



การแสดงออกของยีนไคติเนสในการต้านทานโรคราในมะขาม
Expression of Chitinase gene to resistance Oidium Leaf Disease in
Tamarind (*Tamarindus indica*)

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556



การแสดงออกของยีนไคตินเนสในการต้านทานโรคราในมะขาม
Expression of Chitinase gene to resistance Oidium Leaf Disease in
Tamarind (*Tamarindus indica*)

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

รศ.ดร.เบญจพร ศรีสุวรรณาศ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง. 2556. การแสดงออกของยีนไคตินเนสในการต้านทานโรคราในมะขาม.
สาขาวิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

บทคัดย่อ

มะขามหวานมีศัตรูธรรมชาติที่สร้างความเสียหายให้กับมะขามเป็นอย่างมาก ศัตรูธรรมชาติของมะขามคือเชื้อราโดยเฉพาะเชื้อรา Genus *Oidium* conidia เป็นแบบ pseudoidium type จำแนกได้เป็นชนิด *Oidium* subgenus *Pseudoidium* sp. จากการศึกษาลักษณะประจำพันธุ์มะขาม พบว่า มะขามพันธุ์ปลูกที่ติดเชื้อมีน้อยได้คือ พันธุ์ปลูกชั้นดี ศรีชมภู และเพชรบัวทอง และพันธุ์ปลูกที่อ่อนแอต่อเชื้อราได้แก่พันธุ์ปลูก สีทอง และประกายทอง จากการศึกษาพบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วยสาร Chitin และถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ Chitinase ซึ่งได้จากการแสดงออกของยีน *Chitinase* จึงทำการศึกษการแสดงออกของยีนดังกล่าวในมะขาม 5 พันธุ์ปลูก พบว่า มะขามพันธุ์ ชั้นดี เพชรบัวทอง และสีทองมีการแสดงออกของยีน *Chitinase* ในระดับที่สูง ขณะที่มะขามพันธุ์ศรีชมภูและประกายทองมีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างต่ำ จากผลดังกล่าวพันธุ์ปลูกชั้นดี เพชรบัวทอง มีการแสดงออกของยีน *Chitinase* ในระดับสูงซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการติดเชื้อมีน้อย ขณะที่ พันธุ์ปลูกประกายทองซึ่งมีความอ่อนแอต่อเชื้อรา มีการแสดงออกของยีน *Chitinase* ในระดับต่ำ จากผลดังกล่าวทำให้เห็นถึงความสอดคล้องระหว่างความสามารถในการทนต่อเชื้อราและการแสดงออกของยีน *Chitinase* ซึ่งเป็นข้อมูลนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์มะขามให้มีความสามารถในการต้านทานเชื้อราต่อไป

Surachest Aiumsumang. 2013. Expression of Chitinase gene to resistance Oidium Leaf Disease in Tamarind (*Tamarindus indica*), Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University.

ABSTRACT

Sweet tamarind are natural enemies damage to the tamarind is huge. Tamarind is a natural enemy of mold fungi Genus *Oidium* conidia *pseudoidium* type is classified as type *Oidium* subgenus *Pseudoidium* sp. Study found that the characteristics of the variety, tamarind, tamarind varieties grown fungus is less. Cultivars Khantree Srichompoo and Phetbuathong. Cultivars susceptible to fungal and plant species include Srithong and Prakaithong from the study. Cell walls of fungi contain Chitin and destroyed by enzymes Chitinase derived from expression of Chitinase gene. We evaluated the expression of genes such Tamarind five cultivars found that tamarind Khantree Phetbuathong and Srithong with expression. Chitinase gene at a higher level . While tamarind Srichompoo and Prakaithong has relatively low expression levels . As a result, cultivars Khantree and Phetbuathong with high level of Chitinase gene expression , which corresponds to the fungal less while cultivars Prakaithong, which are susceptible to mold the expression of low level Chitinase gene. as a result, see the correspondence between the ability to resist mold and Chitinase gene expression , which is leading to improved varieties of tamarind to have the ability to resist fungal next.

กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย
ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาจารย์ผู้ร่วมวิจัยที่เอื้อเฟื้อวัสดุ
อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนแนวทางในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้
ด้วยดี ขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุน
วิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
4. ขอบเขตของการวิจัย	3
5. ขอบเขตระยะเวลา	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับมะขาม	5
2. การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์	8
3. เชื้อราก่อโรคในมะขาม	11
4. การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล	13
5. เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาการแสดงออกของยีน	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
1. การสกัดแยกอาร์เอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อ	20
2. การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ	21
3. การสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR	22
4. การออกแบบไพรเมอร์	24
5. การสังเคราะห์ cDNA	24
6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)	25
7. การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel	25
8. วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน	26
บทที่ 4 ผลการวิจัย	27
1. สืบค้นข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านเชื้อรา	27

2. การออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3	28
3. การสกัดแยกอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช	31
4. การตรวจผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วย Agarose gel	31
5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน	33
6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)	36
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	40
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก. ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>Chitinase</i>	46
ภาคผนวก ข. ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ	50
ภาคผนวก ค. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ	53
ประวัตินักวิจัย	59

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	รายละเอียดของไพรเมอร์
ตารางที่ 2	ผลการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอ
ตารางที่ 3	ค่าความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม photocaptMw
ตารางที่ 4	ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันของดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็น <i>Chitinase</i>
ตารางที่ 5	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A_{260}/A_{280} ของใบมะขาม
ตารางที่ 6	ความเข้มข้นของ PCR product และค่า A_{260}/A_{280}
ตารางที่ 7	ขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ
ตารางที่ 8	แสดงบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะขามหวาน	6
ภาพที่ 2 การขยายพันธุ์มะขามหวานโดยวิธีการเปลี่ยนยอด	7
ภาพที่ 3 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส	8
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส	9
ภาพที่ 5 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส	10
ภาพที่ 6 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส	11
ภาพที่ 7 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 1	28
ภาพที่ 8 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 2	29
ภาพที่ 9 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 3	29
ภาพที่ 10 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 4	30
ภาพที่ 11 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 5	30
ภาพที่ 12 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ของยีน <i>Chitinase</i>	32
ภาพที่ 13 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ของยีน <i>Chitinase</i> และ <i>Actin</i>	32
ภาพที่ 14 ฐานข้อมูล NCBI แสดงรายละเอียดของยีน <i>Chitinase</i>	47
ภาพที่ 15 ฐานข้อมูล NCBI แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Chitinase</i>	48
ภาพที่ 16 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3	49

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะขาม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Tamarindus indica* Linn จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae Lindley เป็นไม้เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาแถบประเทศซูดาน ต่อมามีการนำเข้ามาในประเทศแถบเขตร้อนของเอเชีย และประเทศแถบละตินอเมริกา และในปัจจุบันมีมากในเม็กซิโก เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่แตกกิ่งก้านสาขามากไม่มีหนาม เปลือกต้นขรุขระและหนา สีน้ำตาลอ่อน ใบเป็นใบประกอบ ใบเล็กออกตามกิ่งก้านใบเป็นคู่ ใบย่อยเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบและโคนใบมน ประกอบ ด้วยใบย่อย 10 - 15 คู่ ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกสีเหลืองและมีจุดประสีแดงหรือม่วงแดงอยู่กลางดอก ผล เป็นฝักยาว รูปร่างยาวหรือโค้ง ยาว 3-20 ซม. ฝักอ่อนมีเปลือกสีเขียวอมเทา สีน้ำตาลเกรียม เนื้อในติดกับเปลือก เมื่อแก่ฝักเปลี่ยนเป็นเปลือกแข็งกรอบหักง่าย สีน้ำตาล เนื้อในกลายเป็นสีน้ำตาลหุ้มเมล็ด เนื้อมีรสเปรี้ยวหรือหวาน

มะขามถูกจำแนกมะขามออกเป็นมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว มะขามหวานเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งขึ้นชื่อจนเป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่า จังหวัดเพชรบูรณ์เป็น เมืองมะขามหวาน มะขามหวานเพชรบูรณ์มีรสหวานสนิท มะขามหวาน เป็นพืชที่ขึ้นได้ดีในดินแทบทุกชนิด มะขามหวานที่ปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์มีหลายพันธุ์ เช่น หมื่นจง นายหยัด หรือสีทอง ศรีชมภู ชันดี ปากดุก เจ้าเนื้อเศรษฐกิจ ฝักดาบ ฯลฯ แหล่งปลูกมะขามหวาน ภาคเหนือที่จังหวัดเพชรบูรณ์ แพร่ น่าน ลำปาง พิจิตร โลก อุดรดิตถ์ พะเยา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดเลย มุกดาหาร นครราชสีมา อุบลราชธานี ชัยภูมิ หนองคาย สกลนคร นครพนม อุดรธานี ขอนแก่น หนองบัวลำภู อำนาจเจริญ ภาคตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรี สระแก้ว จังหวัดที่ปลูกมะขามหวานมากที่สุด จังหวัดเพชรบูรณ์ รองลงมาคือ จังหวัดเลย 2546 (กลุ่มวิเคราะห์และวางระบบข้อมูล ศูนย์สารสนเทศ กรมส่งเสริมการเกษตร, 2553)

จากการศึกษาเกี่ยวกับมะขามหวาน พบว่า มะขามหวานมีศัตรูธรรมชาติที่สร้างความเสียหายให้กับมะขามเป็นอย่างมาก ส่งผลกระทบต่อผลผลิต ชาวสวนต้องเสียค่าใช้จ่ายไปกับการป้องกันกำจัดเป็นมูลค่ามหาศาลในแต่ละปี ศัตรูธรรมชาติของมะขามดังกล่าวคือ เชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อรา Genus *Oidium* conidia เป็นแบบ pseudoidium type จำแนกได้เป็นชนิด *Oidium* subgenus *Pseudoidium* sp. เชื้อราซึ่งส่งผลกระทบต่อมะขามในทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะต้นอ่อน จนถึงระยะโตเต็มวัย เชื้อสามารถเข้าทำลายมะขามได้ทั้งส่วนใบ ดอก และฝักมะขาม จากข้อมูลดังกล่าว เบญจพร ศรีสุวรรณและจินตนา สนามชัยสกุล (2552) ได้ทำการศึกษการติดเชื้อมะขามโดยทำการทดลองเพาะเชื้อราในมะขามหวานสายพันธุ์ประกาย

ทอง ตั้งแต่ระยะเป็นดอก ทั้งดอกตูม(ดอกยังไม่เปิด)และดอกบาน ฝักอ่อนมะขามอายุ 1 เดือน 3 เดือน 5 เดือน 8 เดือนและระยะฝักแก่หรือฝักสุก อายุ 9-10 เดือน ปรากฏว่าพบเชื้อราในรังไข่และฐานรองดอกของดอกบาน และฝักมะขามทุกระยะที่นำมาตรวจเชื้อ ไม่พบเชื้อราในดอกตูมเพียงทรีตเมนต์เดียว จากการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่า มะขามติดเชื้อราตั้งแต่ระยะเป็นดอก เกิดจากสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งคาดว่าจะมีอยู่มากมายในบรรยากาศภายในสวนมะขามปลิวไปตกบนยอดเกสรตัวเมียด้วยแรงลม และแมลงพาไปหรือติดอยู่กับละอองเกสรตัวผู้ซึ่งเข้าไปปฏิสนธิในรังไข่ สปอร์ของเชื้อราที่เข้าไปในรังไข่จะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเปลือกและเจริญอยู่ภายในฝักมะขามพร้อมกับเจริญเติบโตของฝักมะขาม ดังนั้นเมื่อตรวจเชื้อในฝักอ่อนทุกระยะและฝักแก่ที่ไม่มีรอยแตกหรือร่องรอยของการถูกทำลายด้วยเชื้อราจากผิวนอก จะตรวจพบเชื้อดังกล่าวอยู่ภายในฝักมะขาม

จากปัญหาดังกล่าวทำให้การกำจัดเชื้อราด้วยวิธีการกำจัดจากภายนอก เช่น การใช้ยากำจัดเชื้อรา การเก็บผลผลิตในที่แห้ง หรือกระบวนการเก็บเกี่ยวและเก็บรักษาที่ทำให้มะขามปราศจากเชื้อราเป็นไปได้ยากขึ้น แต่โดยทั่วไปแล้ว ในธรรมชาติของพืชเองนั้นมักมีกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งรบกวนอยู่ ทั้งในส่วนของ การออกดอกและติดผลในช่วงที่มีสิ่งรบกวนน้อย การสร้างสารยับยั้งหรือต่อต้านการรุกรานของโรคและแมลง ซึ่งจากการรุกรานของเชื้อราทำให้พืชมีกลไกในการต้านเชื้อราด้วยการสร้างเอ็นไซม์บางชนิดเพื่อยับยั้งการทำงานของเชื้อรา ซึ่งเอ็นไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ได้แก่ ไคตินเนส โดยกระบวนการความคุมการสังเคราะห์ด้วยยีนไคตินเนส เอนไซม์ไคตินเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสายพอลิเมอร์ (polymer) ที่ไม่มีกิ่ง (unbranch) ของ β -1,4-N-acetylglucosamide (GlcNAc) เอนไซม์ไคตินเนสที่พบในเชื้อรานั้นเมื่อแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) จะเป็นกลุ่มที่ 3 (class III chitinase) และเป็นแฟมิลี (family) ที่ 18 ของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮดรอลเลส (glycosyl hydrolase) (Cohen-Kupiec และ Chet, 1998) เอนไซม์ไคตินเนสที่พบในเชื้อรานี้มีหน้าที่อยู่หลายอย่างด้วยกัน เช่น มีบทบาทเกี่ยวกับการได้รับสารอาหาร, กระบวนการพัฒนาและการเปลี่ยนรูปร่างเนื่องจากไคตินเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในกระบวนการเป็นปรสิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในการควบคุมโดยชีววิธีด้วยเอนไซม์ไคตินเนสในเชื้อรานี้ส่วนมากจะเป็นสายเพปไทด์สายเดียว (single peptide) ที่อาจจะมีบริเวณจับของไคติน (chitin binding domain) อยู่ด้วย จากงานวิจัยที่มีมาก่อนพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสนั้น มีบทบาทหลักในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพราะผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยไคตินงานทดลองในปี ค.ศ. 2002 โดย Pappinen และคณะ รายงานการถ่ายยีนไคตินเนสเข้าต้นเบิช (*Betula pendula*) โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าพืชผลิตโปรตีนไคตินเนส และแสดงความต้านทานต่อเชื้อรา *Pyrenopeziza betulicola* ที่ก่อโรคใบจุดได้ และ Ornatawski และคณะ (2004) ทดลองถ่ายยีนไคตินเนสที่ได้จาก tobacco hornworm

