAA

6. พันธุ์ปลุกเปรี๊วยักษ์ที่ได้รับรังสี 20 Kr (PRY20)มีลำดับเบสในยีน rbcL ดังนี้

>PRY20_

TATCATGGGAAGAAATGATAAAAAGGGCTAATTTGCGAGAGAATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCA
 TGACTIONAACAGGGGGATTACCGCAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCT
 ACTTCTTCACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTT
 TCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGG
 TAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGA
 AAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCCGT
 TGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGT
 ACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCG
 AGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGA
 AATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCAAAA

เมื่อนำลำดับเบสของยีน rbcL จากมะขามพันธุ์ปลุกเปรี๊วยักษ์ 6 ทริทเมนต์ เปรียบเทียบหา
 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) โดยใช้พันธุ์ปลุกเปรี๊วยักษ์ (PRY) เป็นหลักในการเปรียบเทียบ
 (100%) จำนวน 511 bp ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตาราง	Seq->	PRY	PRYM	PRY5	PRY10	PRY15	PRY20	ที่ 4.7
	PRY	100.00						
	PRYM	91.00	100.00					
	PRY5	91.00	98.63	100.00				
	PRY10	90.19	98.83	98.83	100.00			
	PRY15	91.00	95.50	94.91	95.50	100.00		
	PRY20	90.80	99.22	99.22	99.02	94.91	100.00	

เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) ของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามหวาน
พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ จำนวน 6 ทรีทเมนต์(ดูรายละเอียดในภาคผนวก 6 ตารางที่ ผ6.1)

หมายเหตุ PRY = Preaoyak, เปรี้ยวยักษ์
PRYM = Fungal Preaoyak, เปรี้ยวยักษ์ขึ้นรา
PRY5 = Treated with 5 Kr Preaoyak, เปรี้ยวยักษ์ได้รับรังสี 5 Kr (กิโลแตรด)
PRY10 = Treated with 10 Kr Preaoyak, เปรี้ยวยักษ์ได้รับรังสี 10 Kr (กิโลแตรด)
PRY15 = Treated with 15 Kr Preaoyak, เปรี้ยวยักษ์ได้รับรังสี 15 Kr (กิโลแตรด)
PRY20 = Treated with 20 Kr Preaoyak, เปรี้ยวยักษ์ได้รับรังสี 20 Kr (กิโลแตรด)
Seq-> = Sequence bases in rbcL of Tamarind, ลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขาม

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสในยีน rbcL ของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์
ทั้ง 6 ทรีทเมนต์ในตารางที่ 4.7 ได้ผลดังนี้

1.มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์(PRY)มีลำดับเบสเหมือนกับเปรี้ยวยักษ์ที่ขึ้นรา(PRYM) 91.00% ต่างกัน
9.00% ถือว่าเชื้อราไม่ผลก่อให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์(PRY)

2. รังสีทั้ง 4 ระดับ คือ 5,10,15 และ 20Kr มีผลทำให้ลำดับเบสของยีนในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ (PRY) แตกต่างกันได้ 9.00 %, 8.81%, 9.00% และ 9.20% ตามลำดับ แสดงว่ารังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ โดยที่ความเข้มของรังสี 20Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 9.20 % สำหรับผลของรังสีทั้ง 4 ระดับต่อพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ขึ้นรา (PRYM) จะก่อให้เกิดความแตกต่าง 1.37%, 1.17%, 4.50% และ 0.78% ตามลำดับ ถือว่ารังสีทุกระดับไม่มีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ติดเชื้อรา (PRYM)

นอกจากนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสเป็นรายจุด (single nucleotide analysis) ที่เกิดการแทนที่ของเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit โดยใช้พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ปกติ (PRY) เป็นหลักในการเทียบจำนวน 511 bp ได้ผลดังนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 6 ตารางที่ ผ6.2)

1. พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ขึ้นรา (PRYM) เกิดการแทนที่ของเบส 61 จุด คิดเป็น 11.94% ของ 511 bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 22	G=Guanine
2/ 23	A=Adenine
3/ 27	G=Guanine
4/ 28	C=Cytosine
5/ 29	G=Guanine
6/ 42	G=Guanine
7/ 43	T=Thymine
8/ 44	T=Thymine
9/ 46	A=Adenine
10/ 47	A=Adenine
11/ 49	A=Adenine
12/ 54	G=Guanine
13/ 55	A=Adenine
14/ 57	T=Thymine

15/ 59	A=Adenine
16/ 75	C=Cytosine
17/ 77	G=Guanine
18/ 79	A=Adenine
19/ 80	T=Thymine
20/ 97	A=Adenine
21/ 99	A=Adenine
22/ 100	T=Thymine
23/ 101	C=Cytosine
24/ 111	G=Guanine
25/ 113	G=Guanine
26/ 114	A=Adenine
27/ 120	C=Cytosine
28/ 121	A=Adenine
29/ 122	A=Adenine
30/ 130	T=Thymine
31/ 381	A=Adenine
32/ 382	T=Thymine
33/ 439	G=Guanine
34/ 440	C=Cytosine
35/ 441	T=Thymine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
36/ 442	C=Cytosine
37/ 461	C=Cytosine
38/ 462	T=Thymine
39/ 463	C=Cytosine
40/ 464	G=Guanine
41/ 465	T=Thymine
42/ 466	A=Adenine
43/ 471	T=Thymine
44/ 472	C=Cytosine
45/ 477	T=Thymine

46/ 479	A=Adenine
47/ 481	T=Thymine
48/ 485	G=Guanine
49/ 486	A=Adenine
50/ 487	G=Guanine
51/ 488	G=Guanine
52/ 489	T=Thymine
53/ 490	G=Guanine
54/ 491	G=Guanine
55/ 492	T=Thymine
56/ 494	C=Cytosine
57/ 495	T=Thymine
58/ 496	G=Guanine
59/ 497	A=Adenine
60/ 498	A=Adenine
61/ 502	G=Guanine

2. พันธุ์ปลุกเปรียวยักษ์ที่ได้รับรังสี 5 Kr (PRY5) เกิดการแทนที่ของเบส 58 จุด คิดเป็น 11.35 % ของ 511bp ดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 22	G=Guanine
2/ 23	A=Adenine
3/ 26	G=Guanine
4/ 27	C=Cytosine
5/ 29	A=Adenine
6/ 42	G=Guanine
7/ 43	T=Thymine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
8/ 44	T=Thymine
9/ 46	A=Adenine
10/ 47	A=Adenine
11/ 49	A=Adenine

12/ 54	G=Guanine
13/ 55	A=Adenine
14/ 57	T=Thymine
15/ 59	A=Adenine
16/ 75	C=Cytosine
17/ 77	G=Guanine
18/ 79	A=Adenine
19/ 80	T=Thymine
20/ 97	A=Adenine
21/ 99	A=Adenine
22/ 100	T=Thymine
23/ 101	C=Cytosine
24/ 111	G=Guanine
25/ 113	G=Guanine
26/ 114	A=Adenine
27/ 120	C=Cytosine
28/ 121	A=Adenine
29/ 122	A=Adenine
30/ 130	T=Thymine
31/ 381	A=Adenine
32/ 382	T=Thymine
33/ 439	G=Guanine
34/ 440	C=Cytosine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
35/ 441	T=Thymine
36/ 442	C=Cytosine
37/ 461	C=Cytosine
38/ 462	T=Thymine
39/ 463	C=Cytosine
40/ 464	G=Guanine
41/ 465	T=Thymine
42/ 466	A=Adenine
43/ 471	T=Thymine
44/ 472	C=Cytosine
45/ 477	T=Thymine
46/ 479	A=Adenine
47/ 481	T=Thymine
48/ 482	T=Thymine
49/ 485	G=Guanine
50/ 487	A=Adenine
51/ 491	G=Guanine
52/ 492	T=Thymine
53/ 494	C=Cytosine
54/ 495	T=Thymine
55/ 496	G=Guanine
56/ 497	A=Adenine
57/ 498	A=Adenine
58/ 502	G=Guanine

3.พันธุ์ปลุกเปรียวยักษ์ที่ได้รับรังสี 10 Kr (PRY10)เกิดการแทนที่ของเบส59 จุดคิดเป็น11.55 %ของ 511bpดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 21	T=Thymine
2/ 22	C=Cytosine
3/ 27	G=Guanine

4/ 28	G=Guanine
5/ 29	A=Adenine
6/ 30	G=Guanine
7/ 42	A=Adenine
8/ 43	G=Guanine
9/ 44	A=Adenine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
10/ 46	A=Adenine
11/ 47	A=Adenine
12/ 49	A=Adenine
13/ 54	G=Guanine
14/ 55	A=Adenine
15/ 57	T=Thymine
16/ 59	A=Adenine
17/ 75	C=Cytosine
18/ 77	G=Guanine
19/ 79	A=Adenine
20/ 80	T=Thymine
21/ 97	A=Adenine
22/ 99	A=Adenine
23/ 100	T=Thymine
24/ 101	C=Cytosine
25/ 111	G=Guanine
26/ 113	G=Guanine
27/ 114	A=Adenine
28/ 120	C=Cytosine
29/ 121	A=Adenine
30/ 122	A=Adenine
31/ 130	T=Thymine
32/ 381	A=Adenine
33/ 382	T=Thymine
34/ 439	G=Guanine

35/ 440	C=Cytosine
36/ 441	T=Thymine
37/ 442	C=Cytosine
38/ 461	C=Cytosine
39/ 462	T=Thymine
40/ 463	C=Cytosine
41/ 464	G=Guanine
42/ 465	T=Thymine
43/ 466	A=Adenine
44/ 471	T=Thymine
45/ 472	C=Cytosine
46/ 477	T=Thymine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
47/ 479	A=Adenine
48/ 481	T=Thymine
49/ 485	G=Guanine
50/ 487	G=Guanine
51/ 488	G=Guanine
52/ 491	G=Guanine
53/ 492	T=Thymine
54/ 494	C=Cytosine
55/ 495	T=Thymine
56/ 496	G=Guanine
57/ 497	A=Adenine
58/ 498	A=Adenine
59/ 502	G=Guanine

4. พันธุ์ปลุกเปรี๊ยะยักษ์ที่ได้รับรังสี 15Kr (PRY15)เกิดการแทนที่ของเบส 58 จุด คิดเป็น11.35 %ของ 511bpดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 31	G=Guanine
2/ 38	A=Adenine

3/ 42	G=Guanine
4/ 43	T=Thymine
5/ 44	T=Thymine
6/ 45	G=Guanine
7/ 47	A=Adenine
8/ 49	T=Thymine
9/ 50	T=Thymine
10/ 51	C=Cytosine
11/ 54	G=Guanine
12/ 55	A=Adenine
13/ 57	T=Thymine
14/ 75	C=Cytosine
15/ 77	G=Guanine
16/ 79	A=Adenine
17/ 80	T=Thymine
18/ 97	A=Adenine
19/ 99	A=Adenine

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
20/ 100	T=Thymine
21/ 101	C=Cytosine
22/ 111	G=Guanine
23/ 113	G=Guanine
24/ 114	A=Adenine
25/ 120	C=Cytosine
26/ 121	A=Adenine
27/ 122	A=Adenine
28/ 130	T=Thymine
29/ 381	A=Adenine
30/ 382	T=Thymine
31/ 439	G=Guanine
32/ 441	T=Thymine
33/ 442	C=Cytosine
34/ 451	A=Adenine
35/ 459	G=Guanine
36/ 460	T=Thymine
37/ 461	C=Cytosine
38/ 462	T=Thymine
39/ 463	A=Adenine
40/ 465	T=Thymine
41/ 466	A=Adenine
42/ 467	G=Guanine
43/ 471	T=Thymine
44/ 477	T=Thymine
45/ 478	T=Thymine
46/ 459	A=Adenine
47/ 481	T=Thymine
48/ 484	G=Guanine
49/ 485	G=Guanine
50/ 488	C=Cytosine

51/ 491	G=Guanine
52/ 492	T=Thymine
53/ 494	C=Cytosine
54/ 495	T=Thymine
55/ 496	G=Guanine
56/ 497	A=Adenine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
57/498	A=Adenine
58/ 502	G=Guanine

5. พันธุ์ปลุกเปรียวยักษ์ที่ได้รับรังสี 20 Kr (PRY20)เกิดการแทนที่ของเบส 59จุด คิดเป็น11.55 %ของ 511bpดังนี้

จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
1/ 22	G=Guanine
2/ 23	A=Adenine
3/ 26	G=Guanine
4/ 27	C=Cytosine
5/ 29	A=Adenine
6/ 42	G=Guanine
7/ 43	T=Thymine
8/ 44	T=Thymine
9/ 46	A=Adenine
10/ 47	A=Adenine
11/ 49	A=Adenine
12/ 54	G=Guanine
13/ 55	A=Adenine
14/ 57	T=Thymine
15/ 59	A=Adenine
16/ 75	C=Cytosine
17/ 77	G=Guanine
18/ 79	A=Adenine
19/ 80	T=Thymine

20/ 97	A=Adenine
21/ 99	A=Adenine
22/ 100	T=Thymine
23/ 101	C=Cytosine
24/ 111	G=Guanine
25/ 113	G=Guanine
26/ 114	A=Adenine
27/ 120	C=Cytosine
28/ 121	A=Adenine
29/ 122	A=Adenine
30/ 130	T=Thymine
31/ 381	A=Adenine
จุดที่/ตำแหน่งที่เกิดการแทนที่	ถูกแทนที่ด้วยเบส
32/ 382	T=Thymine
33/ 439	G=Guanine
34/ 440	C=Cytosine
35/ 441	T=Thymine
36/ 442	C=Cytosine
37/ 461	C=Cytosine
38/ 462	T=Thymine
39/ 463	C=Cytosine
40/ 464	G=Guanine
41/ 465	T=Thymine
42/ 466	A=Adenine
43/ 471	T=Thymine
44/ 472	C=Cytosine
45/ 477	T=Thymine
46/ 479	A=Adenine
47/ 481	T=Thymine
48/ 485	G=Guanine
49/ 486	A=Adenine
50/ 487	T=Thymine