จากการศึกษาลักษณะประจำพันธุ์มะขาม พบว่า มะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมีความสามารถในการต้านเชื้อราที่ต่างกัน จากการศึกษาของ เบญจพร ศรีสุวรรณและจินตนา สนามชัยสกุล (2552) พบว่า มะขามพันธุ์ปลูกที่ติดเชื้อมีน้อยได้คือ พันธุ์ปลูกขันตี ศรีชมภู และเพชรบัวทอง และพันธุ์ปลูกที่อ่อนแอต่อเชื้อราได้แก่พันธุ์ปลูก สีทอง และประกายทอง ซึ่งหากทำการศึกษาลแล้ว พบว่า มะขามสองกลุ่มนี้มีลักษณะการแสดงออกของยีนโคตินเนสที่แตกต่างกันก็จะพอสรุปเบื้องต้นได้ว่า ความสามารถในการทนต่อเชื้อมันเกิดจากระบวนการทำงานของยีนโคตินเนสและการทำงานของเอนไซม์โคตินเนสได้

2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 ศึกษาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ของยีนโคตินเนสจากมะขามด้วยเทคนิค พีซีอาร์ ของมะขามที่ต้านเชื้อราและต้นที่ติดเชื้อรา จากมะขาม 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ขันตี ศรีชมภู เพชรบัวทอง สีทอง และประกายทอง เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปลูกและคัดเลือกพันธุ์ต้านเชื้อราของมะขามในจังหวัดเพชรบูรณ์

2.2 ศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีนโคตินเนสที่มีต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์โคตินเนสจากดีเอ็นเอของมะขามที่มีความจำเพาะในแต่ละพันธุ์ปลูกเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีลักษณะการต่อต้านการรุกรานของเชื้อราในมะขามที่มีลักษณะต้านทานเชื้อราและพันธุ์ปลูกอ่อนแอต่อเชื้อราด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากมะขาม 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ขันตี ศรีชมภู เพชรบัวทอง สีทอง และประกายทอง

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 สามารถเข้าใจถึงกลไกในการต้านเชื้อราในมะขามและเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์มะขามให้มีความสามารถในการต้านเชื้อราได้มากขึ้น

3.2 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ได้งานวิจัยที่ตรงตามตัวชี้วัดของการประกันคุณภาพการศึกษาตามเกณฑ์ของ กพร. สมศ. และ สกอ.

3.3 ได้องค์ความรู้ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์มะขามในระดับโมเลกุลในเรื่องการต้านเชื้อรา และสามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างและปรับปรุงพันธุ์มะขามให้ต้านโรคและแมลงอื่น ๆ ได้

3.4 สามารถจดสิทธิบัตรมะขามต้านเชื้อราที่ได้จากผลการวิจัย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้มะขาม 5 พันธุ์ปลูก คือ ขันตี ศรีชมภู เพชรบัวทอง สีทอง และประกายทองจากจังหวัดเพชรบูรณ์เท่านั้น ทั้งต้นที่เจริญในธรรมชาติและเจริญในเรือนทดลอง

2. การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอใช้ชุด Kit Real Genomics ของบริษัท RBC Bioscience Crop ประเทศไต้หวัน

3. การสังเคราะห์ complementary DNA หรือ cDNA จากอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค reverse transcription โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Omniscript Reverse Transcriptase (QAIGEN, Germany)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ใช้คู่ไพรเมอร์ ซึ่งสังเคราะห์โดย บริษัท MacroGen จากนั้นส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ ด้วยเทคนิค DNA sequencing

1.5 ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือน เมษายน พ.ศ. 2556 ถึง เดือน มีนาคม พ.ศ. 2557

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับมะขาม

1.1 ลักษณะทั่วไปของมะขาม

มะขาม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Tamarindus indica* Linn จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae Lindley เป็นไม้เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาแถบประเทศซูดาน ต่อมามีการนำเข้ามาในประเทศไทยแถบเขตร้อนของเอเชีย และประเทศแถบละตินอเมริกา และในปัจจุบันมีมากในเม็กซิโก เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่แตกกิ่งก้านสาขามากไม่มีหนาม เปลือกต้นขรุขระและหนา สีสน้ำตาลอ่อน ใบเป็นใบประกอบ ใบเล็กออกตามกิ่งก้านใบเป็นคู่ ใบย่อยเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบและโคนใบมน ประกอบด้วยใบย่อย 10 - 15 คู่ ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกสีเหลืองและมีจุดประสีแดงหรือม่วงแดงอยู่กลางดอก ผล เป็นฝักยาว รูปร่างยาวหรือโค้ง ยาว 3-20 ซม. ฝักอ่อนมีเปลือกสีเขียวอมเทา สีสน้ำตาลเกรียม เนื้อในติดกับเปลือก เมื่อแก่ฝักเปลี่ยนเป็นเปลือกแข็งกรอบหักง่าย สีสน้ำตาล เนื้อในกลายเป็นสีน้ำตาลหุ้มเมล็ด เนื้อมีรสเปรี้ยวหรือหวาน

ในประเทศไทยมะขามแบ่งออกเป็นมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศทำให้มีพันธุ์ต่าง ๆ กระจายอยู่ทั่วไปจังหวัดเพชรบูรณ์เป็นถิ่นปลูกมะขามหวานพันธุ์ดี และมีประวัติความเป็นมาที่ยาวนานด้านมะขามหวาน ได้มีการขึ้นทะเบียนกับกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ ทะเบียนเลขที่ สช.48100003 ประกาศตั้งแต่วันที่ 30 กันยายน 2548 ประกาศ โดยการขึ้นทะเบียนมะขามหวานเพชรบูรณ์ได้ประกาศไว้เป็นสินค้าที่มีสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ดังนี้มะขามหวานเพชรบูรณ์ หมายถึง มะขามหวานฝักตรงจากพันธุ์ศรีชมพู พันธุ์ขันตีพันธุ์ประกายทอง พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์หวานล่อน และมะขามหวานฝักโค้งจากพันธุ์สีทองพันธุ์สีทองเบา พันธุ์น้ำผึ้ง พันธุ์อินทผลัม พันธุ์หมื่นจง และพันธุ์แสงอาทิตย์ ซึ่งปลูกในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ (กรมทรัพย์สินทางปัญญา. 2548: ออนไลน์)

ราก ต้นอ่อนที่เพาะจากเมล็ดจะมีรากแก้ว ระบบรากมีการแผ่กระจายดีจึงมีความสามารถในการหาอาหารได้ดี และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้ง (กนก ขวณานนท์. 2534)

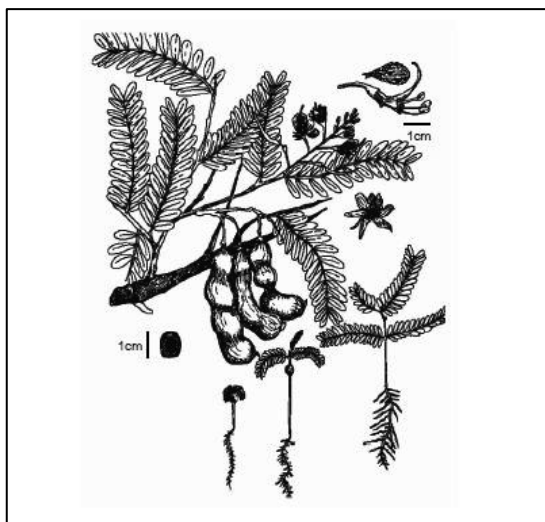
ลำต้น เป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ อาจมีความสูงได้ถึง 20 เมตร เปลือกแตกเป็นร่องและสะเก็ดเล็ก ๆ ตามแนวยาว เนื้อไม้เหนียว ละเอียดและแข็ง ลักษณะของต้นมะขามหวานเป็นทรงพุ่มแฉกเป็น 2 แบบ คือทรงโปร่ง และทรงทึบ (พิจิตร โชคพัฒนา. 2546: 13)

ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก (Pinnately compound leaves) มีใบย่อยติดอยู่ทั้ง 2 ข้างของแกนกลางใบ (Rachis) โดยใบย่อยจะเรียงเป็นแถวตามแกนกลาง (Raven. 1992) ใบย่อยมี

ประมาณ 10-20 คู่ เรียงสลับกันอย่างเป็นระเบียบ ใบย่อยแต่ละใบจะมีความกว้างประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร (กองบรรณาธิการกลุ่มบัณฑิตศึกษาก้าวหน้า. 2530)

ดอก เป็นดอกช่อ (Inflorescence) แบบราซิม (Racemes) มีสมมาตรแบบ Bilateral 1 ช่อ ดอกจะมีดอกย่อย (Floret) ประมาณ 3-10 ดอก แต่ละดอกมีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ประกอบด้วยใบประดับที่มีสีแดง 2 อัน ความยาวประมาณ 8 มิลลิเมตร และจะร่วงไปเมื่อดอกบาน (Tucker. 2000: 1385-1407) มีกลีบดอก (Petal) 5 กลีบ มีสีครีมปนแดง กลีบดอก 2 กลีบถูกลดรูปไปเป็นขน (Bristles) (Lawrenceville. 2007: Online) กลีบเลี้ยง (Sepal) 4 กลีบ มีสีเหลืองอ่อน ดอกมะขามหวานเป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้ (Stamen) ที่สามารถทำหน้าที่ได้มี 3 อัน ก้านเกสรตัวผู้ (Filament) ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ก้านเกสรจะเชื่อมติดกันครึ่งหนึ่งของความยาวทั้งหมด อับเรณู (Anther) มีสีแดงปนน้ำตาล เกสรตัวเมีย (Pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (Ovary) เหนือวงกลีบ (Corolla) (Singh. 2004) ภายในมีโอวูล (Ovule) อยู่ตั้งแต่ 8-10 หรือมากกว่า ยอดเกสรตัวเมียมองไม่เห็นช่องชัดเจนลักษณะเป็นหัวกลมเล็ก (Subcapitate) สีเขียว (Tucker. 2000)

ผล เป็นผลเดี่ยวแบบฝัก (Legume) มีหลายเมล็ดตั้งแต่ 1-8 เมล็ด เมื่อฝักยังอ่อนจะมีสีเขียวสด หรือสีเขียวปนน้ำตาลและมีนวลหรือละอองสีน้ำตาลจับอยู่ จึงดูเป็นสีเขียวปนน้ำตาลเนื้อในสีขาวนวล รสเปรี้ยวจัด ต่อมาเมื่ออายุฝักมากขึ้นเนื้อจะมีสีเหลืองนวลแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ยุบแห้งล่อนออกจากเปลือก ส่วนเนื้อหุ้มเมล็ดจะติดกันยาวและมีเส้นใยยึดอยู่ภายใน 3 เส้นตามความยาวของฝัก ซึ่งเรียกว่า สาแหรก (กนก ชวนานนท์. 2534: 24)



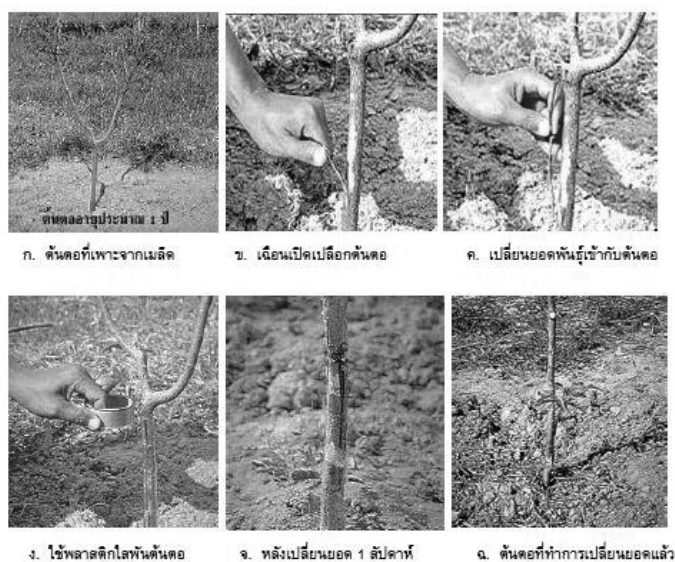
ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะขามหวาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Schnabel. H.G., (2006)

1.2 การเจริญของมะขามหวานในรอบปี

มะขามหวานเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ดีในพื้นที่แห้งแล้ง โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากมะขามหวานต้องการน้ำไม่มากนักในการเจริญ เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนประมาณเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม จะแตกใบอ่อน ออกดอก และติดฝัก ฝักมะขามหวานจะเริ่มแก่และเก็บเกี่ยวได้ตั้งแต่เดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ในช่วงนี้หากมีปริมาณน้ำฝนมากอาจเกิดความเสียหายต่อสวนมะขามหวาน โดยเฉพาะในช่วงการสุกของฝักมะขามหวาน(กองบรรณาธิการกลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า. 2530: 9-10) ภายหลังการเก็บเกี่ยวประมาณเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายนใบจะร่วงเรียกว่าระยะพักตัว 2.1.2 การขยายพันธุ์มะขามหวาน

การทำสวนมะขามหวานในประเทศไทยปัจจุบันนิยมขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเปลี่ยนยอด (ภาพประกอบ 2.6) เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีหลายประการ คือ ได้ต้นพันธุ์ที่มีระบบรากแข็งแรง มีการเจริญเติบโตเร็วไม่ชะงัก สามารถบังคับทรงพุ่มได้ตามความต้องการ การเปลี่ยนยอดมะขามหวานสามารถทำได้ โดยการเปลี่ยนยอดต้นตอที่ปลูกในแปลง ซึ่งต้นตอนั้นได้จากการเพาะเมล็ดและควรมีอายุ 8 เดือนถึง 2 ปี เมื่อทำการเปลี่ยนยอดแล้วจะใช้เวลาปลูกและบำรุง 4-5 ปี รวมระยะเวลาโดยประมาณ 5-8 ปี จึงจะได้มะขามหวานที่ออกจำหน่ายได้ (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2548: ออนไลน์) ต้นมะขามสามารถมีชีวิตรยืนยาวและให้ผลผลิตได้ถึง 80-200 ปี (International Center for Underutilized Crops. 1999: Online)



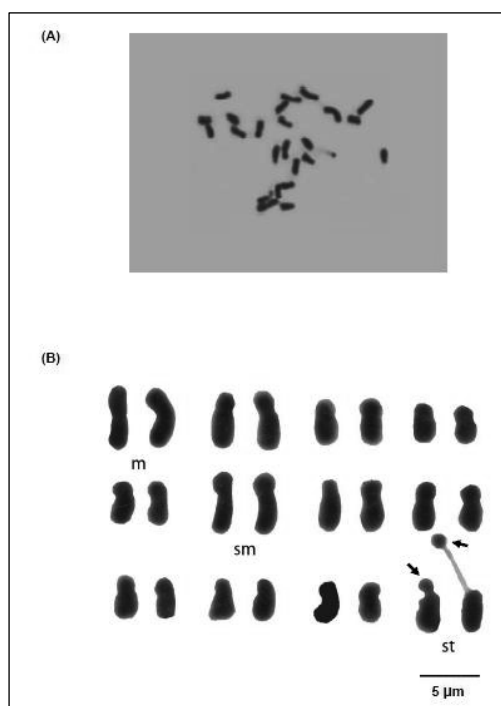
ก. ต้นตอที่เพาะจากเมล็ด ข. เฉือนเปิดเปลือกต้นตอ ค. เปลี่ยนยอดพันธุ์เข้ากับต้นตอ
ง. ใช้พลาสติกละพันต้นตอ จ. หลังเปลี่ยนยอด 1 สัปดาห์ ฉ. ต้นตอที่ทำการเปลี่ยนยอดแล้ว

ภาพที่ 2 การขยายพันธุ์มะขามหวานโดยวิธีการเปลี่ยนยอด
ที่กรมส่งเสริมการเกษตร. (2548).

1.3 การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของมะขามหวานเพชรบูรณ์พันธุ์ศรีชมภู พันธุ์ชั้นดีพันธุ์ประจำท้องถิ่น และพันธุ์สีทอง โดยศึกษาการโอโทไป์จากรากที่เพาะด้วยเมล็ดได้ผลดังนี้

มะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดคือ $2n=24$ จำนวน 73 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 80 เซลล์ คิดเป็น 91.25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น มะขามหวานพันธุ์ศรีชมภูจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ การโอโทไป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 6 คู่ และซับเทโลเซนทริก 1 คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 46 ลักษณะที่สำคัญคือมีแซทเทลไลท์ (Satellite) ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริก โครโมโซมมีความยาวทั้งแขน (Total length หรือ T) ตั้งแต่ 1.545-2.815 ไมโครเมตร เฉลี่ย 1.955 ± 0.213 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพันธ์ (Relative length หรือ RL) ตั้งแต่ 6.584-11.997 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 4 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1, 2, 6 และ 7 โครโมโซมขนาดเล็กมี 8 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 และ 12

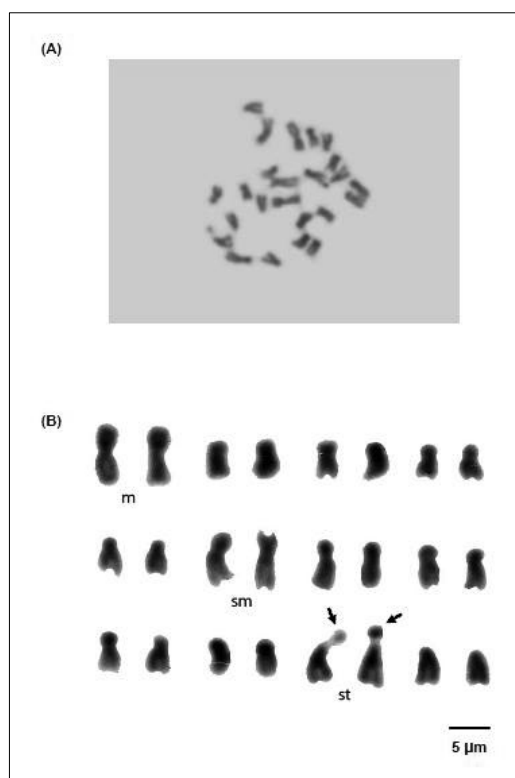


ภาพที่ 3 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$) ของมะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู (A) และการโอโทไป์ (B) ที่กำลังขยายประมาณ 6,826 เท่า ลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์

ที่มา สุวนิดา อัญจิระโรจน์, (2550)

มะขามหวานพันธุ์ชั้นดี มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดคือ $2n=24$ จำนวน 79 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 93 เซลล์ คิดเป็น 84.95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น

มะขามหวานพันธุ์ชั้นดีจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 5 คู่ และซับเทโลเซนทริก 2 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 44 ลักษณะที่สำคัญคือมีแซทเทิลไลท์ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 1 โครโมโซมมีความยาวทั้งแขนตั้งแต่ 2.032-3.343 ไมโครเมตร เฉลี่ย 2.510 ± 0.301 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพันธ์ตั้งแต่ 6.745-11.096 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1, 2, 6, 7, 8 และ 11 โครโมโซมขนาดเล็กมี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 3, 4, 5, 9, 10 และ 12



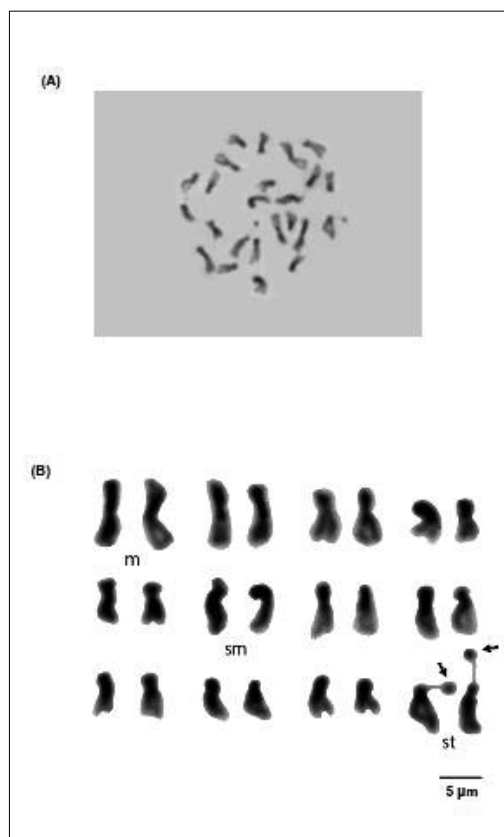
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$)ของมะขามหวานพันธุ์ชั้นดี

(A) และคาร์ิโอไทป์ (B) ที่กำลังขยายประมาณ 3,713 เท่า ลูกศรชี้คือแซทเทิลไลท์

ที่มา สุวนิดา อัญจิระเวโรจน์, (2550)

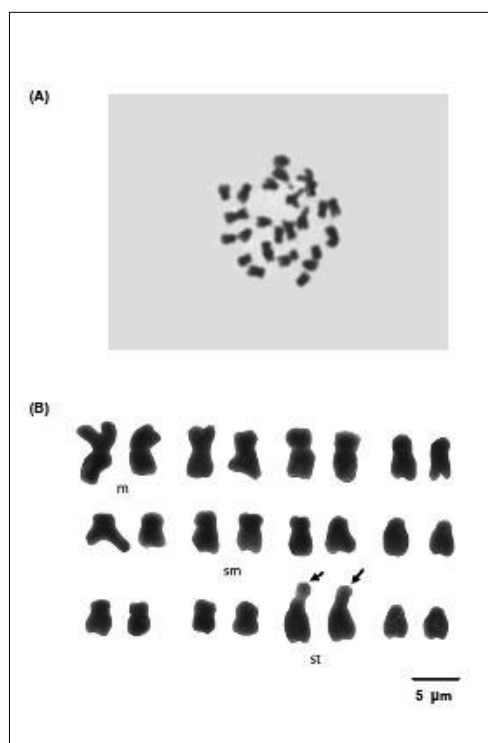
มะขามหวานพันธุ์ประกายทอง มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุด คือ $2n=24$ จำนวน 68 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 90 เซลล์ คิดเป็น 75.55 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น มะขามหวานพันธุ์ประกายทองจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 6 คู่ และซับเทโลเซนทริก 1 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 46 ลักษณะที่สำคัญคือมีแซทเทิลไลท์ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกโครโมโซมมีความยาวทั้งแขนตั้งแต่ 2.317-4.208 ไมโครเมตร เฉลี่ย 2.972 ± 0.546 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพันธ์ (Relative

length หรือ RL) ตั้งแต่ 6.499-11.799 เปอร์เซ็นต์โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12 โครโมโซมขนาดเล็กมี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 4, 5, 8, 9, 10 และ 11



ภาพที่ 5 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$) ของมะขามหวานพันธุ์ประกายทอง (A) และคาริโอไทป์ (B) ที่กำลังขยายประมาณ 3,163 เท่าลูกศรชี้คือแซเทไลต์ที่มาสุนดา อัญจิรวโรจน์, (2550)

มะขามหวานพันธุ์สีทอง มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดคือ $2n=24$ จำนวน 87 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 97 เซลล์ คิดเป็น 89.69 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นมะขามหวานพันธุ์สีทองจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ คาริโอไทป์ ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนตริก 5 คู่ ซับเมทาเซนตริก 5 คู่ และซับเทโลเซนตริก 2 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 44 ลักษณะที่สำคัญคือมีแซเทไลต์ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนตริกคู่ที่ 1 โครโมโซมมีความยาวทั้งแขนตั้งแต่ 1.721-2.969 ไมโครเมตร เฉลี่ย 2.264 ± 0.257 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพันธ์ ตั้งแต่ 6.33-10.928 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 5 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1, 2, 6, 11 และ 12 โครโมโซมขนาดเล็กมี 7 คู่ ได้แก่คู่ที่ 3, 4, 5, 7, 8, 9 และ 10



ภาพที่ 6 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$) ของมะขามหวานพันธุ์สีทอง (A) และคาริโอไทป์ (B) ที่กำลังขยายประมาณ 5,433 เท่าลูกศรชี้คือแซทเทิลไลท์ที่มาสุนิดา อัญจิรวโรจน์, (2550)

2. เชื้อราก่อโรคในมะขาม

จากการศึกษาเกี่ยวกับมะขามหวาน พบว่า มะขามหวานมีศัตรูธรรมชาติที่สร้างความเสียหายให้กับมะขามเป็นอย่างมาก ส่งผลกระทบต่อผลผลิต ชาวสวนต้องเสียค่าใช้จ่ายไปกับการป้องกันกำจัดเป็นมูลค่ามหาศาลในแต่ละปี ศัตรูธรรมชาติของมะขามดังกล่าวคือ เชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อรา Genus *Oidium* conidia เป็นแบบ pseudoidium type จำแนกได้เป็นชนิด *Oidium* subgenus *Pseudoidium* sp. เชื้อราซึ่งส่งผลกระทบต่อมะขามในทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะต้นอ่อนจนถึงระยะโตเต็มวัย เชื้อสามารถเข้าทำลายมะขามได้ทั้งส่วนใบ ดอก และฝักมะขาม จากข้อมูลดังกล่าว เบญจพร ศรีสุวรรณและจินตนา สนามชัยสกุล (2552) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อราในมะขามโดยทำการทดลองเพาะเชื้อราในมะขามหวานสายพันธุ์ประกายทอง ตั้งแต่ระยะเป็นดอก ทั้งดอกตูม(ดอกยังไม่เปิด)และดอกบาน ฝักอ่อนมะขามอายุ 1 เดือน 3 เดือน 5 เดือน 8 เดือนและระยะฝักแก่หรือฝักสุกอายุ 9-10 เดือน ปรากฏว่าพบเชื้อราในรังไข่และฐานรองดอกของดอกบาน และฝักมะขามทุกระยะที่นำมาตรวจเชื้อ ไม่พบเชื้อราในดอกตูมเพียงทรีตเมนต์เดียว จากการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่า มะขามติดเชื้อราตั้งแต่ระยะเป็นดอก เกิดจากสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งคาดว่าจะมีอยู่มากมายในบรรยากาศภายใน

ส่วนมะขามปลิวไปตกบนยอดเกสรตัวเมียด้วยแรงลม และแมลงพาไปหรือติดอยู่กับละอองเกสรตัวผู้ซึ่งเข้าไปปฏิสนธิในรังไข่ สปอร์ของเชื้อราที่เข้าไปในรังไข่จะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเปลือกและเจริญอยู่ภายในฝักมะขามพร้อมกับเจริญเติบโตของฝักมะขาม ดังนั้นเมื่อตรวจเชื้อในฝักอ่อนทุกระยะและฝักแก่ที่ไม่มีรอยแตกหรือร่องรอยของการถูกทำลายด้วยเชื้อราจากฝักนอก จะตรวจพบเชื้อดังกล่าวอยู่ภายในฝักมะขาม