51/ 488	G=Guanine
52/ 491	G=Guanine
53/ 492	T=Thymine
54/ 494	C=Cytosine
55/ 495	T=Thymine
56/ 496	G=Guanine
57/ 497	A=Adenine
58/ 498	A=Adenine
59/ 502	G=Guanine

บทที่ 5

การสรุปผลการทดลอง วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

การสรุปผลและการวิจารณ์ผลการทดลองตอนที่ 1 การเพาะเมล็ดร่วมกับการฉายรังสี

จากการนำ มะขาม 6 พันธุ์ปลูก คือ ปรายทอง สีทอง ศรีชมภู ชันติ เปี้ยวพื้นเมืองและเปี้ยวยักษ์ ทั้งจากต้นที่ไม่ติดเชื้อราหรือไม่ขึ้นรา และต้นที่ขึ้นราหรือติดเชื้อรา รวมทั้งหมด 600 ฝัก(100ฝัก/พันธุ์ปลูก) พบว่า ฝักที่มีราขึ้นบริเวณหัวฝักและขึ้นยาวไปตามสาแหรก เชื้อราเจริญอยู่บนผิวเนื้อเยื่อ และเชื้อราทำลายเนื้อเยื่อไม่ถึง 50% เมล็ดจะยังสามารถงอกได้ดี แต่บางฝักที่มีราขึ้นอยู่ภายในเนื้อเยื่อ ไม่พบราที่หัวฝักและสาแหรก เนื้อเยื่อถูกทำลายมากเกินไป 50 % จะมีอัตราการงอกต่ำมาก ทำให้ตั้งข้อสังเกตได้ว่า การติดเชื้อราของมะขาม น่าจะมี 2 แบบ คือเชื้อราเข้าทางรอยตัดของฝักแล้วเจริญไปตามสาแหรกเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อ กับการติดเชื้อราตั้งแต่เป็นดอก โดยเชื้อราเข้าไปเจริญในรังไข่แล้วเจริญผ่านตัวพร้อมกับเนื้อเยื่อที่พัฒนา(development)กลายเป็น ฝักมะขาม ทำให้ไม่สามารถควบคุมหรือทราบอัตราการถูกทำลายด้วยเชื้อราของฝักมะขามแต่ละฝักหรือแต่ละพันธุ์ปลูกให้เริ่มต้นเท่ากันก่อนนำไปฉายรังสีได้ จึงนำเมล็ดจากฝักมะขามที่ไม่ขึ้นราเท่านั้นนำไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน(acute radiation) 5 ระดับ (ทริทเมนต์) คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 Kr โดยใช้พันธุ์ปลูกละ 500 เมล็ด(สุ่มเลือกจาก100ฝัก/พันธุ์ปลูก) ต่อการฉายรังสีทั้ง 5 ระดับ หรือพันธุ์ปลูกละ 100 เมล็ดต่อรังสี 1 ระดับ รวมเป็น 30 ทริทเมนต์คอมบินชัน ทำการเพาะเมล็ดในแกลบและถุงดำที่ปลอดเชื้อ และเลี้ยงในเรือนเพาะชำที่สะอาด ผลการทดลองพบว่า ใบแก่ชุดแรกของทุกต้นในทุกทริทเมนต์ที่ได้รับรังสีจะมีใบหนาและลายเป็นโมเสก ซึ่งน่าจะเนื่องมาจากเซลล์ถูกทำลายด้วยรังสี ต่อมาเซลล์มีกลไกในการซ่อมแซมตัวเอง ใบแก่ชุดต่อ ๆ มาจึงเจริญเป็นใบที่เห็นเป็นปกติ ลักษณะใบลายเป็นโมเสกเหมือนผลของใบมันฝรั่งที่ถูกทริทด้วยไวรัสจากการทดลองของ Dmitriev, Shevchenko, Polischuk and Guscha (2009) แสดงว่า รังสีแกมมาและไวรัสมีผลทำให้ใบพืชเกิดเป็นใบลายแบบโมเสกได้เหมือนกัน และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Mongi Melki and Marouani, 2010 ซึ่งพบว่ารังสีแกมมา มีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวสาลี แต่เมื่อตรวจดูลำดับเบสของยีน rbcl ในมะขามที่ได้รับรังสีเทียบกับต้นปกติ พบว่ามีการแทนที่ด้วยเบสทั้ง 4 ชนิดตั้งแต่ 0.82-51.87%

เทคนิคการนำเมล็ดไปฉายรังสีแล้วจึงนำไปเพาะเพื่อตรวจดู DNA มีปัญหาหรือข้อบกพร่องในเรื่องการนำเมล็ดจากฝักที่ขึ้นราไปฉายรังสี เพราะรังสีอาจทำให้เชื้อราตาย จนไม่มีผลต่อการกลายในเมล็ด และไม่ทราบว่า เมล็ดก่อนฉายรังสีถูกเชื้อราทำลายไปมากน้อยเพียงไร และถ้าเกิดการกลาย การกลายนั้นมาจากผลของเชื้อรา หรือผลของรังสี หรือเป็นอิทธิพลร่วมระหว่างเชื้อรากับรังสี ทำให้สรุปไม่ได้ในกรณีผลของเชื้อรา แต่สำหรับในเรื่องผลของรังสี และความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดและเห็นผลชัดเจน

การสรุปผลและการวิจารณ์ผลการทดลองตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี

จากการทดลองโดยการเตรียมเนื้อเยื่อจากต้นอ่อนมะขาม 6 พันธุ์ปลูกซึ่งได้แก่ พันธุ์ปลูกปรายทอง, สีทอง, ศรีชมภู, ชันติ, เปี้ยวพื้นเมือง และเปี้ยวยักษ์ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา 5 ระดับ คือ 0,5,10,15 และ20 Kr โดยนำเนื้อเยื่อต้นอ่อนไปฉายรังสีแบบเรื้อรัง(chronic radiation)เป็น

เวลา 2 สัปดาห์นั้น เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก และสิ้นเปลือง พบปัญหาในเรื่องการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ในบรรยากาศในระหว่างการสับคัลเจอร์และการถ่ายเปลี่ยนอาหารให้ต้นอ่อน และนอกจากนี้ ไม่สามารถใช้ได้กับ ตัวอย่างเมล็ดหรือเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อมาก่อนในการทดลองนี้ได้ เพราะอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อกลายเป็นอาหารอัน โอชะและอุดมสมบูรณ์สำหรับเชื้อราอย่างรวดเร็วกว่าในธรรมชาติ จนเนื้อเยื่อเจริญไม่ทันและถูกทำลาย แต่ ในทางกลับกัน เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติจนอยู่รอดแข็งแรงดีแล้ว จึงเติมเชื้อรามะขามลงไป ปลอ่ยให้เจริญร่วมกัน ไป แล้วจึงนำไปฉายรังสี จากนั้นเก็บใบจากต้นที่ติดเชื้อราและ/หรือได้รับรังสีนี้ไปสกัด DNA เพื่อศึกษา ทำให้ สรุปลผลของเชื้อราต่อเนื้อเยื่อมะขามได้ชัดเจนกว่าวิธีเพาะเมล็ด สำหรับกรณีศึกษาผลของรังสีต่อเนื้อเยื่อมะขาม ได้ผลเช่นเดียวกับวิธีเพาะเมล็ด แต่สิ้นเปลืองมากกว่าและไม่สามารถศึกษาการเจริญเติบโตของมะขามใน หลอดแก้วได้นาน ต้องทำการปรับสภาพต้นอ่อน และนำปลูกลงดินต่อไป

การสรุปผลและการวิจารณ์ผลการทดลองตอนที่ 3 การศึกษาลำดับเบสของยีน rbcL

จากการเก็บใบมะขามทุกพันธุ์ปลูกทุกทริทเมนต์ อายุ 4 สัปดาห์ ไปทำการสกัด DNA โดยวิธี CTAB โดยใช้ชุด kit Real Genomics ของบริษัท RBC Bioscience Crop ประเทศไต้หวัน ซึ่งเป็นวิธีประยุกต์จากวิธี CTAB ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR และใช้ คู่ primer rbcL tam F03 และ rbcL tam R04 จากนั้นส่งไป sequence ที่ บริษัท FIRST BASE ประเทศมาเลเซีย เมื่อได้ผลการ sequence ทำการวิเคราะห์ เปรียบเทียบหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity) และวิเคราะห์ลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์เป็นรายจุด (single nucleotide analysis) และหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทดแทนของเบสในยีน rbcL ของมะขามทั้ง 6 พันธุ์ปลูก ได้ผลโดยสรุปดังนี้

1. กลุ่มประกายทอง

1.1 เชื้อราไม่มีผลต่อส่วนหนึ่งของยีนrbcLและ ยีนต้านเชื้อราไม่ได้อยู่ในส่วนหนึ่งของยีนrbcLช่วงที่ใช้ ในการทดลองนี้(496bp)

1.2 รังสี ทั้ง 4 ระดับ คือ 5,10,15และ 20 Kr ไม่มีผลต่อยีนrbcLในมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง ยกเว้น ความเข้มของรังสี 15 Kr เพียงระดับเดียวที่ก่อให้เกิดความแตกต่างจากต้น *T.indica*ใน GenBank 5.3% และมีความ แตกต่างจากทริทเมนต์อื่น ๆ เกิน 5% ทั้ง 7 ทริทเมนต์ คือ ต้นปกติ PKT1, ต้นขึ้นรา PKTM, ต้นต้านเชื้อราต้นที่1 PKTF1, ต้นต้านเชื้อราต้นที่2 PKTF2, ต้นที่ได้รับรังสี 5 Kr, ต้นที่ได้รับรังสี 10 Kr และต้นที่ได้รับรังสี 20 Kr

1.3 รังสีที่มีความเข้ม 5,10และ 20 Kr.ไม่ก่อให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง คือ มีลำดับ เบสเหมือนต้นปกติ 99.19 % เพียงแต่ก่อให้เกิดการแทนที่ของเบสในตำแหน่งที่ต่างกันเท่านั้น คือเกิดความ ผิดปกติ 2 จุด ,4จุด และ 4 จุด ตามลำดับ สำหรับความเข้ม 15 Kr. ก่อให้เกิดการกลายสูงสุด 75 จุด/ตำแหน่ง คิด เป็น 15.12% ของ 496 bp

2. กลุ่มสีทอง

2.1 สีทองหนักและสีทองเบามียีน rbcL แตกต่างกันเพียง 1.82 % โดยเกิดการแทนที่ของเบส 10 จุด ถือว่าเป็นพันธุ์ปลูกเดียวกันได้ และเมื่อพิจารณาจากช่วงเวลาการออกดอกหรือติดดอก โครงสร้างของดอก รูปร่างลักษณะของฝัก รสชาติ กลิ่น และสีส่นของเนื้อเยื่อ ไม่แตกต่างกันมากนัก เพียงแต่พันธุ์ปลูกที่ชาวบ้านหรือ

เกษตรกรเรียกว่าสีทองเบาจะมีฝักสุกก่อน คือ ฝักสุกประมาณต้นเดือนมกราคม และทยอยสุกไปเรื่อย ๆ ส่วนโน้นบ้าง ส่วนนี้บ้าง ไปจนถึงเดือนพฤษภาคม และเรียกต้นที่ฝักสุกช้าว่า สีทองหนัก ซึ่งเปรียบเหมือนคนเชื้อชาติเดียวกัน อยู่หมู่บ้านเดียวกัน อายุเท่ากัน บางคนเป็นสาวเร็ว มีลูกมาก บางคนเป็นสาวช้า มีลูกยาก มีลูกน้อย ฯลฯ แต่ทั้งหมดคือคนเชื้อชาติเดียวกัน

2.2 สีทองจุกกับสีทองหนักและสีทองเบา มีลำดับเบสบนยีนrbcl แตกต่างกัน คือ สีทองจุกต่างจากสีทองหนัก 6.18% และต่างจากสีทองเบา 6.38% สีทองจุกมีการแทนที่ของเบส35จุด คิดเป็น6.38% ของ 549 bp

2.3 เชื้อรามีผลต่อลำดับเบสของยีน rbclในมะขามหวานพันธุ์ปลุกสีทองจุกเพียงพันธุ์ปลุกเดียวเท่านั้น คือ ทำให้สีทองจุก(STJ)ต่างจากทริทเมนต์อื่น 6.92%

2.4 รังสีทั้ง 4 ระดับคือ 5,10,15 และ20Kr มีผลต่อสีทองจุก (STJ)เพียง 3 ระดับ คือความเข้ม 5,10 และ 15 Kr โดยก่อให้เกิดความแตกต่างของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์สูงกว่า 5 % ทั้งสิ้น โดยก่อให้เกิดความแตกต่างระหว่าง 6.38%-6.92% ยกเว้นรังสี 20Krก่อให้เกิดความแตกต่างในพันธุ์ปลุกสีทองจุก 4.37% ไม่เกิน5 % แต่ก็เป็นเปอร์ที่ค่อนข้างสูงมาก

2.5 รังสีที่ความเข้ม 20Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างในทั้ง 7 ทริทเมนต์ของพันธุ์ปลุกสีทอง โดยก่อให้เกิดความแตกต่างระหว่าง 4.37% ถึง 7.47%

3. กลุ่มศรีชมพู

3.1 พันธุ์ปลุกศรีชมพูทั้ง 2 พันธุ์ปลุก คือศรีชมพูทองปลิง(SCPP) กับศรีชมพูทองกลม(SCPK) พบว่า ศรีชมพูทองปลิงเกิดการแทนที่ของเบส 55 จุด คิดเป็น 15.85%ของ 347 bp ซึ่งถือว่าเป็นคนละพันธุ์ปลุกกันเนื่องจากแตกต่างกันเกิน 5 % ซึ่งสอดคล้องกับความเห็นของเกษตรกรที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 พันธุ์ปลุกนี้ จากการสังเกตรูปร่างของฝักที่ต่างกันเพียงเล็กน้อย คือศรีชมพูทองปลิงจะมีลักษณะฝักแบนและสั้นกว่าศรีชมพูทองกลมเล็กน้อย ถ้าดูคนละครั้ง และไม่ชำนาญ จะบอกความแตกต่างไม่ได้เลย มะขามทั้ง 2 พันธุ์ปลุกนี้ จะมีรสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย ไม่หวานสนิทเหมือนประกายทองและสีทอง มีกลิ่นเฉพาะตัว เมล็ดค่อนข้างกลมเล็กเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์ปลุกอื่น ๆ พันธุ์ปลุกศรีชมพูทองกลมจะมีรสชาติเปรี้ยวมากกว่าศรีชมพูทองปลิง