จากปัญหาดังกล่าวทำให้การกำจัดเชื้อราด้วยวิธีการกำจัดจากภายนอก เช่น การใช้ยากำจัดเชื้อรา การเก็บผลผลิตในที่แห้ง หรือกระบวนการเก็บเกี่ยวและเก็บรักษาที่ทำให้มะขามปราศจากเชื้อราเป็นไปได้ยากขึ้น แต่โดยทั่วไปแล้ว ในธรรมชาติของพืชเองนั้นมักมีกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งรบกวนอยู่ ทั้งในส่วนของ การออกดอกและติดผลในช่วงที่มีสิ่งรบกวนน้อย การสร้างสารยับยั้งหรือต่อต้านการรุกรานของโรคและแมลง ซึ่งจากการรุกรานของเชื้อราทำให้พืชมีกลไกในการต้านเชื้อราด้วยการสร้างเอนไซม์บางชนิดเพื่อยับยั้งการทำงานของเชื้อรา ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ได้แก่ ไคติเนส โดยกระบวนการความคุมการสังเคราะห์ด้วยยีนไคติเนส เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสายพอลิเมอร์ (polymer) ที่ไม่มีกิ่ง (unbranch) ของ β -1,4-N-acetylglucosamide (GlcNAc) เอนไซม์ไคติเนสที่พบในเชื้อรานั้นเมื่อแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) จะเป็นกลุ่มที่ 3 (class III chitinase) และเป็นแฟมิลี (family) ที่ 18 ของเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส (glycosyl hydrolase) (Cohen-Kupiec และ Chet, 1998) เอนไซม์ไคติเนสที่พบในเชื้อรานี้มีหน้าที่อยู่หลายอย่างด้วยกัน เช่น มีบทบาทเกี่ยวกับการได้รับสารอาหาร, กระบวนการพัฒนาและการเปลี่ยนรูปร่างเนื่องจากไคตินเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในกระบวนการเป็นปรสิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในการควบคุมโดยชีววิธีด้วยเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อรานี้ส่วนมากจะเป็นสายเพปไทด์สายเดียว (single peptide) ที่อาจจะมีบริเวณจับของไคติน (chitin binding domain) อยู่ด้วย จากงานวิจัยที่มีมาก่อนพบว่าเอนไซม์ไคติเนสนั้น มีบทบาทหลักในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพราะผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยไคตินงานทดลองในปี ค.ศ. 2002 โดย Pappinen และคณะ รายงานการถ่ายยีนไคติเนสเข้าต้นเบิช (*Betula pendula*) โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าพืชผลิตโปรตีนไคติเนส และแสดงความต้านทานต่อเชื้อรา *Pyrenopeziza betulicola* ที่ก่อโรคใบจุดได้ และ Ornatawski และคณะ (2004) ทดลองถ่ายยีนไคติเนสที่ได้จาก tobacco hornworm

จากการศึกษาลักษณะประจำพันธุ์มะขาม พบว่า มะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมีความสามารถในการต้านเชื้อราที่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ เบญจพร ศรีสุวรรณมาศและจินตนา สนามชัยสกุล (2552) พบว่า มะขามพันธุ์ปลูกที่ติดเชื้อมีน้อยได้คือ พันธุ์ปลูกขันธ์ดี ศรีชมภู และเพชรบัวทอง และพันธุ์ปลูกที่อ่อนแอต่อเชื้อราได้แก่พันธุ์ปลูก สีทอง และประกายทอง ซึ่งหากทำการศึกษาแล้ว พบว่า มะขามสอง

กลุ่มนี้มีลักษณะการแสดงออกของยีนไคตินเนสที่แตกต่างกันก็จะพอสรุปเบื้องต้นได้ว่า ความสามารถในการทนต่อเชื้อราที่ขึ้นเกิดจากระบบการทำงานของยีนไคตินเนสและการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสได้

มะขามที่มีความต้านทานต่อเชื้อราที่แตกต่างกันจะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนไคตินเนสที่แตกต่างกันเป็นผลให้มีกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสซึ่งเป็นยีนที่มีความสามารถในการต้านเชื้อราที่แตกต่างกัน โดย ในมะขามพันธุ์ปลูกที่มีความต้านทานต่อเชื้อราจะมีการแสดงออกของยีนไคตินเนสมากกว่ายีนไคตินเนสในมะขามพันธุ์ปลูกที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อรา และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของยีนไคตินเนสในมะขาม จะพบว่ามีลำดับที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank Accession number HM222538 ซึ่งเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงของยีนต้านเชื้อรา

การสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช การแข่งขันและครอบครองพื้นที่การเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้อย่างรวดเร็วในดิน และการเป็นปรสิต โดยการสร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นสร้างเอนไซม์ย่อยสลายได้แก่ เอนไซม์ chitinase, β -1,3-glucanase, protease และ cellulase ออกมาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เอนไซม์ chitinase ทำหน้าที่ย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ N-acetyl-Dglucosamine ด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic bond (Fukamizo, 2000) chitinase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในโลกของการเป็นปรสิต เนื่องจากผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เช่น *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

3. การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์พืชเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาคำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษาลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชหลายๆ ประการ เช่น ผลผลิต และลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกัน การแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดย

ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีจำนวนเบสซ้ำในหนึ่งหน่วยเบสซ้ำประมาณ 1-6 เบส เรียงอยู่ต่อเนื่องกัน กระจายทั่วทั้งจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในโลกัสหนึ่งๆ ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วมได้ (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน ไพรมเมอร์ (primer) ที่สร้างขึ้นสำหรับพีซีอาร์หนึ่งๆ นั้นมีความจำเพาะเจาะจง แต่การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธีมาตรฐานค่อนข้างยุ่งยากใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และในปัจจุบัน ได้มีการทำฐานข้อมูลจากฐานข้อมูลสาธารณะ EST (expressed sequence tags) มาใช้ในการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และวิธีการนี้เป็นที่แพร่หลายในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอในปัจจุบัน (ขวัญใจ และคณะ, 2552) ไมโครแซทเทลไลต์ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 1-6 เบส ตัวอย่างเช่น เบสซ้ำหนึ่งเบสเรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)_n เบสซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)_n เบสซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA)_n และเบสซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA)_n โดยที่ n เป็นจำนวนครั้งของเบสซ้ำ ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม (Powell et al., 1996) แต่การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณพบมาก บางบริเวณพบน้อย ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือส่วนนำรหัสของยีน (non-coding region) โดยเฉพาะพวกที่ชุดซ้ำมีขนาดไม่เท่ากับ 3 เบส เพราะถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของชุดซ้ำจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีส่วนน้อยที่พบอยู่ส่วนนำรหัสของยีนหรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนเนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่ขนานข้างกับเบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะของลำดับเบสนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ โดยการออกแบบไพรมเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) เหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า ไมโครแซทเทลไลต์ไพรมเมอร์ ไพรมเมอร์เหล่านี้จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ ความหลากหลายของยีนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน ซึ่งจะใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Ince et al., 2009; Karaca et al., 2005; สุรินทร์, 2552) ปัจจุบัน ได้มีการนำ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์นี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะ ในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganal, 2002)

อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญของการพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์นั้น ต้องใช้ระยะเวลานาน มีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายในการพัฒนาค่อนข้างสูงมาก โดยต้องอาศัยการโคลนไมโครแซทเทลไลต์ และการหาลำดับเบส เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่ชนาบบ้างกับไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งจะเป็นอุปสรรคสำหรับพืชที่ไม่มีข้อมูลลำดับเบสใน GENBANK มาก่อน นอกจากนี้แล้ว ปัญหาทางด้านเทคนิคที่พบบ่อยๆ คือ การวิเคราะห์ผลค่อนข้างยาก หากได้แถบดีเอ็นเอที่เป็นหลายแถบ (stutter bands) อาจทำให้การอ่านแถบดีเอ็นเออาจผิดพลาดได้ (He et al., 2003; สุริพร, 2546) ดังนั้น เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีการนำข้อมูล expressed sequence tags (EST) มาใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งสามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนและประยุกต์ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดอย่างกว้างขวาง

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

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูล EST ในปัจจุบัน มีการใช้อย่างแพร่หลายในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยการค้นหาข้อมูลของลำดับเบสจากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) แล้วนำข้อมูลของลำดับเบสที่มีการแสดงออก มาออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งเฉพาะของยีนนั้นๆ โดยใช้หลักการของ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจสอบและแยกขนาดโดยใช้อะกาโรส และอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูล EST จะต้องพิจารณาจากจำนวนข้อมูล EST ของพืช ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิด (species) เดียวกัน หรือแม้แต่ในสกุล (genus) เดียวกัน ที่มีสายวิวัฒนาการเกี่ยวข้องกัน และอาจเชื่อมโยงถึงหลักการทำงานยีนเดียวกันที่อยู่ในจีโนม สามารถนำมาตรวจสอบกับพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้ (cross transferability) เนื่องจากการมีบรรพบุรุษร่วมกัน (orthologous genes) จะเป็นตัวกำหนดรูปแบบและลำดับเบส รวมทั้งข้อมูลความสัมพันธ์เกี่ยวกับรูปแบบการกลายพันธุ์ และวิวัฒนาการของตำแหน่งยีน (loci) (Poncet et al., 2006) วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูล EST นี้ จะช่วยลดต้นทุนแรงงาน และระยะเวลา ในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และยังได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนของยีนโดยตรง (Feng et al., 2009; Naresh et al., 2009) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการประเมินความหลากหลายของจีโนมที่จะเป็นประโยชน์ในการเปรียบเทียบแผนที่ทางพันธุกรรม หายีนเป้าหมายที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเพิ่มเติมยีนที่สำคัญลงในแผนที่ทางพันธุกรรมให้สมบูรณ์มากขึ้นปัจจุบัน จำนวน EST ในฐานข้อมูลสาธารณะมีจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูล EST ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Kentety et al., 2002) และมีการใช้ประโยชน์จาก EST ของพืชใกล้เคียง (cross transferability) อย่างแพร่หลาย เนื่องจากฐานข้อมูล EST มีจำนวนมากขึ้น การพัฒนาไพรเมอร์จำเป็นจะต้องมีการคัดกรอง EST ก่อน เพื่อลดความซ้ำซ้อนของข้อมูล และข้อมูล EST ส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ดังนั้น ในพืชพื้นเมืองอาจจะต้องใช้ข้อมูลของ EST ในพืชที่อยู่ในสกุลหรือวงศ์เดียวกัน ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ในพืชที่ยังไม่มีฐานข้อมูล

4. เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาการแสดงออกของยีน

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรืออีกชื่อว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด, oligonucleotide primers, บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90–95 °C ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50–55 °C เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยว

ตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทางจาก 5' ไป 3' อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70–75 °C การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

เทคนิค Reverse transcription - polymerase chain reaction หรือ เทคนิค RT-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งยีนที่สนใจโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่แบบวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน โดยหลักการคือ สกัดอาร์เอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์เพื่อนำอาร์เอ็นเอเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งจะทำงานโดยการสร้างสายดีเอ็นเอได้ทั้งจากแม่แบบที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไปเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จาก retroviruses 2 ชนิด ได้แก่ Avian myeloblastosis virus (AMV) และ Moloney murine leukemia virus (MMLV) ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากไวรัสทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการสร้างสาย cDNA ไม่ต่างกัน

เหตุผลที่ต้องใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่แบบในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ mRNA จากรหัสพันธุกรรมบนดีเอ็นเอมีบทบาทที่สำคัญมากต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับของ gene transcription ภายในเซลล์ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อสัญญาณมากมายที่เกิดขึ้นในระหว่างที่พืชยังมีชีวิตอยู่ การเปลี่ยนระดับ transcription เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของ mRNA ดังนั้น ในการตรวจวัดระดับของ mRNA ของยีนชนิดหนึ่งจึงทำให้ทราบระดับการแสดงออกของยีนชนิดนั้นๆด้วย เทคนิค RT-PCR จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน โดยปฏิกิริยาจะถูกแบ่งออกเป็นสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนในการเปลี่ยนจากอาร์เอ็นเอให้เป็นดีเอ็นเอด้วยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase เรียกว่าปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อให้ได้สายดีเอ็นเอคู่สม หรือ complementary DNA หรือ cDNA และขั้นตอนการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากพอต่อการตรวจสอบ

เทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) หรือ RNA-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ RNA ที่ประกอบด้วยสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA - cDNA) จากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอ โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) และปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์ สำหรับ RT ที่ใช้ส่วนใหญ่ได้มาจาก retrovirus ซึ่งมีคุณสมบัติโดยทั่วไป ดังนี้คือ

- เป็น RNA และ DNA – dependent DNA polymerase โดยต้องใช้ primer ร่วมในการสร้างสาย cDNA

- ไม่มี proofreading หรือ 3'-5' exonuclease activity
- มี RNaseH activity

ในปัจจุบันมี RT หลายชนิดที่นำมาใช้ในการสร้างสาย cDNA ได้แก่

- Moloney murine leukemia virus (MMLV) RT
- Avian myeloblastosis virus (AMV) RT
- SuperScript™ RNaseH- RT, SuperScriptII™ RNaseH- RT และ Expand Reverse

Transcriptase

เอนไซม์ทั้งสามเป็น MMLV RT กลายพันธุ์ที่ปราศจาก RNase H activity

- *Tth* DNA Polymerase เป็น thermostable DNA polymerase จาก *Thermus thermophilus* ที่มี RT activity ในภาวะที่มี Mn^{2+} อยู่ แต่ไม่มี RNase H activity

รูปแบบของเทคนิค RT-PCR สามารถทำได้ 2 รูปแบบ คือ

1. แบบสองขั้นตอน (Two-step RT-PCR) ในขั้นตอนแรก เป็นขั้นตอนทำ reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA โดยใช้แบบใดก็ได้ ในขั้นตอนที่สอง cDNA ที่ได้จากหลอดปฏิกิริยาแรก จะถูกนำมาใช้ในการทำ PCR ต่อในหลอดที่สอง

2. แบบขั้นตอนเดียว (One-step RT-PCR) RT-PCR แบบนี้ ทั้งปฏิกิริยา reverse transcription และ PCR จะเกิดต่อเนื่องภายในหลอดเดียวกัน primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription จะต้องใช้ gene-specific primers เท่านั้น จะใช้ primers ชนิดอื่นไม่ได้