3.2. รังสีทั้ง 4 ระดับคือ 5,10,15และ 20Kr มีรังสีความเข้ม 15 Kr เพียง ทริทเมนต์เดียวที่ก่อให้เกิดการกลายในพันธุ์ปลุกศรีชมพูปลิง คือ เกิดการแทนที่ด้วยเบสถึง 180 จุด จาก 347 bp คิดเป็น 51.87%

สำหรับผลของเชื้อราที่มีต่อพันธุ์ปลุกศรีชมพู ไม่ได้ศึกษา เนื่องจากไม่พบฝักที่ขึ้นรา ซึ่งอาจเป็นเพราะเนื้อมะขามมีรสเปรี้ยวอมหวาน โดยมะขามพันธุ์ปลุกศรีชมพูมีกรดทาร์ทาริก1.628 g/100g, มาลิก1.888 g/100g และซิตริก 0.631 g/100g ในขณะที่พันธุ์ปลุกเปรี้ยวยักษ์ มีกรดทาร์ทาริก18.102 g/100g,มาลิก0.591 g/100g และซิตริก 0.217 g/100g (ปฎิภาณิ ชันธโฆค, 2550) มะขามเปรี้ยวยักษ์เปรี้ยวมากจนเข็ดฟันรับประทานสดไม่ได้ เพราะมีกรดทาร์ทาริกสูง แต่มีกรดมาลิกและกรดซิตริกน้อยกว่ามะขามศรีชมพู มะขามเปรี้ยวยักษ์ขึ้นราพบได้ทั่วไป ดังนั้นกรดที่ช่วยป้องกันการขึ้นราในมะขามน่าจะเป็นกรดมาลิกกับกรดซิตริก ซึ่งทำให้ไม่พบมะขามศรีชมพูขึ้นรา แต่บางฝักที่พบขึ้นรา น่าจะเกิดจากฝนตก หรือน้ำค้างและหมอกลงจัดในช่วงฝักสุก ทำให้เชื้อราที่เจริญอยู่ในมะขามตั้งแต่ระยะเอ็มบริโอเจริญขึ้นมาเป็นฝ้าสีขาวจากเนื้อมะขาม ซึ่งเป็นสปอร์ของเชื้อราสีขาวคล้ายโรยน้ำตาล

ไอซิงส์บนเนื้อมะขาม เชื้อราชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pestalotiopsis sydowiana* (Bres.) (เบญจพร ศรีสุวรรณ มาศ, จินตนา สนามชัยสกุล และนิคม จันทรมังกร, 2553)

4. กลุ่มชั้นดี

4.1 มะขามหวานพันธุ์ปลูกชั้นดีตามที่เกษตรกรพื้นบ้านชาวจังหวัดเพชรบูรณ์แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ชั้นดีหยวก(KTY) และชั้นดีสร้อย(KTS) ซึ่งมีลักษณะของฝักเหมือนกัน สีส้ม และรสชาติของเนื้อฝักคล้ายกันจนแยกไม่ออก เพียงแต่น้ำตาลและความดกในการติดฝักต่างกัน ผลการตรวจ DNA ในยีน *rbcl* พบว่ามีความแตกต่างกันเป็นคนละพันธุ์ปลูก ซึ่งสอดคล้องกับความเห็นซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ส่งสืบทอดกันมา และเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นมะขาม พบว่า มีทรงพุ่มต่างกัน ลักษณะของฝักและการติดผลต่างกัน คือ ชั้นดีหยวกจะมีขนาดใหญ่กว่า และการติดฝักไม่ดกเท่าชั้นดีสร้อย ชั้นดีสร้อยจะติดฝักเป็นพวงตามลักษณะช่อดอกไม่เป็นฝักเดี่ยว ๆ เหมือนชั้นดีหยวก

4.2 เชื้อราไม่มีผลต่อชั้นดีหยวก(KTY) แต่มีผลต่อชั้นดีสร้อย(KTS) คือ มีลำดับเบสเหมือนกับชั้นดีสร้อยที่ขึ้นรา(KTSM) 88.60% ต่างกัน 11.4% ถือว่าเชื้อราไม่ผลทำให้ชั้นดีสร้อยเกิดการกลาย และเมื่อเทียบลำดับเบสของยีน *rbcl* ในชั้นดีสร้อยที่ได้รับเชื้อรากับลำดับเบสของยีน *rbcl* ในชั้นดีหยวกปกติ พบว่า ต่างกันเพียง 4 จุด (ดูรายละเอียดจากภาคผนวก 4 ตารางที่ ผ4.2) คือ ตำแหน่งที่ 29, 30, 32 และ 36 โดยชั้นดีสร้อยจะถูกแทนที่ด้วยเบส G=Guanine, A=Adenine, G=Guanine และ T=Thymine ตามลำดับ ซึ่งการต่างกันเพียง 4 จุด คิดเป็น 0.82 % ถือว่าเป็นพันธุ์ปลูกเดียวกัน แสดงว่าทั้ง 2 พันธุ์ปลูกนี้ คือ ชั้นดีหยวกกับชั้นดีสร้อยเดิมคือพันธุ์ปลูกเดียวกัน แต่มีบางสิ่งบางอย่างเช่นเชื้อรา หรืออาจเป็นรังสี ที่ก่อให้เกิดการกลายขึ้นจนเป็น 2 พันธุ์ปลูกดังกล่าว ซึ่งไม่ทราบว่าเป็นต้นตระกูลของใคร แต่ในปัจจุบันชั้นดีหยวกเป็นพันธุ์เศรษฐกิจที่น่าสนับสนุนให้เกษตรกรปลูก เนื่องจากมีรสชาติหวานหอม และไม่เป็นเชื้อรา

4.3 รังสีทั้ง 4 ระดับ คือ 5, 10, 15 และ 20 Kr ไม่มีผลต่อการกลายของพันธุ์ปลูกชั้นดีหยวก แต่สำหรับผลของรังสีทั้ง 5 ระดับต่อพันธุ์ปลูกชั้นดีสร้อย(KTS) จะก่อให้เกิดความแตกต่าง 9.80%, 9.80%, 10.41 และ 10.20% ตามลำดับ ถือว่ารังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายในมะขามชั้นดีสร้อย โดยที่ความเข้มของรังสี 15 Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 10.41 %

4.4 รังสีทั้ง 4 ระดับ คือ 5, 10, 15 และ 20 Kr ไม่มีผลต่อการกลายในมะขามชั้นดีหยวกที่ขึ้นรา และรังสีทุกระดับไม่มีผลต่อชั้นดีสร้อยที่ขึ้นรา(KTSM) เช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะชั้นดีสร้อยที่ขึ้นราได้เกิดการกลายเปลี่ยนเป็นชั้นดีหยวก ซึ่งมีลำดับต่างกันเพียง 4 จุด รังสีจึงไม่มีผลต่อชั้นดีสร้อยที่ขึ้นราเช่นเดียวกับการไม่มีผลต่อชั้นดีหยวกปกติและชั้นดีหยวกที่ขึ้นรา

5. กลุ่มเปรี้ยวพื้นเมือง

5.1 เชื้อราไม่มีผลก่อให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง(PPM)

5.2 รังสีทั้ง 4 ระดับ คือ 5, 10, 15 และ 20 Kr ไม่มีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง ยกเว้นรังสีระดับ 15 Kr เพียงทริทเมนต์เดียว โดยที่ความเข้มของรังสี 15 Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 16.87 % สำหรับผลของรังสีทั้ง 4 ระดับต่อพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองที่ขึ้นรา(PPMM) จะก่อให้เกิดการกลายทุกทริทเมนต์โดย

ที่ความเข้มข้นของรังสี 20 Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 12.40 % ถือว่ารังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายของมะขามทั้งพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง(PPM)และเปรี้ยวพื้นเมืองที่ขึ้นรา(PPMM)

6. กลุ่มเปรี้ยวยักษ์

6.1 เชื้อราที่มีผลก่อให้เกิดการกลายในมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์(PRY)

6.2 รังสีทั้ง 4 ระดับ คือ 5,10,15 และ 20Kr รังสีทุกระดับมีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ โดยที่ความเข้มข้นของรังสี 20Kr ก่อให้เกิดความแตกต่างสูงสุด 9.20 % สำหรับผลของรังสีทั้ง 4 ระดับต่อพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ขึ้นรา(PRYM)พบว่ารังสีทุกระดับไม่มีผลต่อการกลายของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ที่ติดเชื้อรา(PRYM)

วิจารณ์และเสนอแนะสำหรับการทดลองต่อไป

การทดลองเรื่องนี้มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์มะขามให้มีลักษณะต้านเชื้อรา โดยพยายามที่จะหาเหี่ยวต้านเชื้อราโดยดูลำดับเบสในยีน rbcL ทั้งจากต้นที่ติดเชื้อรา ต้านเชื้อรา และต้นที่ฉายรังสีแกมมาทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ด้วยรังสีที่มีความเข้มข้นต่างกันถึง 4 ระดับ จากมะขามทั้งพันธุ์ปลูกชนิดเปรี้ยวและชนิดหวาน ทั้ง 6 พันธุ์ปลูก พบว่ายีนต้านเชื้อราไม่น่าจะอยู่บนยีน rbcL ในคลอโรพลาสต์ จึงสมควรที่จะมีการศึกษาในยีนตัวอื่น ๆ ต่อไป

สำหรับการทดลองอิทธิพลของรังสีแกมมาในการก่อให้เกิดการกลายในพืชชนิดต่าง ๆ มีผู้สนใจศึกษาไว้ในพืชหลายชนิดเช่น ข้าว (*Oryza sativa* L.) [Hao-Wei Fu, You-Fa Li and Qing-Yao Shu, 2008], ข้าวสาลี (Hard wheat) [Mongi Melki and A. Marouani, 2010] และถั่ว Cowpea (*Vigna sinensis*) [Heba Ibrahim Mohamed, 2011] ซึ่งจากการทดลองทั้งหมดพบว่า รังสีแกมมา ก่อให้เกิด การกลายทั้งสิ้น โดยทำให้เกิดทั้งลักษณะด้อยพันธุ์ประสงค์ และลักษณะผิดปกติที่ไม่ต้องการ ซึ่งสามารถตรวจสอบพบได้ถึงระดับสารพันธุกรรมหรือลำดับเบสของยีน และตรวจจากผลของการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดในพืช ซึ่งอาจสร้างมากขึ้น น้อยลง หรือไม่สร้างเลย (A. D. Mehandjiev, G. N. Vassilev and V. A. Shevchenko, 2003) แต่ในการใช้รังสีแกมมาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชก็มีข้อควรระมัดระวัง คือ การใช้ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็อาจมีผลก่อให้เกิดการกลายของเชื้อจุลินทรีย์โรคพืชที่อยู่บนใบพืชไปด้วย ยิ่งทำให้เกิดการระบาดของจุลินทรีย์โรคพืชมากกว่าเดิม (Dmitriev, Shevchenko, Polischuk and Guscha, 2009)

จากการศึกษาของเบญจพร ศรีสุวรรณมาศและคณะใน พ.ศ. 2553 ซึ่งพบว่า มะขามติดเชื้อราสีขาวย (*Pestalotiopsis sydowiana*) ตั้งแต่ระยะเป็นดอก และยังพบอีกว่าเชื้อราที่พบในมะขามชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น Endophyte คือสามารถอยู่ในท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหารของต้นมะขามได้โดยไม่ทำลายมะขามให้ถึงตาย เมื่อใดที่ต้นมะขามแข็งแรงก็จะตรวจไม่พบ แต่เมื่อใดที่ต้นมะขามอ่อนแอและเชื้อราอยู่ในระยะสร้างสปอร์ ก็จะ สามารถตรวจพบเชื้อราได้ และบางทีอาจไม่มียีนที่ต้านเชื้อราในมะขาม ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มะขามให้มี สันฐานวิทยาและการเจริญที่ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อราอาจเป็นวิธีการที่ง่ายกว่า วิธีหนึ่งที่น่าจะติดตามดูผล จากการทดลองในที่นี่ คือ การเจริญของมะขามที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา 15 Kr ซึ่งพบว่า เมื่อมะขามมีอายุ 1 ปี จะมีลำต้นอ้วน เตี้ย ใบย่อยมีความยาวมากกว่าต้นควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้รูปร่างพุ่มก็แตกต่าง

ออกไป และเป็นทุกต้นในทรีทเมนต์เดียวกัน หากมะขามในทรีทเมนต์นี้กลายเป็นต้นแคระที่เก็บผลผลิตง่าย ตัดแต่งกิ่งตายและกิ่งที่ฉีกขาดติดเชื้อมีผลผลิตได้ง่าย แสงแดดส่องถึงพื้นดินได้ง่าย โคนต้นไม่หมักหมม จนเป็นที่เจริญของเชื้อรา และกลายเป็นพันธุ์ปลูกที่ออกดอกให้ผลผลิตในช่วงฤดูกาลที่ต่างไปจากเดิม ก็น่าจะได้ผลผลิตสูงขึ้น และไม่ติดเชื้อมะขาม เพราะสาเหตุหนึ่งของการเกิดเชื้อมะขามคือ ภาวะโลกร้อน เกิด climate change มีฝนตกหนักในเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นระยะที่ฝักมะขามเริ่มสุก ความชื้นจากน้ำฝนทำให้เชื้อมะขามในฝักมะขามที่มีน้ำตาลมากขึ้นในกระบวนการสุก (ripening) เกิดการเจริญถึงระยะสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เราพบเชื้อมะขามในฝักมะขามที่สวยงามไม่ร่องรอยขีดข่วนใด ๆ จากภายนอกได้นั่นเอง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์มะขามด้วยวิธีการฉายรังสีมะขามทั้งสวนแบบเดียวกับที่แก้ปัญหาเชื้อมะขามระบาดในญี่ปุ่น น่าจะได้รับการศึกษาทดลองต่อไป

.....

เอกสารอ้างอิง

- ธีรวรรณ ขันทอง.(ม.ป.พ.)Restriction Fragment Length Polymorphism สืบค้นเมื่อ 24 กุมภาพันธ์ 2553 จาก http://www.student.chula.ac.th/~49371019/restriction_fragment_length....
- เบญจพร ศรีสุวรรณ, จุติยา กองเกิน และณอม บุตตโคตร. 2544ก. การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานพันธุ์ประกายทอง ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ จังหวัดเพชรบูรณ์.
- เบญจพร ศรีสุวรรณ, 2544ข. การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานในหลอดแก้ว. เพชรบูรณ์: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.
- เบญจพร ศรีสุวรรณและจินตนา สนามชัยสกุล. 2552. ศึกษาช่วงเวลาของการติดเชื้อมะขามหวานและผลการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา สมุนไพรหมัก สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งเชื้อราจากมะขามหวาน(พันธุ์ประกายทอง)ในห้องปฏิบัติการ.เพชรบูรณ์: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.
- ปฎิภาณี ขันธโกศ. 2550. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประเมินทางเคมีของมะขามบางสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายที่ดี. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ. 2550. การศึกษาความหลากหลายของพืชโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายเทคนิคชีวเคมีขั้นสูง: การวิจัยทางเภสัชศาสตร์และการพัฒนายาใหม่, หน้า 47-65. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พริ้นท์.
- วิชัย บุญแสง, อัญชลี พัฒนাজร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์,นุสรา สิทธิดิษฐ์, และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2547. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- สุชาดา สุขห่อ. 2548. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 19: 75-85.
- ศวนิดา อัญจิระโรจน์ อัจฉริยา รังษิรุจิ และรัช ดอนสกุล.(2551).การโอท็อปและชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน(พืชสกุลมะขาม)ในจังหวัดเพชรบูรณ์.วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 24(1):183-198.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- Anon. 1976. *Tamarindus indica* L. In the wealth of India (Raw materials series) Vol.X, pp. 122-144. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research.
- Atienzar, F. A., and Jaha, A. N. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. Mutation Research. 613: 76-102.
- Baldwin, B. G., Anderson, J. M., Wojciechowski, M. F., Canopbell, C. S., and Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 247-277.
- Bell, C. D. 2004. Preliminary phylogeny of Valerianaceae (Dipsacales) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 31: 340-350.
- BhattacharMMa, P. K., Bal, S., and Mukherji, R. K. 1994. Studies on the characteristics of some products from tamarind (*Tamarindus indica* L.) kernels. Journal of Food Science and Technology (India) 31: 372-376.
- Chapman, K. R. 1984. Tamarind. In tropical tree fruits for Australia. Compiled by Page, P. E., in information series Q 183018, pp. 83-86. Brisbane: Queensland Department of Primary Industries.
- Corpet,F.1988.Multiplesequence alignment with hierarchical clustering Nucleic Acids Research 16:10881-10890
- Diallo, B.O., Jolly, H.I., McKey, D., Mckey, M.H., and Chevallier. 2007. Genetic diversity of *Tamarindus indica* populations: Any clues on the origin from its current distribution. American Journal of Biotechnology 6: 853-860.
- Dieffenbach, C. w., and Dveksler, G. S. 2003. PCR primer: Laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Doyle,J.J.and Doyle, J.L.(1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. Photochemical Bulletin 19:11-15
- Dmitriev A. Shevchenko O. Poloschuk V. and Guscha N. 2009.Effects of low dose chronic radiation and heavy metals on plants and their fungal and virus infections.Data Science Journal.8:br49-br66.
- Fu,Hao-Wei, Li,You-Fa,and Shu,Qing-Yao.2008.A revisit of mutation induction by gamma rays in rice (*Oryza sativa* L.) : implications of microsatalite markers for quality control. Mol Breeding.22:281-288.
- Gibbon, D., and Pain, A. 1985. Crop of Drier Regions of the Tropics. New York: Longman.

- Gunaseena, H. P. m., and Hughes, A. 2000. Tamarind: *Tamarindus indica* L. 1st ed. Wiltshire: Redwood books.
- Hasan, S. K., and Ijaz, S. 1972. Tamarind-A review. Science Industry (Karachi). 9: 131-137.
- Hall, T.A. 1990. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- Heba Ibrahim Mohamed. 2011. Molecular and Biochemical Studies on the Effect of Gamma Rays on Lead Toxicity in Cowpea (*Vigna sinensis*) Plants. Biol Trace Res. 144:1205-1218.
- Hershkovitz, M. A., and Zimmer, E. A. 1996. Conservation Patterns in angiosperm rDNA-ITS2. Nucleic Acids Research. 24: 2857-2867.
- International Centre for Underutilized Crops Institute of Irrigation and Development Studies, University of Southampton.. 2001. Tamarind: field manual for extension Workers.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gibson, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1998. Multiple Sequence Alignment with Cluster x. Trends in Biochemical Sciences. Southampton : International Centre for Underutilized Crops. 23:403-405.
- Kass, E., and Wink, M. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS1 and 2). Molecular Phylogenetics and Evolution .8: 65-88.
- Kulkarni, R. S., Gangaprasad, S., and Swamy, G.S. K. 1993. Tamarind: Economically an important minor forest produce. Minor Forest Products News. 3: 6.
- Lefevre, J. C. 1971. Review of the literature on the tamarind. Fruits 26: 687.
- Mehandjiev A.D., Vassilev G.N. and Shevchenko V.A. 2003. Synthesis of Some New Thiourea Derivatives and Their Influence on Biological and Genetic Effects of Gamma Rays. Russian Journal of Genetics. 39: 773-783. And Genetika. 39: 927-938.
- Mongi Melki, and Marouani, A. 2010. Effects of gamma rays irradiation on seed germination and growth of hard wheat. Environ Chem Lett. 8:307-310 .
- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1981. Biometry : the principles and practice of statistics in biological research. New York: W.H. Freeman and Company.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Method). Beta Version 4.0610. Seminar Associates. Sunderland, Massachusetts.
-

ภาคผนวก1

ตารางที่ผ1.1 การเปรียบเทียบลำดับเบสในยีน RbcLของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง 9 ทริทเมนต์จำนวน496bp
ชื่อพันธุ์ปลูก/ตำแหน่งที่

	10	20	30	40	50	60
PKT5	ATGATAAAAA	GAGGGCGAAT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKT10	ATGATAAAAA	GAGCTTGGT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKTM	ATGATAAAAA	GAGCGCGGAT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKTF2	ATGATAAAAA	GAGCGCGGGT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKT1	ATGATAAAAA	GAGCGCGAGT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKTF1	ATGATAAAAA	GAGCGCGAGT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKT20	ATGATAAAAA	GGCATCGAGT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKT0	ATGATAAAAA	GAGCGAGTGT	CTATCTGCAT	GCTACTTAGG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
PKT15	TTTCTATATA	AATCGGATAG	TTATCTGCAT	GCTATTAAAG	GGGATTCCCCG	CAAATACTAG
	* * *		*****	**** * *	*****	*****
	70	80	90	100	110	120
PKT5	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKT10	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKTM	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKTF2	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKT1	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKTF1	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKT20	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKT0	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCC	ATCGTGCAAT	GCTTATCGAT
PKT15	CTTGGTCATT	ATTGTCGGGA	TATGGTCTAC	TTCTTCACCTC	CTCGCATGCT	GCTTATCGAT
	*****	*****	*****	***** *	*** *	*****
	130	140	150	160	170	180
PKT5	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKT10	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKTM	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKTF2	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKT1	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKTF1	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKT20	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKT0	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
PKT15	AGACAGAAGA	ATCATGGTAT	GCATTTTCGT	GTACTAGCTA	AAGCGTTACG	TTTGTCTGGT
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	190	200	210	220	230	240
PKT5	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKT10	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKTM	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKTF2	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKT1	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKTF1	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKT20	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKT0	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
PKT15	GGAGATCATA	TTCACGCTGG	TACTGTAGTA	GGTAAACTGG	AAGGGGAAAG	AGAAATCACT
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	250	260	270	280	290	300
PKT5	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKT10	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKTM	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKTF2	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKT1	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKTF1	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKT20	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKT0	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
PKT15	TTAGGTTTTG	TTGATTTACT	ACGTGATGAT	TTTATTGAAA	AAGATCGAAG	CCGCGGTATT
	*****	*****	*****	*****	*****	*****

ชื่อพันธุ์ปลูก/ตำแหน่งที่

	310	320	330	340	350	360
PKT5	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKT10	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKTM	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKTF2	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKT1	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKTF1	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKT20	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKT0	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
PKT15	TATTTCACTC	AAGATTGGGT	CTCTCTACCG	GGTGTTCCTGC	CCGTTGCTTC	GGGAGGTATT
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	370	380	390	400	410	420
PKT5	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKT10	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKTM	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKTF2	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKT1	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKTF1	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKT20	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKT0	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGAT	GATTCCGTAC	TACATTTGGT	GGAGGAACCT
PKT15	CACGGGCATA	TGCCCTCTGA	CCGAGATGGA	GATTCCTGAC	TACATGTTGG	GATTGGCCCT
	*****	*****	*****	* *****	*****	* * * *
	430	440	450	460	470	480
PKT5	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKT10	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKTM	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKTF2	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKT1	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKTF1	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKT20	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKT0	TGGGACACCC	TTGGGGAAAT	GCACCCGGTG	CGTACTAATA	GTAGCTCTAG	AGCATGTGTC
PKT15	TGGGATAGAC	ATACCTAAAT	GCAAGCTGTA	TGGGATCCCA	ATAATCGTAG	GTCCAATCCC
	*****	* *****	*** * *	* * *	** ***	* * *
	490	496				
PKT5	AAGCTCGTAA	GGACGT				
PKT10	AAGCTCGTAA	GGACGA				
PKTM	AAGCTCGTAA	GGACGT				
PKTF2	AAGCTCGTAA	GGACGT				
PKT1	AAGCTCGTAA	GGACGT				
PKTF1	AAGCTCGTAA	GGACGT				
PKT20	AAGCTCGTAA	GGACGT				
PKT0	GAGCTCCCC	GGACGT				
PKT15	AAACACCTG	AGAAGT				
	* * *	** *				

- หมายเหตุ 1. เครื่องหมายดอกจันใต้ตัวอักษรที่เป็นลำดับเบส หมายถึงทุกเบสที่อยู่ในคอลัมน์ตำแหน่งเดียวกันนั้น เหมือนกันทุกประการ
2. ใต้คอลัมน์ที่ไม่มีเครื่องหมายใดกำกับ หมายถึง ในคอลัมน์นั้นมีเบสต่างกันตั้งแต่ 1 ตัวขึ้นไป

ตารางที่ ผ1.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง 9 ทรีทเมนต์
ด้วยโปรแกรมClustal W2 โดยเปรียบเทียบกับ มะขามที่มีอยู่ใน GenBank(PKT0)
(>gi|384591670|gb|JQ592063.1| *Tamarindus indica* voucher BioBot01310
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene,
partial cds; chloroplast) จำนวน 496 bp

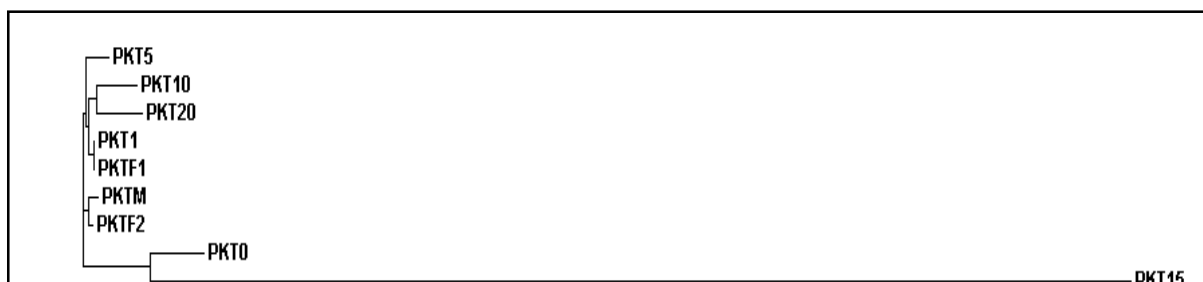
Scores Table

[View Output File](#)

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	PKT0	496	2	PKT1	496	98.19
1	PKT0	496	3	PKT5	496	97.78
1	PKT0	496	4	PKT10	496	97.78
1	PKT0	496	5	PKT15	496	87.1
1	PKT0	496	6	PKT20	496	97.98
1	PKT0	496	7	PKTF1	496	98.19
1	PKT0	496	8	PKTF2	496	98.19
1	PKT0	496	9	PKTM	496	97.98
2	PKT1	496	3	PKT5	496	99.6
2	PKT1	496	4	PKT10	496	99.19
2	PKT1	496	5	PKT15	496	86.9
2	PKT1	496	6	PKT20	496	99.6
2	PKT1	496	7	PKTF1	496	100.0
2	PKT1	496	8	PKTF2	496	99.8
2	PKT1	496	9	PKTM	496	99.6

3	PKT5	496	4	PKT10	496	99.19
3	PKT5	496	5	PKT15	496	86.29
3	PKT5	496	6	PKT20	496	99.19
3	PKT5	496	7	PKTF1	496	99.6
3	PKT5	496	8	PKTF2	496	99.4
3	PKT5	496	9	PKTM	496	99.6
4	PKT10	496	5	PKT15	496	86.29
4	PKT10	496	6	PKT20	496	99.19
4	PKT10	496	7	PKTF1	496	99.19
4	PKT10	496	8	PKTF2	496	99.19
4	PKT10	496	9	PKTM	496	99.4
5	PKT15	496	6	PKT20	496	87.1
5	PKT15	496	7	PKTF1	496	86.9
5	PKT15	496	8	PKTF2	496	86.9
5	PKT15	496	9	PKTM	496	86.9