สุวิตา และคณะ (2554) ทำการโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานโรคใบจุดเปื้อน ากะสุนในมะเขือเทศ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนไคตินเนสด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส เมื่อทำการโคลนยีนไคตินเนส โดยเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T พบว่าโคลนของเชื้อรา *T. harzianum* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. harzianum* chit-HAR2 gene for endochitinase-HAR2 (AB041752) ของฐานข้อมูล GenBank 99% และมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ endochitinase-HAR2 ของเชื้อรา *Hypocrea lixii* (BAB40590) 98 % ยีนไคตินเนสที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศเพื่อปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความต้านทานต่อโรคของมะเขือเทศ

มานะ ขาวเมฆ (2553) ศึกษาการแสดงออกของยีนไคตินเนสจากกระถินบ้านในข้าวไทยดอกมะลิ 105 และข้าวญี่ปุ่นโกชิฮิการิ ด้วยอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1300 เป็นตัวพาหะ หลังจากเพาะเมล็ดข้าวทั้งสองชนิดเป็นแคลลัส และสร้างพลาสมิด pCAMBIA 1300 ที่มียีน chitinase, CaMV35S และ NOS แล้วถ่ายยีนไคตินเนสเข้าไปในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ แล้วตรวจการแสดงออกด้วยวิธี PCR, Northern blot gel, Southern blot gel และ gus assay พบว่าการแสดงออกของยีนไคตินเนส

และยีน gus ในข้าวดอกมะลิ 105 จะมีมากกว่าในข้าวโกชิอิการิ โดยจะมีการแสดงออกในทุก ๆ ส่วนของข้าวทั้ง 2 ชนิด แต่จะมีการแสดงออกน้อยที่สุดในรากส่วนใน ใบ ลำต้น และเมล็ด จะมีการแสดงออกของยีนโคติเนสและยีน gus มาก แสดงว่ายีนโคติเนสจะมีในใบ ต้น และเมล็ดมากกว่าในราก เมื่อทดสอบการต้านเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium moniliforme* ในต้นข้าวทั้งข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้น ปรากฏว่าต้นข้าวที่ได้รับการสเปรย์เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์หลังจากนั้นสองวันต้นข้าวมีลักษณะเหี่ยว ใบเริ่มเหลือง และเมื่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ต้นข้าวเหี่ยว ใบเกิดจุดสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่ไม่มียีนของโคติเนสจะไม่สามารถต้านทานเชื้อรา จึงทำให้เกิดโรคเชื้อราในข้าวได้

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 การสกัดแยกอาร์เอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อ

สกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด RNeasy Mini Kit® (ประกอบด้วย RNeasy Mini Spin Columns, QIAshredder Spin Columns, Collection Tubes, Buffer RLT, Buffer RLC, Buffer RW1, Buffer RPE, RNase-Free Water) โดยมีขั้นตอนตามที่ผู้ผลิตแนะนำ (QIAGEN, Germany) คือ นำตัวอย่างพืชที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาเทลงในโกร่ง จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวและบดตัวอย่างจนละเอียด เทลงในหลอด microcentrifuge ที่แช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว เติม Buffer RLT 450 ไมโครลิตรและเขย่าหลอดด้วยเครื่อง vortex mix ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นเทตัวอย่างลงใน QIAshredder spin column ปั่นเหวี่ยง 2 นาทีที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ย้าย supernatant ลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ นำ QIAshredder spin column ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดกาก กากจะถูกกักไว้ใน QIAshredder spin column ส่วนที่เป็นอาร์เอ็นเอจะผ่านลงใน collection tube ด้านล่าง ทำการดูดตัวอย่างด้านล่างนี้ลงใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม ethanol (96-100%) ปริมาตร 0.5 เท่าของตัวอย่าง ในหลอด microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วโดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วย้ายสารละลายซึ่งประกอบด้วยตะกอนที่มีอาร์เอ็นเอลงใน RNeasy spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่ตกลงด้านล่างทิ้งไป แล้วเติม Buffer RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เพื่อล้าง spin column membrane เทสารละลายที่ตกลงด้านล่างทิ้ง เติม Buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ล้าง spin column membrane เทสารละลายที่ตกลงด้านล่างทิ้งไป เติม Buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน RNeasy spin column ปิดฝา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ล้าง spin column membrane ปั่นเหวี่ยง spin column membrane ให้แห้งเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี ethanol เหลืออยู่ จากนั้น ย้าย RNeasy spin column ลงใน collection tube ใหม่ ปิดฝาและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนนี้เป็นการกำจัด Buffer RPE ที่ยังคงตกค้างใน RNeasy spin column ให้หมดไป จากนั้นย้าย RNeasy spin column ลงใน collection tube อันใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม RNase-free water 50 ไมโครลิตร ลงใน spin column membrane ปิดฝา และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 1 นาที เพื่อละลายอาร์เอ็นเอเมื่อได้สารละลายอาร์เอ็นเอแล้วสามารถนำไปใช้งานต่อได้ทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสสำหรับใช้งาน

3.2 การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ

การหาปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้ในแต่ละครั้งค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จะต้องไม่ต่ำกว่า 0.15 หากค่าที่อ่านได้เท่ากับ 1 จะเท่ากับความเข้มข้นของสารละลายอาร์เอ็นเอ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยทั่วไป ปริมาณอาร์เอ็นเอที่แยกได้นั้นมักมีปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ดังนั้นการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอจึงต้องมีการเจือจางเพื่อไม่ให้เป็นการเปลี่ยนแปลงตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ โดยก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ล้าง cuvette ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ แล้วล้างซ้ำด้วย RNase-free water จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอโดยเจือจางสารละลายอาร์เอ็นเอให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า โดยการเตรียมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 180 ไมโครลิตรลงในหลอด microcentrifuge และดูดสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกันในหลอด microcentrifuge ให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer: Ultrospec 1100 pro) โดยก่อนทำการวัด นำ cuvette ที่ล้างทำความสะอาดแล้ว เติม TE buffer ให้เต็มหลอด หรือประมาณ 500 ไมโครลิตร เช็ดบริเวณข้างหลอดซึ่งเป็นส่วนที่แสงผ่านให้แห้งแล้วใส่หลอด cuvette ลงในเครื่องเพื่อตั้งค่าการดูดกลืนแสงให้เป็นศูนย์ จากนั้น เท TE buffer ออก ล้างด้วย RNase-free water เช็ดให้แห้ง จากนั้นเติมสารละลายอาร์เอ็นเอที่ต้องการวัดความเข้มข้นลงใน cuvette เช็ดบริเวณข้างหลอดให้สะอาดเพื่อไม่ให้รบกวนเส้นทางของแสง ใส่หลอดลงในเครื่อง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง 3 ครั้ง ในแต่ละความยาวคลื่น นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและนำมาคำนวณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยมีสมการในการคำนวณปริมาณอาร์เอ็นเอดังนี้คือ

$$\text{RNA concentration } (\mu\text{g/ml}) = (40 \mu\text{g/ml}) \times (A_{260}) \times (\text{Dilution factor})$$

กำหนดให้

RNA concentration = ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

Dilution factor = ค่าสัดส่วนการเจือจางของสารละลายอาร์เอ็นเอ

3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอทำได้โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) โดยอาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.9 – 2.1

3.4 การกำจัดดีเอ็นเอที่อาจมีการปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNase

หลังจากการสกัดอาร์เอ็นเอแล้ว เพื่อให้อาร์เอ็นเอนั้นมีความบริสุทธิ์ ปราศจากสารพันธุกรรมชนิดอื่นโดยเฉพาะดีเอ็นเอ ซึ่งหากมีการปนเปื้อนอาจทำให้ผลการทดลองเกิดความผิดพลาดได้ จึงต้องกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้เอนไซม์ DNase คือ RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) (1U/ μ l) โดยการนำอาร์เอ็นเอ 10 ไมโครกรัม มาเติมลงใน 10x reaction buffer 2 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RQ1 RNase-Free DNase ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย DNase RNase free water จนครบ 20 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม RQ1 DNase stop solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากการทำปฏิกิริยานี้ทำให้มีสารละลายปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรและความเข้มข้นอาร์เอ็นเอเท่ากับ 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

3.5 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

การสังเคราะห์ cDNA ปฏิกิริยานี้เป็นการสังเคราะห์ cDNA แบบ 2 ขั้นตอน (Two-step RT-PCR) โดยมีส่วนประกอบในปฏิกิริยาดังนี้คือ

การสังเคราะห์ complementary DNA หรือ cDNA จากอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค reverse transcription โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Omniscript Reverse Transcriptase® (ประกอบด้วย

Omniscript Reverse Transcriptase, Buffer RT, dNTP Mix, RNase-Free Water) โดยมีขั้นตอนตามที่คุณผลิตแนะนำ (QAIGEN, Germany) คือ เตรียมอาร์เอ็นเอที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทำให้ละลายและให้ความเย็นโดยแช่ไว้ในน้ำแข็งเพื่อป้องกันอาร์เอ็นเอเสื่อมสภาพ ละลายสารละลาย Oligo dT primer (Bio Basic Inc, Canada), 10x Buffer RT, dNTP Mix, และ RNase-free water ที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารแต่ละชนิดมาผสมกันแล้วแช่ลงในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mix และปั่นเหวี่ยงช่วงเวลาสั้นๆให้ส่วนที่ค้างอยู่ข้างหลอดตกลงไปรวมกันทั้งหมด นำ master mix ทั้งหมดเก็บไว้ในน้ำแข็ง ถ้าต้องการทำมากกว่า 1 ปฏิบัติการให้เตรียมปริมาณใน master mix เพิ่มขึ้นอีก 10 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าที่ต้องเตรียมไว้ใช้จริงเพื่อป้องกันความผิดพลาดที่เกิดจากการสูญหายของสารละลายในระหว่างการปฏิบัติงาน จากนั้นเติมอาร์เอ็นเอลงในแต่ละหลอดที่มี master mix ที่แช่น้ำแข็งไว้แล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mix ประมาณ 5 วินาที และปั่นเหวี่ยงช่วงเวลาสั้นๆให้ส่วนที่ติดอยู่ข้างหลอดตกลงมารวมกันทั้งหมด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เอนไซม์ reverse transcriptase เริ่มปฏิบัติการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA หลังจากขั้นตอนนี้แล้วสามารถนำตัวอย่างไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ หรือเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมไว้ใช้งานต่อไป โดยในปฏิกิริยา RT-PCR มีส่วนประกอบดังแสดงในตาราง

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา RT-PCR

Component	Volume/reaction	Final concentration
Master mix		
10x Buffer RT	2 µl	1x
dNTP Mix (5 mM each dNTP)	2 µl	0.5 mM each dNTP
Oligo-dT primer (10 µM)*	2 µl	1 µM
RNase inhibitor (10 units/µl)	1 µl	10 units (per 20 µl reaction)
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl	4 units (per 20 µl reaction)
RNase-free water	Variable	
Template RNA	Variable	Up to 2 µg (per 20 µl reaction)
Total volume	20 µl	

3.6 การออกแบบไพรเมอร์

หลังจากทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจจากฐานข้อมูล GenBank แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน โดยใช้โปรแกรม Primer 3 version 0.4.0 กำหนดให้อุณหภูมิในการเข้าจับกับแม่แบบ (Annealing) อยู่ระหว่าง 59 - 60 องศาเซลเซียส มีกลุ่มนิวคลีโอไทด์ CG เป็นส่วนประกอบประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของผลผลิตอยู่ระหว่าง 200 - 300 bp และกำหนดให้โปรแกรมหลีกเลี่ยงการเลือกไพรเมอร์ที่มีการเข้าจับกันเอง (self complementary) อุณหภูมิในการเข้าจับกับแม่แบบของไพรเมอร์ต่างกันไม่เกิน 1 องศาเซลเซียส และเมื่อสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่สนใจได้แล้ว นำดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เพิ่มปริมาณได้ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้เป็นต้นแบบการศึกษาด้วยโปรแกรม Blastn

3.7 การสังเคราะห์ cDNA

ปฏิกิริยานี้เป็นการสังเคราะห์ cDNA แบบ 2 ขั้นตอน (Two-step RT-PCR) โดยมีส่วนประกอบในปฏิกิริยาดังนี้คือ

การสังเคราะห์ complementary DNA หรือ cDNA จากอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค reverse transcription โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Omniscript Reverse Transcriptase® (ประกอบด้วย Omniscript Reverse Transcriptase, Buffer RT, dNTP Mix, RNase-Free Water) โดยมีขั้นตอนตามที่ผู้ผลิตแนะนำ (QAGEN, Germany) คือ เตรียมอาร์เอ็นเอที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมาทำให้ละลายและให้ความเย็นโดยแช่ไว้ในน้ำแข็งเพื่อป้องกันอาร์เอ็นเอเสื่อมสภาพ ละลายสารละลาย Oligo dT primer (Bio Basic Inc, Canada), 10x Buffer RT, dNTP Mix, และ RNase-free water ที่อุณหภูมิห้อง ผสมสารแต่ละชนิดมาผสมกันแล้วแช่ลงในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mix และปั่นเหวี่ยงช่วงเวลาสั้นๆให้ส่วนที่ค้างอยู่ข้างหลอดตกลงไปรวมกันทั้งหมด นำ master mix ทั้งหมดเก็บไว้ในน้ำแข็ง ถ้าต้องการทำมากกว่า 1 ปฏิกิริยา ให้เตรียมปริมาณใน master mix เพิ่มขึ้นอีก 10 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าที่ต้องเตรียมไว้ใช้จริงเพื่อป้องกันความผิดพลาดที่เกิดจากการสูญหายของสารละลายในระหว่างการปฏิบัติงาน จากนั้นเติมอาร์เอ็นเอลงในแต่ละหลอดที่มี master mix ที่แช่น้ำแข็งไว้แล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex mix ประมาณ 5 วินาที และปั่นเหวี่ยงช่วงเวลาสั้นๆให้ส่วนที่ติดอยู่ข้างหลอดตกลงมารวมกันทั้งหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เอนไซม์ reverse transcriptase เริ่มปฏิกิริยาเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA หลังจากขั้นตอนนี้แล้วสามารถนำตัวอย่างไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ หรือเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมไว้ใช้งาน