6	PKT20	496	7	PKTF1	496	99.6
6	PKT20	496	8	PKTF2	496	99.4
6	PKT20	496	9	PKTM	496	99.19
7	PKTF1	496	8	PKTF2	496	99.8
7	PKTF1	496	9	PKTM	496	99.6
8	PKTF2	496	9	PKTM	496	99.8



แผนภูมิต้นไม้ แสดงวงศัวานวิวัฒนาการของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทองทั้ง 9 ทรีทเมนต์ของการทดลองนี้

ภาคผนวก 1.1

ตารางที่ ผ1.1.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง 8 ทรีทเมนต์ด้วยโปรแกรม Clustal W2 จำนวน 496 bp

Scores Table						
View Output File						
SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	PKT1	496	2	PKT5	496	99.6
1	PKT1	496	3	PKT10	496	99.19
1	PKT1	496	4	PKT15	496	86.9
1	PKT1	496	5	PKT20	496	99.6
1	PKT1	496	6	PKTF1	496	100.0
1	PKT1	496	7	PKTF2	496	99.8
1	PKT1	496	8	PKTM	496	99.6
2	PKT5	496	3	PKT10	496	99.19
2	PKT5	496	4	PKT15	496	86.29
2	PKT5	496	5	PKT20	496	99.19
2	PKT5	496	6	PKTF1	496	99.6
2	PKT5	496	7	PKTF2	496	99.4
2	PKT5	496	8	PKTM	496	99.6

3	PKT10	496	4	PKT15	496	86.29
3	PKT10	496	5	PKT20	496	99.19
3	PKT10	496	6	PKTF1	496	99.19
3	PKT10	496	7	PKTF2	496	99.19
3	PKT10	496	8	PKTM	496	99.4
4	PKT15	496	5	PKT20	496	87.1
4	PKT15	496	6	PKTF1	496	86.9
4	PKT15	496	7	PKTF2	496	86.9
4	PKT15	496	8	PKTM	496	86.9
5	PKT20	496	6	PKTF1	496	99.6
5	PKT20	496	7	PKTF2	496	99.4
5	PKT20	496	8	PKTM	496	99.19
6	PKTF1	496	7	PKTF2	496	99.8
6	PKTF1	496	8	PKTM	496	99.6
7	PKTF2	496	8	PKTM	496	99.8



แผนภูมิต้นไม้ แสดงวงศัวานวิวัฒนาการของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทองทั้ง 8 ทริทเมนต์ของการทดลองนี้

ตารางที่ ผ1.1.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของยีน rbcL ในมะขามพันธุ์ปลูก
 ปรกาศทอง 7 ทริทเมนต์เมื่อเทียบกับปรกาศทองต้นปกติ (PKT1) จำนวน 496 bp โดยใช้
 โปรแกรม BioEdit

	10203040506
PKT1	ATGATAAAAAGAGCGCGAGTCTATCTGCATGCTACTTAGGGGGATTCCCGCAAATACTAG
PKT5	G.....A.....
PKT10	TT.C.....
PKT15	T.TC..T.T.A.T..GATAGT.....T.A..
PKT20	GCAT.....
PKTF1	
PKTF2	G.....
PKTM	GA.....

	70809010011012
PKT1	CTTGGTCATTATTGTCGGGATATGGTCTACTTCTTCACCCATCGTGCAATGCTTATCGAT
PKT5	
PKT10	
PKT15	T.C...CATGC.....
PKT20	
PKTF1	
PKTF2	
PKTM	

	13014015016017018
PKT1	AGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGT
PKT5	
PKT10	
PKT15	
PKT20	
PKTF1	
PKTF2	
PKTM	

	19020021022023024
PKT1	GGAGATCATATTACGCTGGTACTGTAGTAGGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACT
PKT5	
PKT10	
PKT15	
PKT20	
PKTF1	
PKTF2	
PKTM	

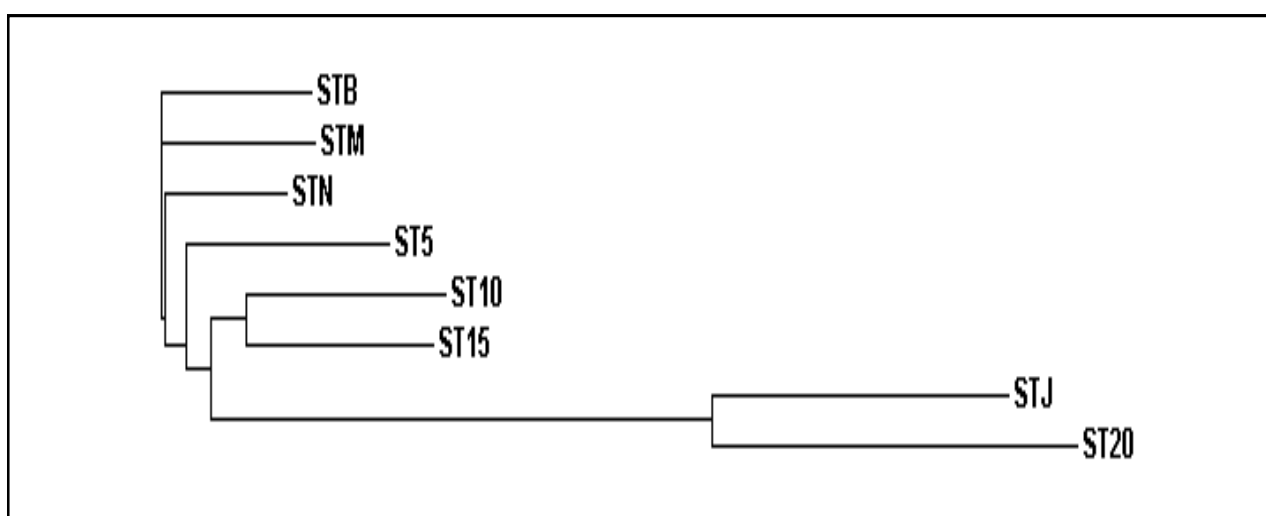
	250 260 270 280 290 300
PKT1	TTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATT
PKT5	
PKT10	
PKT15	
PKT20	
PKTF1	
PKTF2	
PKTM	
	310 320 330 340 350 360
PKT1	TATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATT
PKT5	
PKT10	
PKT15	
PKT20	
PKTF1	
PKTF2	
PKTM	
	370 380 390 400 410 420
PKT1	CACGGGCATATGCCCCCTGACCGAGATGATGATTCCGTACTACATTTGGTGGAGGAACCTT
PKT5	
PKT10	
PKT15	CT.....GA.GA.....G...G.ATT.GC.C.
PKT20	
PKTF1	
PKTF2	
PKTM	
	430 440 450 460 470 480 490
PKT1	TGGGACACCCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCTACTAATAGTAGCTCTAGAGCATGTGTCAAGCTCGTAAGGACGT
PKT5	
PKT10	A
PKT15	T.GA.A.ACCT.....AG.T..AT.GGA.CCC.A..ATCG...GT.CAA.CC...A.A.CCTGA..A..
PKT20	
PKTF1	
PKTF2	
PKTM	

ภาคผนวก 2

ตารางที่ ผ2.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลุกสีทอง 8 ทรีทเมนต์
จำนวน 549 bp ด้วยโปรแกรม Clustal W2

Scores Table						
View Output File						
SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	STN	549	2	STB	549	98.18
1	STN	549	3	STJ	549	93.62
1	STN	549	4	STM	549	98.18
1	STN	549	5	ST5	549	97.63
1	STN	549	6	ST10	549	97.45
1	STN	549	7	ST15	549	97.63
1	STN	549	8	ST20	549	93.26
2	STB	549	3	STJ	549	93.62
2	STB	549	4	STM	549	98.0
2	STB	549	5	ST5	549	97.45
2	STB	549	6	ST10	549	97.45
2	STB	549	7	ST15	549	98.54
2	STB	549	8	ST20	549	93.44

3	STJ	549	4	STM	549	93.08
3	STJ	549	5	ST5	549	93.08
3	STJ	549	6	ST10	549	93.08
3	STJ	549	7	ST15	549	93.62
3	STJ	549	8	ST20	549	95.63
4	STM	549	5	ST5	549	97.63
4	STM	549	6	ST10	549	97.09
4	STM	549	7	ST15	549	97.09
4	STM	549	8	ST20	549	92.71
5	ST5	549	6	ST10	549	96.72
5	ST5	549	7	ST15	549	97.45
5	ST5	549	8	ST20	549	92.71
6	ST10	549	7	ST15	549	97.45
6	ST10	549	8	ST20	549	92.53
7	ST15	549	8	ST20	549	92.71



แผนภูมิต้นไม้ แสดงวงศ์วานวิวัฒนาการของมะขามพันธุ์ปลูกสีทองทั้ง 8 ทรีทเมนต์ของการทดลองนี้

ตารางที่ ผ2.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของยีน rbcl ในมะขามพันธุ์ปลุก
 สีสทอง 8 ทริทเมนต์เมื่อเทียบกับสีทองหนัก(STN)จำนวน 549 bp โดยใช้โปรแกรม BioEdit

	10	20	30	40	50	60
STN	TTATGGGAAGAAATGATAAAAAAGAGGCGAGAGATGGGTCTATCGTAACTTAAGGGATTCA					
STB	.C.....AGAT.....					
STJ	.C.....ATTG...AAT...C.T.G....CG....C.G					
STM	.C.....A.....					
ST5	.C.....A.....					
ST10	.C.....TTC.GA....C.....					
ST15	.C.....ATC.....					
ST20	TT.GA..TGATCGT.G.GACT.....					

	70	80	90	100	110	120
STN	CATACTATTGGCTCATATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTCACATCCATCGTGCAATG					
STB						
STJ	C.....					
STM						
ST5						
ST10						
ST15						
ST20						

	130	140	150	160	170	180
STN	CATGCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCG					
STB						
STJ						
STM						
ST5						
ST10						
ST15						
ST20						

	190	200	210	220	230	24
STN	TTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAAACTGGAAGGG					
STB						
STJ						
STM						
ST5						
ST10						
ST15						
ST20						

	250	260	270	280	290	30
STN	GAAAGAGAAATCAGTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTATTGAAAAAGAT					
STB						
STJ						
STM						
ST5						
ST10						
ST15						
ST20						

	310	320	330	340	350	36
STN	CGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTTCTGCCCGTT					
STB						
STJ						
STM						
ST5						
ST10						
ST15						
ST20						

	370380390400410420
STN	GCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGAT
STB	
STJ	
STM	
ST5	
ST10	
ST15	
ST20	

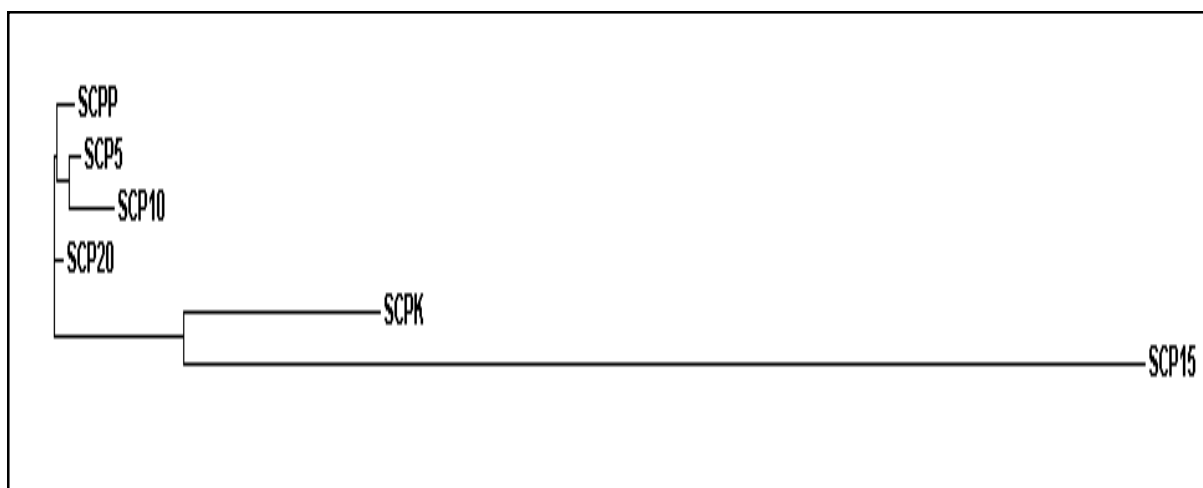
	430440450460470480
STN	TCCGTACTACAAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCGGTGCGA
STB	
STJ	
STM	
ST5	
ST10	
ST15	
ST20	

	490500510520530540
STN	GCATATAGCTCGAAGACAATCGTACGTGTTGCTCGTGAGATAAAAGCGAATGGACCGAATACCTGCTGC
STB	C.....G.....A.....TG.....
STJ	.T.....T...T..G.AA..GC.....T.G.TTCGG.G...A.....TG.....
STM	C.....AG..CTA.C.....G.....
ST5	TA.T.GATAGC.....TG.....
ST10	CCGA...AG.....T.....
ST15	G.....G.T...GCT.C...G.....T.....
ST20	.T..G.....T...T..G.AA..GC.....T.G.TTCCG.GC..A.....TG.....

ภาคผนวก 3

ตารางที่ ผ3.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภู 6 ทรีทเมนต์ด้วยโปรแกรมClustal W2 จำนวน 347 bp

Scores Table						
View Output File						
SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	SCPK	347	2	SCPP	347	84.73
1	SCPK	347	3	SCP5	347	84.15
1	SCPK	347	4	SCP10	347	82.71
1	SCPK	347	5	SCP15	347	55.91
1	SCPK	347	6	SCP20	347	85.88
2	SCPP	347	3	SCP5	347	99.14
2	SCPP	347	4	SCP10	347	96.83
2	SCPP	347	5	SCP15	347	53.6
2	SCPP	347	6	SCP20	347	98.85
3	SCP5	347	4	SCP10	347	97.12
3	SCP5	347	5	SCP15	347	53.89
3	SCP5	347	6	SCP20	347	98.27
4	SCP10	347	5	SCP15	347	53.31
4	SCP10	347	6	SCP20	347	96.83
5	SCP15	347	6	SCP20	347	53.31



แผนภูมิต้นไม้ แสดงวงศ์วานวิวัฒนาการของมะขามพันธุ์ปลุกศรีชมพูทั้ง 6 ทริทเมนต์ของการทดลองนี้

ตารางที่ ผ3.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของยีน *rbcl* ในมะขามพันธุ์ปลุกศรีชมพู 5 ทริทเมนต์เมื่อเทียบกับพันธุ์ปลุกศรีชมพูท้องถิ่น (SCPK) จำนวน 347 bp โดยใช้โปรแกรม BioEdit

	10	20	30	40	50	60
SCPK	AAAGCTGCTGATGCTGCTGCGAGTCCTGAATTAGCTGCTGCATTAGCTGCAGTCCTAATT					
SCPP	.G.ATCATG....ATT.T..T..A..AGC.A.AGC.T.A.G..T....GGA..A..T.C					
SCP5	.G.ATCATG....ATT.T..T..A..AGC.A.AGC.T.A.G..T....GGA..A..T.C					
SCP10	.G.ATCATG....ATT.T..T..A..AGC.A.AGC.T.A.G..T....GGA..A..T.C					
SCP15	TG..GC.AG....GCTA...C.CTT...C.CGCGCAT..TGCAGC...GGC..AAGGA.					
SCP20	.G.ATCATG....ATT.T..T..A..AGC.A.AGC.T.A.G..T....GGA..A..T.C					

	130	140	150	160	170	180
SCPK	GTTGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCT					
SCPP	.A.....					
SCP5	.A.....					
SCP10	.A.....					
SCP15	AACACCGG..GA....G..GAAA..A..TT.T.T....C.AGTA..A..A.CAA...T.T.					
SCP20	.A.....					

	190200210220230240
SCPK	CTACCGGGTGTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTG
SCPP	
SCP5	
SCP10	
SCP15	TCCT.A.T.TC...A..T.....C..A.TAACG..TG.TA.CC.TGC...ATTT.GTCT
SCP20	

	250260270280290300
SCPK	ACCGAGATCTTTGGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACTTTGGGACCTTGG
SCPP	
SCP5	
SCP10	G..C.....
SCP15	..ATT..G...GCAC.....G.GGAGTAC.T.CCAAAA....A.CTG.A....TG...A.
SCP20	

	0310320330340
SCPK	GGAAATGCACGGGCCTAATCGAGTAGCTCTAAGCTGTAAGCTCGTAA
SCPP	C.....AGG
SCP5	GT..A.GGG
SCP10	G..G.TC.....GT..AA..G
SCP15	.T.TGATT...A..TA.T..C.A.....T.T..T.CTT.C.A.G.
SCP20	

ภาคผนวก 3.1

ตารางที่ ผ3.1.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภู 5 ทริทเมนต์ ด้วยโปรแกรมClustal W2 จำนวน 347 bp โดยใช้พันธุ์ปลูกศรีชมภูท้องถิ่นปกติ(SCPP)เป็นหลักในการเปรียบเทียบกับทริทเมนต์ที่ได้รับการฉายรังสี 4 ระดับ(5,10,15 และ 20 Kr)

Scores Table						
View Output File						
SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	SCPP	347	2	SCP5	347	99.14
1	SCPP	347	3	SCP10	347	96.83
1	SCPP	347	4	SCP15	347	53.6
1	SCPP	347	5	SCP20	347	98.85
2	SCP5	347	3	SCP10	347	97.12
2	SCP5	347	4	SCP15	347	53.89
2	SCP5	347	5	SCP20	347	98.27
3	SCP10	347	4	SCP15	347	53.31
3	SCP10	347	5	SCP20	347	96.83
4	SCP15	347	5	SCP20	347	53.31

ตารางที่ ผ3.1.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของยีน rbcL ในมะขาม
พันธุ์ปลูกศรีชมภู 4 ทรีทเมนต์เมื่อเทียบกับพันธุ์ปลูกศรีชมภูท้องถิ่น (SCPP)
จำนวน 347 bp โดยใช้โปรแกรม BioEdit

SCPP	AGAAATCATGGATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGCTGGGATCATATTC
SCP5	
SCP10	
SCP15	T..GG.GA.....GC.AG..C.CTT.GA..CGC..A..GT.CAGC.....C...AGGAT
SCP20	
SCPP	AGGTACTGTAGTAGGTATGGAGGGGAAAGAGAAATCCAGGTTTGTGTTGATTTACTACGT
SCP5	
SCP10	
SCP15	.CA.T..CC.CC.T.AG.C..TCATC.....TCTG...G.A.AGCAAA.G.ACT.GGA.C
SCP20	
SCPP	GATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTC
SCP5	
SCP10	
SCP15	A.CACCGG..GA....G..GAAA..A..TT.T.T....C.AGTA..A..CAA...T.T.T
SCP20	
SCPP	CTACCGGGTGTTCGTGCCGTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTG
SCP5	
SCP10	
SCP15	TCCT.A.T.TC...A..T.....C..A.TAACG..TG.TA.CC.TGC...ATTT.GTCT
SCP20	
SCPP	ACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCTACTACAATTTGGTGGAGGAACCTTGGGACCTTGGG
SCP5	
SCP10	G..C.....
SCP15	..ATT..G..GCAC.....G.GGAGTAC.T.CCAAAA...A.CTG.A...TG...A..
SCP20	
SCPP	GGAAATGCACGGGCCCTAATCGAGTAGCTCTAAGCTGTCTCAGCTCGAGG
SCP5	AGT..A.G..
SCP10	G..G.TC.....AGT..AATA.
SCP15	.T.TGATT...A..TA.T..C.A.....T.T..T..TT.C.AT.A
SCP20	A.....TAA

ภาคผนวก 4

ตารางที่ ผ4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลูกชั้นดี 8 ทรีทเมนต์ด้วยโปรแกรมClustal W2 จำนวน 514 bp

Scores Table							
View Output File							
SeqA	◆ Name	◆ Length	◆ SeqB	◆ Name	◆ Length	◆ Score	◆
1	KTY	514	2	KTYM	514	99.03	
1	KTY	514	3	KTS	514	87.35	
1	KTY	514	4	KTSM	514	99.61	
1	KTY	514	5	KT5	514	98.25	
1	KTY	514	6	KT10	514	99.03	
1	KTY	514	7	KT15	514	99.22	
1	KTY	514	8	KT20	514	99.42	
2	KTYM	514	3	KTS	514	88.33	
2	KTYM	514	4	KTSM	514	99.03	
2	KTYM	514	5	KT5	514	97.67	
2	KTYM	514	6	KT10	514	98.44	
2	KTYM	514	7	KT15	514	98.64	
2	KTYM	514	8	KT20	514	98.83	

3	KTS	514	4	KTSM	514	87.35
3	KTS	514	5	KT5	514	86.77
3	KTS	514	6	KT10	514	87.35
3	KTS	514	7	KT15	514	87.35
3	KTS	514	8	KT20	514	87.16
4	KTSM	514	5	KT5	514	98.64
4	KTSM	514	6	KT10	514	99.03
4	KTSM	514	7	KT15	514	99.22
4	KTSM	514	8	KT20	514	99.42
5	KT5	514	6	KT10	514	99.22
5	KT5	514	7	KT15	514	98.44
5	KT5	514	8	KT20	514	98.44
6	KT10	514	7	KT15	514	98.64
6	KT10	514	8	KT20	514	99.22
7	KT15	514	8	KT20	514	99.03



แผนภูมิต้นไม้ แสดงวงศ์วานวิวัฒนาการของมะขามพันธุ์ปลูกชั้นดี 8 ทรีทเมนต์ของการทดลองนี้

ตารางที่ ผ 4.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของยีน rbcL ในมะขามพันธุ์ปลูก
 ชนิด 8 ทริทเมนต์เมื่อเทียบกับพันธุ์ปลูกชนิดหอยวก (KTY) จำนวน 514 bp โดยใช้
 โปรแกรม BioEdit

	10	20	30	40	50	60
KTY	TCATGGGAAGAAATGATAAAAAAGAGGAGCAGGATGGTCTATCGTTGCATGCTACTTAAGGGG					
KTYM	G..AGA..T.....					
KTS	C.....C...AAG.....CG.G..AGAT..TCC...A.....C					
KTSM	G.....C.....					
KT5	GCT..G.A...C.....					
KT10	G.A.....					
KT15	G.AT.G.....					
KT20	GGA.....					

	70	80	90	100	110	120
KTY	GGATTTCACGC AAAATACTAGCTTGGCTCATTATGGGATATGGTCTACTTCTTCACTCGTGC					
KTYM						
KTS	TAT...G.....C.....					
KTSM						
KT5						
KT10						
KT15						
KT20						

	130	140	150	160	170	180
KTY	AATGCATCGATACAGAAGATGGTATGCA TTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGT					
KTYM						
KTS	TG.....G.....T.G.....					
KTSM						
KT5						
KT10						
KT15						
KT20						

	190200210220230240
KTY	CTGGTGGAGATCATATTCCACGCTGGTACTGTAGTAGGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAA
KTYM	
KTS	
KTSM	
KT5	
KT10	
KT15	
KT20	

	250260270280290300
KTY	TCACCTTAGGTTTGTGATTACTACGTGATGATTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGG
KTYM	
KTS	
KTSM	
KT5	
KT10	
KT15	
KT20	

	310320330340350360
KTY	TATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGG
KTYM	
KTS	
KTSM	
KT5	
KT10	
KT15	
KT20	

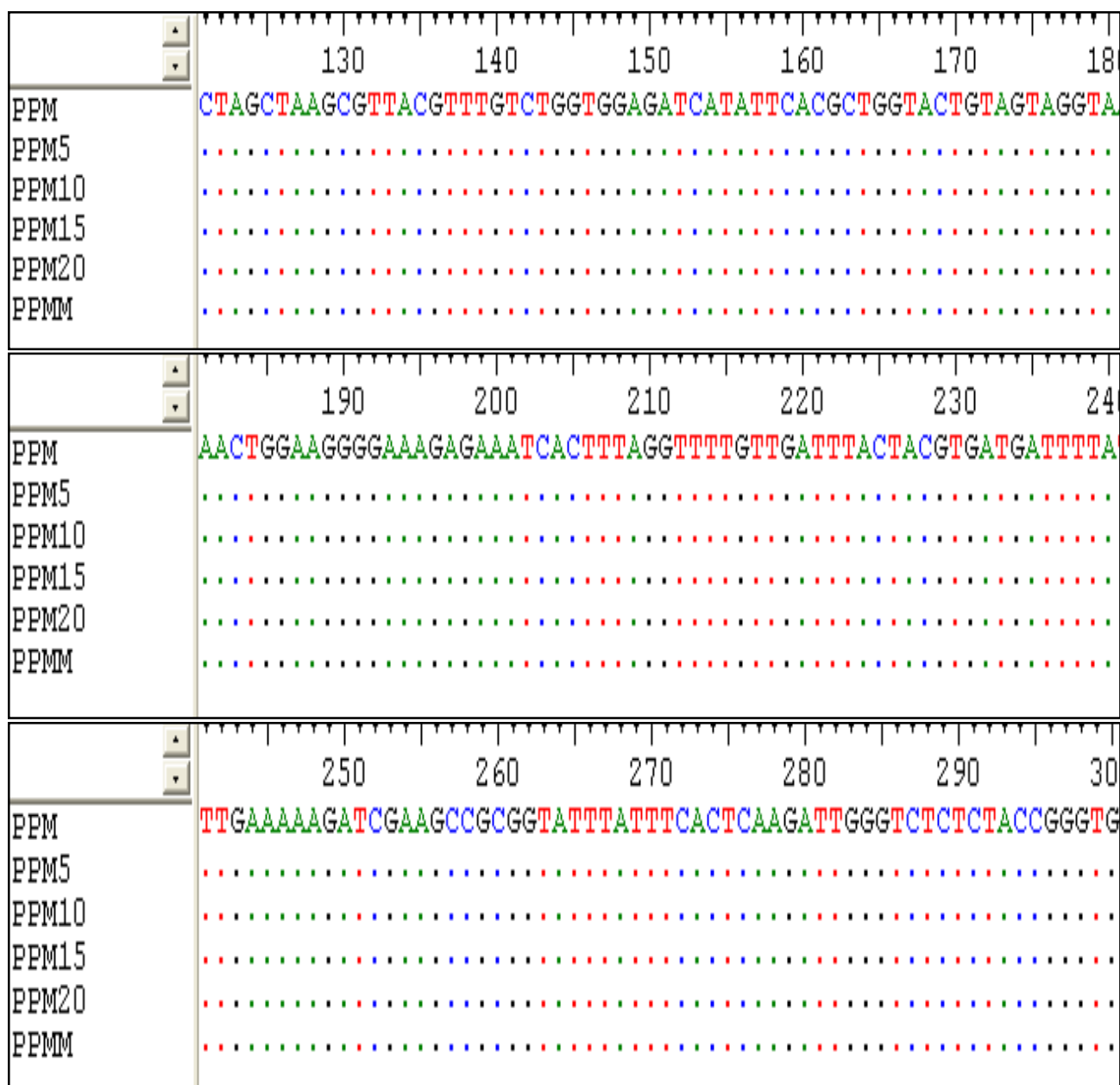
	370	380	390	400	410	42
KTY	TATTCACGTTTGGC	ATATGCCCGCTCTG	ACCGAGATCTTTGG	AGAGATTCCGTACT	ACAA	
KTYM						
KTS						
KTSM						
KT5						
KT10						
KT15						
KT20						