3.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

ในขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์นี้ เป็นขั้นตอนในการนำ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มาเพิ่มปริมาณให้มากขึ้น การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เริ่มจากเตรียม master mix ที่ประกอบด้วย 1x PCR Buffer, dNTP, forward primers, reverse primers, *Taq* DNA polymerase, DNase - RNase free water การเตรียมสารละลายต่างๆ ทำได้โดยปิเปตสารแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองใหม่เพื่อเตรียมเป็น master mix เนื่องจากสารละลายทั้งหมดเสื่อมสภาพได้ง่าย จึงควรปฏิบัติงานอย่างรวดเร็วและระมัดระวัง และสารทุกชนิดต้องอยู่ในความเย็นขณะปฏิบัติงาน โดยเฉพาะ *Taq* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการเสื่อมสภาพได้ง่ายและเพื่อไม่ต้องการให้เกิดปฏิกิริยาก่อนการเติม cDNA จึงควรเติม *Taq* DNA polymerase นี้อย่างช้าๆ ในปฏิกิริยาเป็นอันดับสุดท้ายใน master mix ก่อนการเติม cDNA เมื่อเตรียม master mix เรียบร้อยแล้ว ทำการปิเปตสารลงในหลอดทดลองแต่ละตัวอย่าง หลังจากนั้นเติม cDNA แต่ละตัวอย่างลงไปและเริ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermal cycler

3.9 การตรวจผลปฏิกิริยา PCR ด้วย Agarose gel

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมนลงในช่อง agarose gel ที่ละตัวอย่างจนครบ และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA /HindIII (บริษัท SibEnzyme, Russia) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ทราบขนาดและปริมาณที่แน่นอนเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง electrophoresis โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที นำไปตรวจผลบนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วยกล้อง polaroid camera โดยทั่วไป การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์หากชิ้นยีนมีขนาดใหญ่ 500 - 1,000 bp มักเตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้นที่ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากการทดลองนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 200 bp และ 246 bp การตรวจสอบจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ให้มากขึ้นเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นของ agarose gel ที่มี

ค่าสูง ช่องว่างระหว่างโมเลกุลในเนื้อสารจะยิ่งมีค่าลดลง จึงทำให้ดีเอ็นเอที่ยิ่งมีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปตามแรงดันกระแสไฟฟ้าได้ลดลง ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะยังคงสามารถเคลื่อนผ่านช่องว่างระหว่างโมเลกุลของ agarose gel ได้ ด้วยเหตุนี้ การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงสามารถแยกชั้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้ดีขึ้น

3.10 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน

หลังจากการตรวจผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องฉาย UV และบันทึกภาพด้วยกล้อง polaroid camera แล้ว ภาพที่ได้ซึ่งเป็นภาพที่แสดงลักษณะการเรืองแสงของดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากการที่สารเอธิเดียมโบรไมด์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น fluorescent compound ที่จะเข้าจับกับบริเวณ double stranded ของสายดีเอ็นเอโดยจะแทรกตัวอยู่ระหว่างคู่เบส และสามารถเรืองแสงเมื่อได้รับรังสี UV ดังนั้นเมื่อพบการเรืองแสงจึงหมายถึงพบชิ้นดีเอ็นเอ และหากมีการเรืองแสงมากจึงหมายถึงมีปริมาณดีเอ็นเอมากตามไปด้วย จากการศึกษาการแสดงออกของยีนซึ่งยีนที่ได้เป็นชิ้น cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา reverse transcription ของอาร์เอ็นเอซึ่งถูกกระตุ้นจากกระบวนการ transcription ดังนั้นความเข้มจากการเรืองแสงของดีเอ็นเอนี้จึงบ่งบอกถึงการแสดงออกของยีนที่ศึกษานี้ได้ด้วย จากการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม PhotocaptMw ซึ่งโปรแกรมนี้จะใช้วิธีการเปรียบเทียบระดับความเข้มของการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจและแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive หรือ housekeeping gene) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยีน *Actin* เป็นยีนมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ การแสดงออกของยีนที่สนใจคำนวณได้จากค่า relative quantification

บทที่ 4

ผลวิจัยและอภิปรายผล

4.1 สืบค้นข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านเชื้อรา

จากฐานข้อมูล GenBank และจากฐานข้อมูลจีโนมมะขาม รูปแบบการแสดงออกของยีนไคตินเนสที่แตกต่างกันเป็นผลให้มีกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสซึ่งเป็นยีนที่มีความสามารถในการต้านเชื้อราที่แตกต่างกัน โดย ในมะขามพันธุ์ปลูกที่มีความต้านทานต่อเชื้อราจะมีการแสดงออกของยีนไคตินเนสมากกว่ายีนไคตินเนสในมะขามพันธุ์ปลูกที่มีความอ่อนต่อเชื้อรา และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของยีนไคตินเนสในมะขาม จะพบว่ามีลำดับที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank Accession number HM222538 ซึ่งเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงของยีนต้านเชื้อรา

4.2 การออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3

หลังจากสืบค้นข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 version 0.4.0 จากเว็บไซต์ <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> ได้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 20 นิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 5 คู่ไพรเมอร์ โดยมีคู่ไพรเมอร์ คู่ และ Actin 2 คู่ การคัดเลือกไพรเมอร์พิจารณาจากการที่คู่ไพรเมอร์มีปริมาณรวมของเบส G และ C ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากต้องใช้ไพรเมอร์นี้ซึ่งได้แก่ไพรเมอร์ Chitinase ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในหลอดทดลองเดียวกันกับไพรเมอร์ Actin การเลือกไพรเมอร์นี้จึงต้องเลือกไพรเมอร์คู่ที่มีค่า Tm (melting temperature) ให้ใกล้เคียงกัน ไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายเพียงตำแหน่งเดียวบนสายต้นแบบ ไม่ควรมีลำดับเบสที่จับคู่กับลำดับเบสของตัวเองหรือจับกับคู่ไพรเมอร์ของตัวเอง และไพรเมอร์ต้องจับบริเวณ coding sequence ซึ่งข้อมูลที่เป็น coding sequence เป็นข้อมูลที่แสดงไว้ในแบบรายงานผลการสืบค้นข้อมูลยีน Chitinase ที่มี accession number HM222538 มีส่วนของ coding sequence ในช่วงของเบสตำแหน่งที่ 313 ถึง 494 ไพรเมอร์แต่ละคู่กำหนดบริเวณที่ถูกเพิ่มปริมาณเพื่อให้ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ 200 bp ซึ่งเป็นการสะดวกในการตรวจผล ซึ่งแสดงรายละเอียดการออกแบบไพรเมอร์ไว้ในตารางที่ 5 และแผนภาพแสดงตัวอย่างการเข้าจับของไพรเมอร์บนตำแหน่งของลำดับเบสจากยีนที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 1 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณขึ้นยีน

ไพรเมอร์	ลำดับ 5' – 3'	ปริมาณ G + C (%)	Tm (°C)	ตำแหน่งที่ ไพรเมอร์เข้าจับ	ขนาด ผลผลิต (bp)
<i>Chitin 1F</i>	GAGTCATCTTCACGCCCATT	50	60.10	313-494	182
<i>Chitin 1R</i>	CCCAAGTAGGCATCAGGAAA	50	60.10		
<i>Chitin 2F</i>	AGCTGGTCATTGTGGTCCTC	55	60.10	123-332	210
<i>Chitin 2R</i>	AATGGGCGTGAAGATGACTC	50	60.10		
<i>Chitin 3F</i>	GAGTCATCTTCACGCCCATT	50	60.10	313-514	202
<i>Chitin 3R</i>	GGCCTGTTTGCCGTAAAGTA	50	60.10		
<i>Chitin 4F</i>	AGCTGGTCATTGTGGTCCTC	55	60.10	123-311	189
<i>Chitin 4R</i>	CCTCCCAAGAAATTGTTCCA	45	59.90		
<i>Chitin 5F</i>	GAAGCATGTGCAACAGGAAA	45	59.80	37-215	179
<i>Chitin 5R</i>	AGCATCACCTTGATCCCTTG	50	60.10		

จากตารางรายละเอียดไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) แสดงตัวอย่างบริเวณตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Chitinase* ดังแสดงในภาพที่ 7-11

ภาพที่ 7 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 1 และตำแหน่งเข้าจับบนลำดับยีน *Chitinase* ที่ตำแหน่ง 313-494 บริเวณแถบสีเทา คือ บริเวณที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. TATTGGGGCC AAAACGGTA ATGAAGCAAG CCTAGCAGAA GCATGTGCAA CAGGAAAGTAT
61 TCTTATGTAA ACATAGCCTT CCTTAACAAG TTTGGTAATG GCCAAGCTCC AGAAATCTTC
121 ATAGCTGGTC ATTGTGGTCC TCCCTTTTCA AACAAATTGCT CTCTGGTTGG CAGCGACATC
181 AAAAAATGCC AAAACCAAGG GATCAAGGTG ATGCTATCTA TTGGAGGGGC GAGTGGGAGT
241 AGTTACTCTC TTGCTTCCTC GGGTGATGCT AAAAAATGTTT CTGATTACT TGTGGAACAA
301 TTTCTTGGGA GGCGAGTCAT CTTCACGCCC ATTAGGGGAC GCCGTATTAG ATGGCATAGA
361 TTTTGAGATA TTAAATAACA GCACAAGATA TCATGAAGAC CTAGCGGGTC ACCTCAAGTC
421 ACATAGCACT ACGACTCAAA AATATGTTTA CTTGAGTGCA GCACCTCAGT GCCCATTTCTCT
481 GATGCCTACT TGGGTACTTT ACGGCAAACA GGCCTTTTGG ACTATGTTTG GGTGCAATTC
541 TACAATGATC CTCCTGCCA ATATAGCCAG GGAAATGTTG ATGATCTTAT GAAATCTTGG
601 AAATCATGGT CAATACATTT AAAAGAGAGG AAAGTATTTT TGGGGTTGCC AGCATCTCCG
661 GCAGCAGCTG GTGGTTATGT TCCTCCTGAT GTTCTTAATT CTCAAATCTC TCCTGCTATTA
721 AAGGTTCTTC TTATGGTGGT GTTATGCTTT GG

ภาพที่ 8 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 2 และตำแหน่งเข้าจับบนลำดับยีน *Chitinase* ที่ตำแหน่ง 123-332 บริเวณแถบสีเทา คือ บริเวณที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

```

1. TATTGGGGCC AAAACGGTA ATGAAGCAAG CCTAGCAGAA GCATGTGCAA CAGGAAAGTAT
61 TCTTATGTAA ACATAGCCTT CCTTAACAAG TTTGGTAATG GCCAAGCTCC AGAAATCTTC
121 ATAGCTGGTC ATTGTGGTCC TCCCTTTTCA AACAAATTGCT CTCTGGTTGG CAGCGACATC
181 AAAAAATGCC AAAACCAAGG GATCAAGGTG ATGCTATCTA TTGGAGGGGC GAGTGGGAGT
241 AGTTACTCTC TTGCTTCCTC GGGTGATGCT AAAAAATGTTT CTGATTACT TGTGGAACAA
301 TTTCTTGGA GCGAGTCAT CTTACGCCC ATTAGGGGAC GCCGTATTAG ATGGCATAGA
361 TTTTGAGATA TTAAATAACA GCACAAGATA TCATGAAGAC CTAGCGGGTC ACCTCAAGTC
421 ACATAGCACT ACGACTCAAA AATATGTTTA CTTGAGTGCA GCACCTCAGT GCCCATTTCTC
481 GATGCCTACT TGGGTACTTT ACGGCAAACA GGCCTTTTGG ACTATGTTTG GGTGCAATTC
541 TACAATGATC CCACTGCCA ATATAGCCAG GGAAATGTTG ATGATCTTAT GAAATCTTGG
601 AAATCATGGT CAATACATTT AAAAGAGAGG AAAGTATTTT TGGGGTTGCC AGCATCTCCG
661 GCAGCAGCTG GTGGTTATGT TCCTCCTGAT GTTCTTAATT CTCAAATCT TCCTGCTATTA
721 AAGGTTCTTC TTATGGTGGT GTTATGCTTT GG

```

ภาพที่ 9 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 3 และตำแหน่งเข้าจับบนลำดับยีน *Chitinase* ที่ตำแหน่ง 313-514 บริเวณแถบสีเทา คือ บริเวณที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

```

1. TATTGGGGCC AAAACGGTA ATGAAGCAAG CCTAGCAGAA GCATGTGCAA CAGGAAAGTAT
61 TCTTATGTAA ACATAGCCTT CCTTAACAAG TTTGGTAATG GCCAAGCTCC AGAAATCTTC
121 ATAGCTGGTC ATTGTGGTCC TCCCTTTTCA AACAAATTGCT CTCTGGTTGG CAGCGACATC
181 AAAAAATGCC AAAACCAAGG GATCAAGGTG ATGCTATCTA TTGGAGGGGC GAGTGGGAGT
241 AGTTACTCTC TTGCTTCCTC GGGTGATGCT AAAAAATGTTT CTGATTACT TGTGGAACAA
301 TTTCTTGGA GCGAGTCAT CTTACGCCC ATTAGGGGAC GCCGTATTAG ATGGCATAGA
361 TTTTGAGATA TTAAATAACA GCACAAGATA TCATGAAGAC CTAGCGGGTC ACCTCAAGTC
421 ACATAGCACT ACGACTCAAA AATATGTTTA CTTGAGTGCA GCACCTCAGT GCCCATTTCTC
481 GATGCCTACT TGGGTACTTT ACGGCAAACA GGCCTTTTGG ACTATGTTTG GGTGCAATTC
541 TACAATGATC CCACTGCCA ATATAGCCAG GGAAATGTTG ATGATCTTAT GAAATCTTGG
601 AAATCATGGT CAATACATTT AAAAGAGAGG AAAGTATTTT TGGGGTTGCC AGCATCTCCG
661 GCAGCAGCTG GTGGTTATGT TCCTCCTGAT GTTCTTAATT CTCAAATCT TCCTGCTATTA
721 AAGGTTCTTC TTATGGTGGT GTTATGCTTT GG