	0	430	440	450	460	470	480	490	500	510
KTY	TTGGTGGAGGATGGG	CCTTGGGGAAATGC	CACCGCCGTAGCTA	ATCGAGTAGCTCTA	GAAAGCATGTGTAC	AAGCTCGTAAGGGA	CGTGTGCTGG			
KTYM										
KTS		CC.....	GA.G...A.A.C.A.	AT.GCA...G..TGG	GTGA.CCTT.G.TAT	ATG...CAA.AA....				
KTSM										
KT5								GA..G.		
KT10								GA..G.		
KT15										
KT20										

ภาคผนวก 5

ตารางที่ ผ5.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง 6 ทรีทเมนต์ด้วยโปรแกรมClustal W2 จำนวน 492 bp

Scores Table						
View Output File						
SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	PPM	492	2	PPM5	492	97.97
1	PPM	492	3	PPM10	492	96.95
1	PPM	492	4	PPM15	492	83.13
1	PPM	492	5	PPM20	492	96.75
1	PPM	492	6	PPMM	492	97.15
2	PPM5	492	3	PPM10	492	95.93
2	PPM5	492	4	PPM15	492	83.13
2	PPM5	492	5	PPM20	492	95.12
2	PPM5	492	6	PPMM	492	95.53
3	PPM10	492	4	PPM15	492	84.96
3	PPM10	492	5	PPM20	492	97.97
3	PPM10	492	6	PPMM	492	98.37
4	PPM15	492	5	PPM20	492	86.18
4	PPM15	492	6	PPMM	492	85.57
5	PPM20	492	6	PPMM	492	99.59



	31032033034035036
PPM	TTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCT
PPM5	
PPM10	
PPM15	
PPM20	
PPMM	

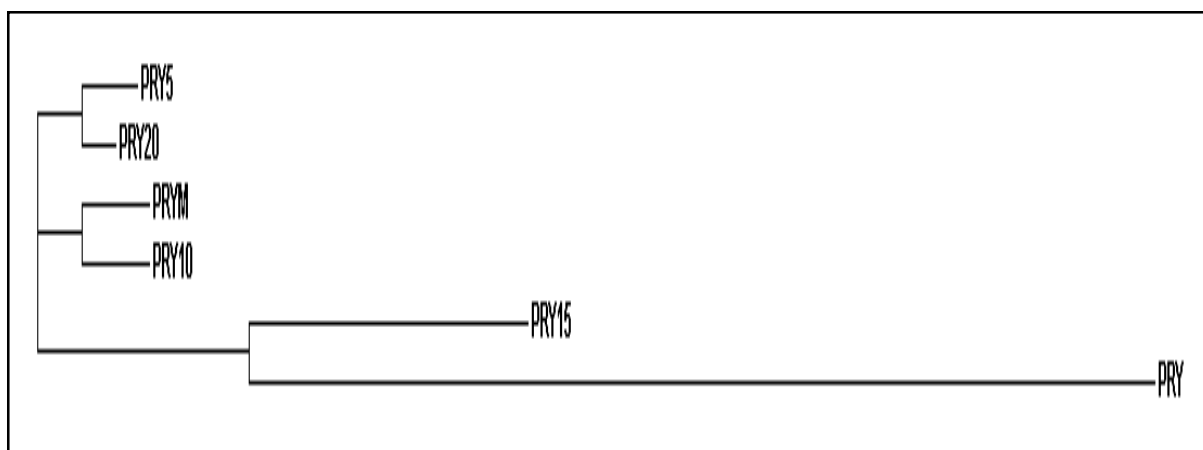
	37038039040041042
PPM	TTGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGGTGGAGGAACCTGGACACCCTTGGGGAAATGCAC
PPM5	
PPM10	
PPM15	G.C..AA..AC.TGCA..TT
PPM20	
PPMM	

	0430440450460470480490
PPM	CCGGTGCCGTATAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTTACAAGCTCGTAAGGGACGTGTGGAGGGAAGATTCC
PPM5	T.....CTC.TGG.T.AAT
PPM10	T.....T.T..A.A.
PPM15	.GA..C.T.A...GCT.GC..CTG..G..GTTGAA...TG...A.CTG.A.T.C.A.A.CT.CGCAT.G.A
PPM20	TAA...ATA...
PPMM	TAA...ATA...

ภาคผนวก 6

ตารางที่ 6.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน(% Identity)ของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ 6 ทริทเมนต์ด้วยโปรแกรมClustal W2 จำนวน 511 bp

Scores Table						
View Output File						
SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	PRY	511	2	PRY5	511	91.0
1	PRY	511	3	PRY10	511	91.19
1	PRY	511	4	PRY15	511	91.0
1	PRY	511	5	PRY20	511	90.8
1	PRY	511	6	PRYM	511	91.0
2	PRY5	511	3	PRY10	511	98.83
2	PRY5	511	4	PRY15	511	94.91
2	PRY5	511	5	PRY20	511	99.22
2	PRY5	511	6	PRYM	511	98.63
3	PRY10	511	4	PRY15	511	95.5
3	PRY10	511	5	PRY20	511	99.02
3	PRY10	511	6	PRYM	511	98.83
4	PRY15	511	5	PRY20	511	94.91
4	PRY15	511	6	PRYM	511	95.5
5	PRY20	511	6	PRYM	511	99.22



แผนภูมิต้นไม้ แสดงวงศ์วานวิวัฒนาการของมะขามเปรี้ยวยักษ์ทั้ง 6 ทริทเมนต์ของการทดลองนี้

ตารางที่ ผ6.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของยีน *rbcl* ในมะขามพันธุ์ปลูก
เปรี้ยวพื้นเมือง 6 ทริทเมนต์เมื่อเทียบกับพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมืองปกติ (PPM) จำนวน 511 bp โดยใช้
โปรแกรม BioEdit

	10	20	30	40	50	60
PRY	ATGGGAAAAATGATAAAAAGCTGTTTTGCGAGATTGGGTCCTCCTCTCGGGGGATTCCGC					
PRY5	GA..GC.A.....GTT.AA.A....GA.T.A.					
PRY10	AG...GCGA.....GTT.AA.A....GA.T.A.					
PRY15	G.....A...GTTG.A.TTC..GA.T...					
PRY20	GA..GC.A.....GTT.AA.A....GA.T.A.					
PRYM	GA..GCG.....GTT.AA.A....GA.T.A.					

	70	80	90	100	110	120
PRY	ATACTACTTGGATTTGTGGGAATGGTCTACTTCTTCCCCGGCATAGTTTCAAAGAGAAATT					
PRY5	C.G.AT.....A.ATC.....G.GA.....C					
PRY10	C.G.AT.....A.ATC.....G.GA.....C					
PRY15	C.G.AT.....A.ATC.....G.GA.....C					
PRY20	C.G.AT.....A.ATC.....G.GA.....C					
PRYM	C.G.AT.....A.ATC.....G.GA.....C					

	130140150160170180
PRY	GGTGCATTTCTGTACTAGCTAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGT
PRY5	AA.....T.....
PRY10	AA.....T.....
PRY15	AA.....T.....
PRY20	AA.....T.....
PRYM	AA.....T.....
	190200210220230240
PRY	ACTGTAGTAGGTAAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTACTA
PRY5	
PRY10	
PRY15	
PRY20	
PRYM	
	250260270280290300
PRY	CGTGATGATTTTATTGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTC
PRY5	
PRY10	
PRY15	
PRY20	
PRYM	
	310320330340350360
PRY	TCTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCT
PRY5	
PRY10	
PRY15	
PRY20	
PRYM	

	370380390400410420
PRY	CTGACCGAGATCTTTGGAGAGATCCGTACTACAAATTGGTGGAGGAACTTGGGACACCCTG
PRY5	AT.....
PRY10	AT.....
PRY15	AT.....
PRY20	AT.....
PRYM	AT.....

	430440450460470480490500510
PRY	GGGAAATCACC CGGTACTATAGTAGCTAGCATGTCAAGTCTAGGATGACTGCTGGAGAGACCCGCAAAACCTGATTTTAAC TGCTGCAA
PRY5	GCTC.....CTCGTA...TC...T.A.TT..G.A...GT.CTGAA...G.....
PRY10	GCTC.....CTCGTA...TC...T.A.T..G.GG..GT.CTGAA...G.....
PRY15	G.TC.....A.....GTCTA.TAG...T....TTA.T..GG..C..GT.CTGAA...G.....
PRY20	GCTC.....CTCGTA...TC...T.A.T..GATG..GT.CTGAA...G.....
PRYM	GCTC.....CTCGTA...TC...T.A.T..GAGGTGGT.CTGAA...G.....

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ (ทำงาน 70%)

1. ชื่อ และนามสกุล (ภาษาไทย) รศ. ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ
(ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. DR.BENCHAPORN SRISUVORAMAS
2. เลขประจำตัวนักวิจัย 46040252 เลขประจำตัวประชาชน 3-1016-00210-78-7
3. ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
4. การศึกษาสูงสุด Ph.D สาขาวิชา Horticulture (spect. in Tissue Culture and Genetics)
มหาวิทยาลัย UP LOSBANOS ปีที่จบ พ.ศ.2542
5. สถานที่ติดต่อ
ที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์
รหัสไปรษณีย์ 67000 โทรศัพท์ 0-5671- 7100 ต่อ 1706 โทรสาร 0-5671-7110
ที่อยู่ บ้านพักอาจารย์ภายในบริเวณ ม.ราชภัฏเพชรบูรณ์ โทรศัพท์ 0-5673- 7151, 08-4050-9640
6. งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว โดยเป็นหัวหน้าโครงการทุกรายการ
เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ สุวิทย์ วรรณศรี เสาวภา ชูมณี สนธยา พิงศิริ จีระศักดิ์ ทัพพา ญัฐวีร์
ยาศิริ จรุงจิตร ทัพพา และ ศิริชัย แก้วกองพล. 2553. ผลของสารสกัดจาก
เถาวัลย์เปรียง [*Derris scandens* (Roxb) Benth.] ที่มีต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes
aegypti*) และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยการมีส่วนร่วมของชุมชนในจังหวัดเพชรบูรณ์
เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุน
งบประมาณแผ่นดิน โดยผ่านการคัดเลือกจาก วช.ประจำปี 2553
เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และจินตนา สนามชัยสกุล.2552. ศึกษาช่วงเวลาการติดเชื้อราและผลของเชื้อรา
ไตรโคเดอร์มา สารสกัดสมุนไพร สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ ที่มีต่อเชื้อราจาก
มะขามหวานพันธุ์ประกายทองในห้องปฏิบัติการ. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏ
เพชรบูรณ์ ประจำปีการศึกษา 2552.
เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาดุลย์ จงรักษ์ นิคม จันทรมังกร และอนุพงษ์ ทิมอุบล. 2552. ฤทธิ์ต้าน
จุลินทรีย์และต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรพญาวาน (ฮวานจ็อก) Proceeding.งาน
ประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 โรงแรมเดอะ
ไทด์ รีสอร์ท (หาดบางแสน)จังหวัดชลบุรี 15-17 ตุลาคม 2552
เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาดุลย์ จงรักษ์ ประยูร ลิ้มสุข และ กฤษณ์พนธ์ พรรณรัตนชัย. 2551.
The production of high nutritive *Amaranthus* spp. by hydroponic
method for the business protocol.Proceeding . ในงานประชุมวิชาการ
นานาชาติ The International Workshop and Symposium on Science and

Technology 2008(I-SEEC 2008) 15-16 ธันวาคม 2551 ณ โรงแรมรอยัลแมงโก
หนองคาย ประเทศไทย

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2551.การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรพญาวานรโดยการมีส่วนร่วมของผู้ใช้

สมุนไพร เพชรบูรณ์:คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ทุนสถาบันวิจัยและพัฒนาประจำปี 2551 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, อาตุลย์ จงรักษ์, ประยูร ลิ้มสุข และ กฤษณ์พนธ์ พรณรัตน์ชัย .2550. ศึกษา

การผลิตผักโขมที่ปราศจากสารก่อเนื้องอก(แคลเซียมออกซาเลต) โดยวิธีไฮโดร โพนิกส์

เพื่อเป็นต้นแบบไปสู่ภาคธุรกิจ เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนงบประมาณแผ่นดินโดยผ่านการพิจารณาจาก วช. 2550

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2549. การศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสับดูต้าโดยเทคนิคการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฝังตัวอย่างในพาร์ฟฟิน. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และ

เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและ

พัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2549

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2548.คุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแคลสผักโขมหนามที่

ปราศจากสารก่อเนื้องอก. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย

ราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2547. ศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแคลสในผักโขม 3 ชนิด

(ผักโขมจีน, ผักโขมหนามและผักโขมหัด) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.

ISBN 974-7479-83-4 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย

ราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏ

เพชรบูรณ์ประจำปี 2547

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2546.ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นแฮพลอยด์(n)จากอับละอองเรณูของ

ช่อนกลีน. ISBN 974-7479-62-1 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2546

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2545. การศึกษาคุณค่าทางอาหารของแคลสจากมะขามหวาน 4 สาย

พันธุ์ (ประกายทอง, สีทอง, ศรีชมภู และขันตี). ISBN 974-7479-50-8

เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.ทุนอุดหนุนการ

วิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2545

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และคณะ. 2545. ศึกษาการเพาะเมล็ดแก้วมังกรด้วยเทคนิค Embryo

Rescue. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ. 2544. การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานใน

หลุดแก้ว. ISBN 974-7479-44-3 เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์. ประจำปี 2544

เบญจพร ศรีสุวรรณ. 2526.ความผิดปกติของโครโมโซมในลิมโฟไซต์ของคนเนื่องมาจากวิตามินซี.

วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในแคลลัสจากมะขามหวาน 3 สายพันธุ์ (สีทอง,

ประกายทอง และขันตี). เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบัน

ราชภัฏเพชรบูรณ์

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

7. ตำรา/เอกสารประกอบการสอน

รายวิชา: พันธุศาสตร์ ISBN 974-7479-45-1

ชีววิทยาของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ไมโครเทคนิค

จุลชีววิทยา

วิทยาศาสตร์เพื่อคุณภาพชีวิต

วิทยาศาสตร์ในชีวิตประจำวัน

ประวัติผู้วิจัยร่วม 1 (ทำงาน 10 %)

1.ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สนามชัยสกุล

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Chintana Snamchaikul

2.เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 6701 00168 13 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์

อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์,โทรสาร 0-5671-7151 มือถือ 08 – 1038 - 0386 e-mail : Chintana_kai@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

วท.บ. (เกษตรศาสตร์) เอกพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วท.ม. (เกษตรศาสตร์) เอกกีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

การวิจัยเชิงคุณภาพ สาขาสังคมศาสตร์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.1.1 ชุดโครงการวิจัยและพัฒนารูปแบบเครือข่ายวิสาหกิจชุมชน ฝ้ายทอเพื่อการพึ่งตนเองอย่างยั่งยืน เขตภาคเหนือตอนล่าง

7.1.2 การพัฒนาเครือข่ายความร่วมมือของภาครัฐและเอกชน เพื่อพัฒนาวิสาหกิจชุมชนผลิตภัณฑ์มะขามหวาน จังหวัดเพชรบูรณ์

7.1.3 การสืบสานวัฒนธรรมไทยลุ่ม เพื่อพัฒนาเศรษฐกิจชุมชน และส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงวัฒนธรรม อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 ความอุดมสมบูรณ์ของดินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของหม่อนที่ปลูกบนพื้นที่สูงเขาค้อ

7.2.2 การศึกษาชนิดและฤดูกาลระบาดของแมลงศัตรูมะขามหวาน

7.2.3 ผลของสารไคติน - ไคโตซาน และสมุนไพรบางชนิดที่มีต่อการเกิดเชื้อราในมะขามหวานพันธุ์ประกายทอง

7.2.4 ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษามะขามหวานพันธุ์ประกายทอง พันธุ์สีทอง และพันธุ์ศรีชมพู

7.2.5 ผลของสารสกัดจากสะเดาใบยาสูบที่มีต่อการควบคุมหนอนคืบละหุ่ง ศัตรูมะขามหวาน

7.2.6 ศึกษาองค์ความรู้จังหวัดเพชรบูรณ์

7.2.7 การศึกษาปัญหาและความต้องการของเกษตรกรผู้ปลูกมะขามหวาน

7.2.8 การสำรวจปัญหาและความต้องการของเกษตรกรจากองค์กรของรัฐ

7.2.9 การศึกษาวิธีการเพิ่มผลผลิตของมะขามหวานพันธุ์สีทอง

7.2.10 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่มีต่อหนอนคืบละหุ่งในห้องปฏิบัติการและในสวนมะขามหวาน

7.2.11 ผลการใช้สารจับใบและปุ๋ยทางใบบางชนิดต่อการเพิ่มผลผลิตของมะขามหวานพันธุ์สีทอง พันธุ์ประกายทอง และพันธุ์ศรีชมพู

7.2.12 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเชื้อราบนฝักมะขามหวานต่อลักษณะทางกายภาพและคุณภาพ การศึกษาสาเหตุและการป้องกันกำจัดเชื้อราจากเกษตรกร

7.2.13 การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากไผ่ของหมู่บ้านเหมืองแบ่ง อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์

7.2.14 การทดลองปลูกดาวเรืองเพื่อใช้เป็นพืชอุตสาหกรรมในจังหวัดเพชรบูรณ์

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

7.3.1 การวิจัยและพัฒนาารูปแบบวิสาหกิจชุมชนผลิตภัณฑ์มะขามหวานเพื่อการพึ่งตนเองอย่างยั่งยืน จังหวัดเพชรบูรณ์ ปี 2550 แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

7.3.2 การศึกษารูปแบบเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนผ้าทอ เพื่อการพึ่งตนเองอย่างยั่งยืน เขตภาคเหนือตอนล่าง ปี 2549 แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

7.3.3 การมีส่วนร่วมของสหภาคีระหว่างภาครัฐและเอกชนในการพัฒนาเพื่อความยั่งยืนของ กลุ่มวิสาหกิจชุมชนผลิตภัณฑ์มะขามจังหวัดเพชรบูรณ์ปี 2549แหล่งทุนจากผู้ว่า CEO

7.3.4 การพัฒนาเครือข่ายความร่วมมือของภาครัฐและเอกชนเพื่อพัฒนาวิสาหกิจชุมชนผลิตภัณฑ์มะขามหวาน จังหวัดเพชรบูรณ์ ปี 2550 แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

7.3.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวใหม่ชาวไทยภูเขาเผ่าม้ง เพื่อการท่องเที่ยว บ้านเช็กน้อย ตำบลเช็กน้อย อำเภอเขาค้อ จังหวัด เพชรบูรณ์ ปี 2550 แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

7.3.6 การศึกษาระบบนิเวศและการปลูกกล้วยเลียนแบบธรรมชาติ ปี 2550 แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

7.4.1 การสืบสานและอนุรักษ์วัฒนธรรมพื้นบ้านไทหล่ม เพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจชุมชนและการท่องเที่ยวเชิงวัฒนธรรมของชุมชนอำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ ปี 2551 แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ลุล่วงแล้ว 80%

7.4.2 การสืบค้นตำนานหลวงพ่โหว่ใหญ่วัดตาลและศาลเจ้าพ่อในชุมชนอำเภอหล่มเก่าเพื่อการสืบสานฟื้นฟูวัฒนธรรมพื้นบ้านและส่งเสริมการท่องเที่ยว ปี 2551 แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ลุล่วงแล้ว 80%

7.4.3 การพัฒนาคุณภาพมะขามหวานโดยการป้องกันกำจัดเชื้อราตามแนวเศรษฐกิจพอเพียงด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่นของชุมชนบ้านซับแล่ง ตำบลยางงาม ตำบลหนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์ แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ลุล่วงแล้ว 80%

7.4.4 การพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตทางการเกษตรเพื่อการพึ่งพาตนเองของเกษตรกรบ้านป่าบง ตำบลตะบะ อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์
แหล่งทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ล่วงแล้ว 80%

ประวัติผู้วิจัยร่วม 2 (ทำงาน 10 %)

1.ชื่อ-ชื่อสกุล : (ภาษาไทย) นายสมพงษ์ แสนเสนยา

(ภาษาอังกฤษ) Mr.Sompong Sansenya

2.เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 4501 00582 48 7

3. วันเดือนปีเกิด : 21 กรกฎาคม 2525

4. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี : วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ เมื่อ พ.ศ. 2548

ปริญญาโท : วท.ม. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา เมื่อ พ.ศ. 2552

ปริญญาเอก : พร.ด. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา เมื่อ พ.ศ. 2556

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระหว่างประเทศ

1. Sansenya, S., Maneesan, J, and Ketudat Cairns, J.R. (2012). Exchanging a single amino acid residue generates or weakens a +2 cellobiosaccharide binding subsite in rice β -glucosidase. *Carbohydrate Research*. 351,130-133.
2. Sansenya, S., Opassiri, R., Kuaprasert, B., Chen. C.J. and Ketudat Cairns, J.R. (2011). The crystal structure of rice (*Oryza sativa* L.) Os4BGlu12, an oligosaccharide and tuberonic acid glucoside-hydrolyzing β -glucosidase with significant thioglucosidase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 510, 62-72.
3. Sansenya, S., Ketudat Cairns, J.R, and Opassiri, R. (2010). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of rice (*Oryza sativa* L.) Os4BGlu12 β -glucosidase. *Acta. Cryst F66*. 320-323-801.
4. Ketudat Cairns, J.R., Pengthaisong S., Luang S., Sansenya S., Tankrathok, A. and Svasti J. (2012). Protein-carbohydrate interactions leading to hydrolysis and transglycosylation in plant glycoside hydrolase family 1 enzyme. *J. Appl. Glycosci.* 59, 51-62.

5. Himeno, N., Saburi, W., Wakuta, S., Takeda, R., Matsuura, H., Nabeta, K., **Sanssenya, S.**, Ketudat Cairns, J.R., Mori, H., Imai, Ryozi., and Matsui, H. (2013). Identification of rice β -glucosidase with high hydrolytic activity towards salicylic acid β -D-glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77 (5), 120889-1-6.
6. Hua, Y., **Sanssenya, S.**, Saetang, C., Wakuta, S., and Ketudat Cairns, J.R. (2013). Structural and enzymatic characterization of Os3BGlu6 and its mutants hydrolyzing gibberellin glucosyl ester to release free Gibberellin GA₄. *Arch. Biochem. Biophys.* 537, 39-48.
7. **Sanssenya, S.**, Wakuta, S., Matsui, H. and Ketudat Cairns, J.R. (2013). The structure basis of natural substrate binding in rice Os4BGlu12 β -glucosidase. (Manuscript in preparation).

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ

1. **Sanssenya, S.**, Janjira Maneesan and Ketudat Cairns, J.R. The effect of a single residue on +2 subsite binding of oligosaccharides by rice Os3BGlu6, Os3BGlu7 and Os4BGlu12 β -glucosidase. 6th Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, 30 August-2 September, 2011.
2. **Sanssenya, S.**, Opassiri, R., and Ketudat Cairns, J.R. The crystal structure of Os4BGlu12, a rice β -glucosidase with significant thioglucosidase activity. 5th Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010.
3. **Sanssenya, S.**, Ketudat Cairns, J.R., and Opassiri, R. Structure determination of rice Os4BGlu12 β -glucosidase with and without G2F inhibitor. 4th Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, September 26-28, 2009.
4. **Sanssenya, S.**, Ketudat Cairns, J.R., and Opassiri, R. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of β -glucosidase from rice (*Oryza sativa* L.). 3rd Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, August 28-29, 2008.

ประสบการณ์ในการทำวิจัยในต่างประเทศ

หัวข้อวิจัย “Expression, purification, crystallization and X-ray diffraction for structure determination of plant β -glycosidase” ที่ Prof. Dr. Genji Kurisu Lab. Department

of Macromolecular Science, Osaka University. Japan ระหว่างวันที่ 14 มกราคม-15 พฤษภาคม 2013.

หัวข้อวิจัย “Expression, purification, crystallization and X-ray diffraction of rice β -glucosidase (Os4BGlu12)” ที่ Assoc. Prof. Dr. Chun-Jung Chen Lab. National Synchrotron Radiation Research Center (NSRRC), Taiwan ระหว่างวันที่ 13 เมษายน-13 พฤษภาคม 2008.

ประวัติผู้วิจัยร่วม 3 (ทำงาน 10 %)

1. ชื่อ - สกุล(ภาษาไทย) นายเทพ เพี้ยมะลั่ง
2. ชื่อ - สกุล(ภาษาอังกฤษ) Mr. Tep Piamalang
3. เลขที่บัตรประชาชน 3 6705 00964 61 0
4. ตำแหน่งปัจจุบัน เจ้าหน้าที่ปฏิบัติการพืชสวน
5. หน่วยงานที่สังกัด คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
6. ประวัติการศึกษา

สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ คบ. เกษตรกรรม (2542)

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ วทม. การจัดการการเกษตร (กำลังศึกษา)

7. ระบุสาขาวิชาที่ชำนาญพิเศษ พืชไร่, พืชสวน – ออกแบบภูมิทัศน์

8. ผลงานวิจัย

- 8.1 การศึกษาการเก็บมะขามหวานพันธุ์ต่างๆ ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสม(ผู้ร่วมวิจัย)
- 8.2 โครงการทดลองการปลูกดอกดาวเรืองเพื่อเป็นไม้ดอกอุตสาหกรรม(ผู้ร่วมวิจัย)
- 8.3 การศึกษาระบบนิเวศน์การเจริญเติบโตและผลผลิตของกลอยในแปลงปลูกเลียนแบบธรรมชาติ (ผู้ร่วมวิจัย)
- 8.4 การสำรวจพันธุ์มะขามป้อมเพื่อหาพันธุ์ที่คุณค่าทางอาหารสูง (ผู้ร่วมวิจัย)
- 8.5 ศึกษาการทำข้าวใหม่มัดบ้านเข็ญน้อย อำเภอเขาค้อ (ผู้ร่วมวิจัย)
- 8.6 การจัดการผลิตภัณฑ์ชุมชนจังหวัดเพชรบูรณ์ (ผู้ร่วมวิจัย)
- 8.7 ผู้ช่วยนักวิจัยการพัฒนาศักยภาพของสมุนไพรในเชิงการค้าของชาวเขา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์
- 8.8 ผู้ช่วยนักวิจัยการพัฒนาตลาดกลางมะขามหวานจังหวัดเพชรบูรณ์
- 8.9 ผู้ช่วยนักวิจัยการพัฒนาธุรกิจท่องเที่ยวเชิงวัฒนธรรมเพื่อการพึ่งพาตัวเองอย่างยั่งยืน
- 8.10 ผู้ช่วยนักวิจัยการวิจัยเชิงบูรณาการเพื่อพัฒนาไปสู่ชุมชนแห่งความพอเพียงของหมู่บ้านป่าบง จังหวัดเพชรบูรณ์
- 8.11 ผู้ช่วยนักวิจัยการพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตทางการเกษตรเพื่อการพึ่งพาตนเองบ้านป่าบง จังหวัดเพชรบูรณ์

8.12 ผู้ช่วยนักวิจัยการพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวใหม่ชาวเขาเผ่าม้ง เพื่อการท่องเที่ยวบ้านเข็กน้อย อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์

8.13 นักวิจัยการจัดการภูมิทัศน์ระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม เป็นโครงการย่อย ในโครงการการชุด

8.14 การเสริมสร้างสุขภาวะเพื่อความอยู่ดีมีสุขโดยชุมชนและเครือข่ายองค์กรท้องถิ่น จังหวัดเพชรบูรณ์ (ผู้ร่วมวิจัย)

8.15 การพัฒนาผลผลิตและคุณภาพมะขามหวานของเครือข่ายวิสาหกิจชุมชนมะขามหวาน ตามแนวเศรษฐกิจพอเพียง จังหวัดเพชรบูรณ์ (ผู้ร่วมวิจัย)

.....