```

ภาพที่ 10 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 4 และตำแหน่งเข้าจับบนลำดับยีน *Chitinase* ที่ตำแหน่ง 123-311 บริเวณแถบสีเทา คือ บริเวณที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

```

1. TATTGGGGCC AAAACGGTA ATGAAGCAAG CCTAGCAGAA GCATGTGCAA CAGGAAAGTAT
61 TCTTATGTAA ACATAGCCTT CCTTAACAAG TTTGGTAATG GCCAAGCTCC AGAAATCTTC
121 ATAGCTGGTC ATTGTGGTCC TCCCTTTTCA AACAATTGCT CTCTGGTTGG CAGCGACATC
181 AAAAAATGCC AAAACCAAGG GATCAAGGTG ATGCTATCTA TTGGAGGGGC GAGTGGGAGT
241 AGTTACTCTC TTGCTTCCTC GGGTGATGCT AAAAAATGTTT CTGATTACT TGTGGAACAA
301 TTTCTTGGA GCGAGTCAT CTTACGCCC ATTAGGGGAC GCCGTATTAG ATGGCATAGA
361 TTTTGAGATA TTAAATAACA GCACAAGATA TCATGAAGAC CTAGCGGGTC ACCTCAAGTC
421 ACATAGCACT ACGACTCAAA AATATGTTTA CTTGAGTGCA GCACCTCAGT GCCCATTTCTC
481 GATGCCTACT TGGGTACTTT ACGGCAAACA GGCCTTTTGG ACTATGTTTG GGTGCAATTC
541 TACAATGATC CCACTGCCA ATATAGCCAG GGAAATGTTG ATGATCTTAT GAAATCTTGG
601 AAATCATGGT CAATACATTT AAAAGAGAGG AAAGTATTTT TGGGGTTGCC AGCATCTCCG
661 GCAGCAGCTG GTGGTTATGT TCCTCCTGAT GTTCTTAATT CTCAAATCT CTCTGCTATTA
721 AAGGTTCTTC TTATGGTGGT GTTATGCTTT GG

```

ภาพที่ 11 ไพรเมอร์ชื่อ Chitin 5 และตำแหน่งเข้าจับบนลำดับยีน *Chitinase* ที่ตำแหน่ง 37-215 บริเวณแถบสีเทา คือ บริเวณที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

```

1. TATTGGGGCC AAAACGGTA ATGAAGCAAG CCTAGCAGAA GCATGTGCAA CAGGAAAGTAT
61 TCTTATGTAA ACATAGCCTT CCTTAACAAG TTTGGTAATG GCCAAGCTCC AGAAATCTTC
121 ATAGCTGGTC ATTGTGGTCC TCCCTTTTCA AACAATTGCT CTCTGGTTGG CAGCGACATC
181 AAAAAATGCC AAAACCAAGG GATCAAGGTG ATGCTATCTA TTGGAGGGGC GAGTGGGAGT
241 AGTTACTCTC TTGCTTCCTC GGGTGATGCT AAAAAATGTTT CTGATTACT TGTGGAACAA
301 TTTCTTGGA GCGAGTCAT CTTACGCCC ATTAGGGGAC GCCGTATTAG ATGGCATAGA
361 TTTTGAGATA TTAAATAACA GCACAAGATA TCATGAAGAC CTAGCGGGTC ACCTCAAGTC
421 ACATAGCACT ACGACTCAAA AATATGTTTA CTTGAGTGCA GCACCTCAGT GCCCATTTCTC
481 GATGCCTACT TGGGTACTTT ACGGCAAACA GGCCTTTTGG ACTATGTTTG GGTGCAATTC
541 TACAATGATC CCACTGCCA ATATAGCCAG GGAAATGTTG ATGATCTTAT GAAATCTTGG
601 AAATCATGGT CAATACATTT AAAAGAGAGG AAAGTATTTT TGGGGTTGCC AGCATCTCCG
661 GCAGCAGCTG GTGGTTATGT TCCTCCTGAT GTTCTTAATT CTCAAATCT CTCTGCTATTA
721 AAGGTTCTTC TTATGGTGGT GTTATGCTTT GG

```

4.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

4.3.1 การสกัดแยกอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช

จากการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างใบมะขามที่อายุประมาณ 30 วันทั้ง 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ชันดี ศรีชมภู เพชรบัวทอง สีทอง และประกายทองและนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณความเข้มข้นจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนน้อยจะมีค่าสัดส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.9 – 2.1 ดังแสดงในตารางที่ 6 หลังจากนั้นนำค่า A_{260} ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอมาคำนวณความเข้มข้น(สมการหน้าที่ 39) และนำอาร์เอ็นเอเข้าสู่ปฏิกิริยา RT-PCR

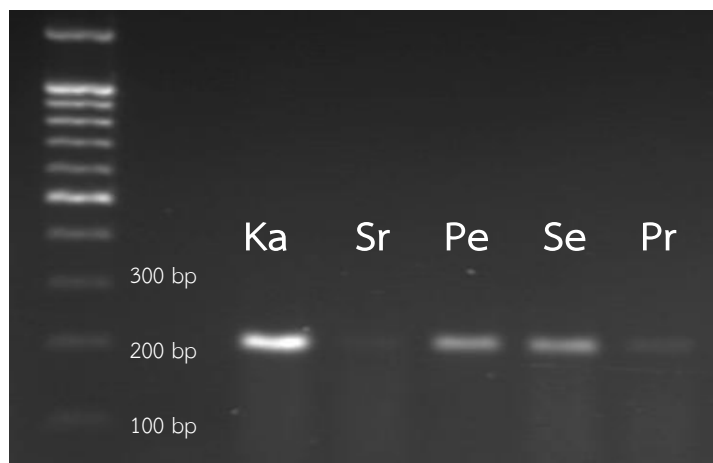
ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอส่วนใบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่างที่	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	ความเข้มข้นอาร์เอ็นเอ ($\mu\text{g/ml}$)
ชันดี	0.457	0.243	1.880	91.4
ศรีชมภู	0.309	0.160	1.931	61.8
เพชรบัวทอง	0.280	0.142	1.971	56.0
สีทอง	0.293	0.150	1.953	58.6
ประกายทอง	0.246	0.114	2.157	49.2

4.3.2 การตรวจผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วย Agarose gel

ภายหลังจากการทำปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA เรียบร้อยแล้วเพิ่มขึ้นยีนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบด้วยโปรแกรม primer3 ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา ได้แก่ อุณหภูมิในการเข้าจับกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (Annealing temperature, T_A) ของไพรเมอร์ จากนั้นตรวจสอบผลบน agarose gel 1.5% บนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพด้วยกล้อง polaroid camera จากการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ Chitanase ให้ผลค่อนข้างดี โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ตรง

กับที่ได้ทำการออกแบบไว้ มีแถบของดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียง 200 bp เกิดขึ้นตามที่โปรแกรมกำหนด และยังพบแถบดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 100 bp เกิดขึ้นบางส่วนดังแสดงในภาพที่ 12-13



ภาพที่ 12 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ของยีน Chitinase (ใกล้เคียง 200 bp)



ภาพที่ 13 ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ของยีน Chitinase (ใกล้เคียง 200 bp) และยีน Actin (ใกล้เคียง 250 bp)

กำหนดให้ Ka = ชันดี Sr = ศรีชมภู
 Pe = เพชรบูรณ์ Se = สีทอง Pr = ปรายทอง

4.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

การแสดงออกของยีนเป็นกระบวนการการถ่ายทอดข้อมูลทางชีวภาพหรือข้อมูลทางพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ในดีเอ็นเอไปยัง mRNA แล้วแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกเซลล์จะต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรม ในระหว่างการเจริญเติบโตและการพัฒนาการต่างๆ แต่ละเซลล์จะมีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ต่างเวลาหรือต่างวาระกัน การควบคุมการแสดงออกของยีนแบ่งเป็นสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนระหว่างกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) โดยเป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ลำดับเบสบนสาย mRNA จะถูกกำหนดโดยลำดับของเบสบนสายดีเอ็นเอแม่แบบ และขั้นตอนการแปลรหัสพันธุกรรม (translation) เป็นขั้นตอนการแปลรหัสเพื่อสังเคราะห์เป็นโพลีเปปไทด์ หรือโปรตีน การแสดงออกของยีนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์เพื่อตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมหนึ่งๆ การแสดงออกของยีนจึงมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วย เมื่อเซลล์ต้องการโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งมากขึ้น จึงต้องมีกระบวนการถอดรหัสจากแม่พิมพ์ดีเอ็นเอให้เป็นอาร์เอ็นเอมากขึ้นตามไปด้วย

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะเครียดเกลือซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่ ยีน *Chitinase* ซึ่งเมื่อตรวจผลของดีเอ็นเอของยีนที่คาดว่าจะเป็ยีน *Chitinase* ที่ได้จากการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และเพิ่มปริมาณขึ้นยีนที่คาดว่าจะเป็ยีน *Chitinase* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ตรวจผล gel electrophoresis จาก agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ด้วยเครื่องฉาย UV บันทึกภาพด้วยกล้อง polaroid camera จากนั้นนำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม photocaptMw ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้วัดค่าความเข้มแสงจากการเรืองแสงโดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ในโปรแกรมนี้นี้คือ เข้าสู่โปรแกรมและเลือก file ของภาพที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นเลือก lane definition เพื่อใส่จำนวนแถวที่ต้องการวิเคราะห์แล้วเลือก separation โปรแกรมจะแสดงแถวเท่ากับจำนวนแถวที่ใส่ลงไป ใน lane definition จากนั้นเลือกที่ detection band แล้วป้อนจำนวนแถวที่ต้องการวิเคราะห์ และเลือกที่ detection โปรแกรมจะแสดงเส้นสีบนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากนั้นเลือกที่ volume ซึ่งโปรแกรมจะแสดงค่าความสูง พื้นที่บริเวณที่พบแถบดีเอ็นเอและตารางแสดงผลเป็นตัวเลขของค่าดังกล่าวดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งเมื่อแถบดีเอ็นเอที่พบมีความเข้มแสงสูงและมีความคมชัดค่าที่แสดงจากโปรแกรมจะมีค่าสูงตามไปด้วย ซึ่งหากมีปริมาณดีเอ็นเอมาก หมายถึงมีการแสดงออกของยีนมากขึ้นด้วยเช่นกัน จากค่าดังกล่าวสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อหาการแสดงออกของยีนในแต่

ละตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ จากนั้นหารระดับแสดงออกของยีนโดยคำนวณจากค่า relative quantification ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกมาตรฐานของยีน *Actin* ซึ่งผลการคำนวณแสดงไว้ในตารางที่ 3

เมื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR จากอาร์เอ็นเอของเนื้อเยื่อใบมะขามพันธุ์ปลูก ชันดี ศรีชมภู เพชรบัวทอง สีทอง และประกายทองร่วมกับไพรเมอร์แบบจำเพาะต่อยีน *Chitinase* เทียบกับยีน *Actin* โดยใช้ต้นแบบอาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งคำนวณได้จากการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และสมการในหน้าที่ 40 ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *Chitinase* เทียบกับยีน *Actin* พบว่า ในเนื้อเยื่อมะขามพันธุ์ปลูก ชันดี เพชรบัวทอง และสีทอง ซึ่งโดยธรรมชาติแล้วมีเชื้อราบริเวณบริเวณฝักและใบค่อนข้างน้อย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ มีค่าการแสดงออกของยีน *Chitinase* ค่อนข้างมาก โดยมีค่าเท่ากับ 181 151 และ 166 ตามลำดับ ส่วนมะขามที่มีลักษณะตามธรรมชาติที่มักจะมีเชื้อราค่อนข้างมากได้แก่พันธุ์ปลูกศรีชมภูและประกายทอง ซึ่งมีค่าการแสดงออกของยีนที่ได้จากการอ่านค่าความสว่างจากภาพ gel electrophoresis ที่ 132 และ 118 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น ทำให้ทราบถึงว่า ในพืชพันธุ์ปลูกที่มีความทนหรือต้านทานต่อเชื้อราซึ่งสังเกตได้จากลักษณะภายนอกที่มักมีการเข้าบุกรุกของเชื้อราค่อนข้างน้อย มีการแสดงออกหรือการมีอยู่ของ mRNA หรือ messenger RNA ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่ในการคัดลอกรหัสจากบริเวณยีนบนสายดีเอ็นเอเพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีน หรือเอนไซม์ต่างๆเพื่อหวังผลในการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี กระบวนการสร้างสารประกอบ กระบวนการสลายสารประกอบ การย่อยสลายสาร หรือการเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้พืชสามารถมีกระบวนการทางชีวเคมีได้อย่างปกติ กระบวนการเจริญเติบโต กระบวนการในการเจริญพันธุ์ หรือแม้กระทั่งกระบวนการปกป้องตัวเองให้รอดพ้นจากอันตรายจากสภาวะแวดล้อม โรค และแมลง ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ เชื้อราซึ่งเป็นสิ่งรบกวนที่ทำให้มะขามเกิดโรค ส่งผลกระทบให้การเจริญเติบโตผิดปกติ ลดลง หรือตายในที่สุด หรือรบกวนกระบวนการสืบพันธุ์ การเจริญและการสุกแก่ของฝัก ภายนอกหรือพื้นผิวของเซลล์เชื้อรามักประกอบด้วยสารประกอบ Chitin เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า มะขามที่พบในสภาพธรรมชาติที่มีการเกิดเชื้อราหรือมีการรบกวนของเชื้อราค่อนข้างน้อย มักพบว่ามีแสดงออกของยีนหรือมีการปรากฏตัวของยีน *Chitinase* ในระดับที่สูงเมื่อเทียบกับมะขามพันธุ์ปลูกที่มีการติดเชื้อราหรือถูกรบกวนจากเชื้อราซึ่งให้ผลในการแสดงออกของยีนที่ค่อนข้างน้อยกว่า จากการทดลองนี้ สรุป

ได้เบื้องต้นว่า มะขามพันธุ์ปลูกที่มีการแสดงออกของยีน *Chitinase* ที่มากกว่า อาจส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน *Chitinase* ที่มากกว่าด้วย เป็นผลให้เมื่อเชื้อราเข้าบุกรุก ยีน *Chitinase* ซึ่งเป็นยีนที่นำรหัสไปสังเคราะห์เอนไซม์ *Chitinase* เพื่อย่อยสลายสารประกอบ Chitin ซึ่งพบมากพบพื้นผิวเซลล์ของเชื้อรา เมื่อเชื้อราเข้าบุกรุกมะขามพันธุ์ปลูกดังกล่าว จึงส่งผลให้เชื้อราที่บุกรุกนั้นถูกเอนไซม์ *Chitinase* ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนั้นเข้าทำลายผนังเซลล์ เป็นผลให้เชื้อราถูกทำลาย ลดจำนวนลงและหมดไปในที่สุด เป็นผลให้มะขามพันธุ์ปลูกนั้นรอดพ้นจากการบุกรุกของเชื้อรา และสามารถเจริญเติบโตและออกดอกออกผลได้อย่างปรกติภายใต้สภาวะที่มีการระบาดของเชื้อราเมื่อเทียบกับพันธุ์ปลูกอื่นๆที่มีการแสดงออกของยีน *Chitinase* ที่มีการแสดงออกที่น้อยกว่า

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม photocaptMw

Cultivar Gene	replace	ชั้นตรี	สีชมพู	เพชรบัวทอง	สีทอง	ประกายทอง
Chitinase	1	153	112	134	156	107
Actin	1	249	241	251	251	253
Chitinase	2	188	147	145	171	112
Actin	2	230	224	221	222	225
Chitinase	3	186	135	142	166	132
Actin	3	222	220	220	220	226
Chitinase	4	195	141	165	175	124
Actin	4	218	229	224	227	221
Chitinase	5	184	128	171	162	115
Actin	5	221	224	221	224	224
Chitinase	$\bar{X}$	181	132	151	166	118
Actin	$\bar{X}$	228	227	227	228	229

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

หลังจากการตรวจผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วย agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลผลิตในส่วนที่คาดว่าจะเป็ยีน *Chitinase* ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่ได้จากการโปรแกรมการออกแบบไพรเมอร์ คือประมาณ 182 bp และ 210 bp ตามลำดับ แต่เนื่องจากการตรวจผลลักษณะนี้ไม่สามารถทราบได้เลยว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นเป็นชิ้นยีนตรงกับยีนตามที่ต้องการหรือไม่ จึงทำการส่งผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็ยีน *Chitinase* ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท ไบโอดีไซน์จำกัด อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี โดยวิเคราะห์ลำดับของดีเอ็นเอทั้งสาย forward และสาย reverse เมื่อได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank โดยเปรียบเทียบกับโปรแกรม BLAST 2 SEQUENCE (bl2seq) และ Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide (BLASTN)

หลังจากที่ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Chitinase* แล้ว นำชุดข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งเป็นข้อมูลของยีน *Chitinase* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เปรียบเทียบโดยโปรแกรม BLAST (bl2seq) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับลำดับที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์หรือไม่

ตารางที่ 4 ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันของดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็ยีน *Chitinase* จากการทำ DNA sequencing และยีน *Chitinase*

Primer pair	<i>Chitinase</i> จาก DNA sequencing	<i>Chitinase</i> จาก PCR product	Identities	
			Number	(%)
1	367-435	313-494	68	37.36
2	155-298	123-332	143	68.10
3	344-489	313-514	145	71.78
4	141-297	123-311	156	82.53
5	56-188	37-215	132	73.74

จากผลการทดลองดังกล่าว ไพรเมอร์มีการเข้าจับและสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้แต่เมื่อตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้เป็นต้นแบบ ซึ่งคาดว่าจะเกิดจากการเข้าจับของไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนชนิดนั้นเพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ไม่ดีของไพรเมอร์ จึงได้นำชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของยีนด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide (BLASTN) จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ทำให้ทราบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มี Accession number HM222538 มีขนาด 753 bp ยีนดังกล่าวมีลักษณะเหมือนกับยีน *Chitinase* มีตำแหน่งที่เป็น coding sequence ที่ตำแหน่ง 1-753 พบใน *Tamarindus indica* Group ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากปฏิกิริยาการทำ DNA sequencing มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันที่ตำแหน่ง 37-514 จากไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีค่าร้อยละใกล้เคียงกับ PCR product ที่ทำการออกแบบไว้ด้วยโปรแกรม Primer 3 มีค่าเท่ากับ 37.36 68.10 71.78 82.53 และ 73.74 ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคตินเนสจากมะขามด้วยเทคนิค พีซีอาร์ ของมะขามที่ต้านเชื้อราและต้นที่ติดเชื้อรา จากมะขาม 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ขันตี ศรีชมภู เพชรบัวทอง สีทอง และประกายทองการ โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR จากเนื้อเยื่อใบมะขามขันตี ศรีชมภู เพชรบัวทอง สีทอง และประกายทองการร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม primer 3 เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *Chitinase* และเปรียบเทียบการแสดงออกกับยีน *Actin* สามารถสรุปได้ว่า ในพืชพันธุ์ปลูกที่มีความทนหรือต้านทานต่อเชื้อราซึ่งสังเกตได้จากลักษณะภายนอกที่มักมีการเข้าบุกรุกของเชื้อราค่อนข้างน้อย มีการแสดงออกหรือการมีอยู่ของ mRNA หรือ messenger RNA ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่ในการคัดลอกรหัสจากบริเวณยีนบนสายดีเอ็นเอเพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีน หรือเอนไซม์ต่างๆเพื่อหวังผลในการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเพื่อให้พืชสามารถมีกระบวนการทางชีวเคมีได้อย่างปกติ กระบวนการเจริญเติบโต กระบวนการในการเจริญพันธุ์ หรือแม้กระทั่งกระบวนการปกป้องตัวเองให้รอดพ้นจากอันตรายจากสภาวะแวดล้อม โรค และแมลง ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ เชื้อราซึ่งเป็นสิ่งรบกวนที่ทำให้มะขามเกิดโรค ส่งผลกระทบให้การเจริญเติบโตผิดปกติ ลดลง หรือตายในที่สุด หรือรบกวนกระบวนการสืบพันธุ์ การเจริญและการสุกแก่ของฝัก ภายนอกหรือพื้นผิวของเซลล์เชื้อรามักประกอบด้วยสารประกอบ Chitin เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า มะขามที่พบในสภาพธรรมชาติที่มีการเกิดเชื้อราหรือมีการรบกวนของเชื้อราค่อนข้างน้อย มักพบที่มีการแสดงออกของยีนหรือมีการปรากฏตัวของยีน *Chitinase* ในระดับที่สูงเมื่อเทียบกับมะขามพันธุ์ปลูกที่มีการติดเชื้อราหรือถูกรบกวนจากเชื้อราซึ่งให้ผลในการแสดงออกของยีนที่ค่อนข้างน้อยกว่า จากการทดลองนี้ สรุปได้เบื้องต้นว่า มะขามพันธุ์ปลูกที่มีการแสดงออกของยีน *Chitinase* ที่มากกว่าอาจส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน *Chitinase* ที่มากกว่าด้วย เป็นผลให้เมื่อเชื้อราเข้าบุกรุก ยีน *Chitinase* ซึ่งเป็นยีนที่นำรหัสไปสังเคราะห์เอนไซม์ Chitinase เพื่อย่อยสลายสารประกอบ Chitin ซึ่งพบมากพบพื้นผิวเซลล์ของเชื้อรา เมื่อเชื้อราเข้าบุกรุกมะขามพันธุ์ปลูกดังกล่าว จึงส่งผลให้เชื้อราที่บุกรุกนั้นถูกเอนไซม์ Chitinase ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนั้นเข้าทำลายผนังเซลล์ เป็นผลให้เชื้อราถูกทำลาย ลดจำนวนลงและหมดไปในที่สุด เป็นผลให้มะขามพันธุ์ปลูกนั้นรอดพ้นจากการบุกรุกของเชื้อรา และสามารถเจริญเติบโตและออกดอกออกผลได้อย่างปกติภายใต้สภาวะที่มีการระบาดของเชื้อราเมื่อเทียบกับพันธุ์ปลูกอื่นๆที่มีการแสดงออกของยีน *Chitinase* ที่มีการแสดงออกที่น้อยกว่า

จากผลการตรวจสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อรา พบว่า ในมะขามพันธุ์ปลูกที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา มักพบที่มีการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเป็ยีน *Chitinase* นี้ด้วย ซึ่งได้ทำการ

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวด้วย ไพรเมอร์มีการเข้าจับและสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ และส่งขึ้นดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และนำชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของยีนด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide (BLASTN) จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมทำให้ทราบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มี Accession number HM222538 มีขนาด 753 bp ยีนดังกล่าวมีลักษณะเหมือนกับยีน *Chitinase* มีตำแหน่งที่เป็น coding sequence ที่ตำแหน่ง 1-753 พบใน *Tamarindus indica* Group ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากปฏิกิริยาการทำ DNA sequencing มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันที่ตำแหน่ง 37-514 จากไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีค่าร้อยละใกล้เคียงกับ PCR product ที่ทำการออกแบบไว้ด้วยโปรแกรม Primer 3 มีค่าเท่ากับ 37.36 68.10 71.78 82.53 และ 73.74 ตามลำดับ ซึ่งตรงกับความคาดหวังที่ตั้งไว้

ข้อเสนอแนะจากการวิจัยในครั้งนี้คือ ในพืชหลายชนิดมีกลไกในการป้องกันตนเองจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อกีเจริญเติบโต ด้วยวิธีต่างๆหลายวิธี วิธีการหนึ่งคือ การกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนเพื่อผลิตเอนไซม์บางชนิดในการต่อต้าน ยั้งยั้ง หรือทำลายศัตรูที่มาบุกรุก จากการศึกษาพบว่า มะขามในแต่ละพันธุ์ปลูกมีการติดเชื้อราในระดับที่แตกต่างกันไป บางชนิดมีการติดเชื่อน้อยหรือไม่ติดเชื้อเลย ส่วนหนึ่งเป็นมะขามเปรี้ยวซึ่งอาจเป็นเพราะมีปริมาณน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเชื่อน้อย แต่ในขณะเดียวกัน มะขามบางพันธุ์ปลูกมีความหวานพอประมาณ แต่พบว่ามีการติดเชื่อก่อนข้างน้อย ซึ่งหากเป็นเช่นนั้นแล้ว จะต้องมีการศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีนบางประการที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อการต้านทานเชื้อรา ซึ่ง นันทา เชิงเชาว์ (2555) ได้ทำการศึกษการแสดงออกของยีน *beta-1, 3-glucanase* และ *Chitinase* ในยางพาราพบว่า ยางพาราพันธุ์ปลูกที่มีการติดเชื้อราแบ่งอย่างรุนแรง มีการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับยางพาราพันธุ์ปลูกที่ไม่ค่อยติดเชื้อราซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีนทั้งสองที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้สามารถเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อพัฒนาพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่มีปัญหาเกิดความเสียหายจากโรคและแมลงให้มีความสามารถต้านทานโรคและแมลงได้ดียิ่งขึ้นจากความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์ต่อไป

บรรณานุกรม

กนก ชวนานนท์. (2534). คู่มือมะขามหวาน. กรุงเทพฯ: มิตรสยาม.

กนกพร บุญศิริชัย วไลลักษณ์ แพทย์วิบูลย์ อำนวย อรรถถาวร รอง วันเพ็ญ ศรีทองชัย และวิชัย ภูมิปัญญานิช. (2550). **การค้นหาค้นหาส่วนของดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะกลายตาดานทานโรคเส้นใบเหลืองในกระเจี๊ยบเขียวที่ได้จากการฉายรังสี**. กลุ่มวิจัยและพัฒนาชีวเคมีฯ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ, สถาบันวิจัยพืชสวน, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

กรมทรัพยากรทางปัญญา. (2548). ประกาศโฆษณาการรับขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์. สืบค้นเมื่อ 26 มกราคม 2549, จาก <http://www.ipthailand.org/upload/Geography>

กองบรรณาธิการกลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า. (2530). ไม้ผลไทยมะขามหวาน. กรุงเทพฯ: หจก. รุ่งเรืองสารสินการพิมพ์.

กองบรรณาธิการเฉพาะกิจ. (2542). มะขามหวาน. กรุงเทพฯ: ศูนย์ตำราเกษตรเพื่อชนบท.

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2548). เอกสารเผยแพร่ อันดับที่ 34 เรื่อง "การปลูกมะขาม". สืบค้นเมื่อวันที่ 10 ธันวาคม 2548, จาก <http://www.doae.go.th/library/html/detail/tamarind>

ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์ วิภาวี ชื่นโรจน์ สมวงศ์ ตระกูลรุ่ง สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2552. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันจากเหมืองข้อมูล ESTs. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี.

จันทิพย์ สิงห์ตุนภาพร แก้วดวงดีและประภาทิพย์ เอี่ยมโสภณา. (2555). **การตรวจหาและจำแนกพยาธิตัวกลมอะนิซาคิสโดยเทคนิคพีซีอาร์-เรสตริกชันเอนโดนิวคลีเอส**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา. กรุงเทพฯ.

ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. (2540). **การศึกษาปริมาณสารอาหารบางชนิด ในมะขามพันธุ์สีทอง และศรีชมภู**. สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ. มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์. สุรินทร์.

ฐานข้อมูลทรัพยากรพืชพรรณของฝ่ายปฏิบัติการวิจัย. (2549). "มะขามหวาน". สืบค้นเมื่อวันที่ 9 ธันวาคม 2549, จาก http://clgc.rdi.ku.ac.th/resource/fruit/sweet_tamarind

นพรัตน์ อินทร์. (2552). การปรับปรุงพันธุ์บานชื่นเลื้อยใบต่างโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบญจพร ศรีสุวรรณ และจินตนา สนามชัยสกุล. 2552. ศึกษาช่วงเวลาการติดเชื้อมะพร้าวและผลของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สารสกัดสมุนไพร สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ ที่มีต่อเชื้อราจากมะขามหวานพันธุ์ประกายทองในห้องปฏิบัติการ. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปีการศึกษา 2552.

- ปฏิกานี ชันธโภค.(2550). **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประเมินทางเคมีของมะขามบางสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายที่ดี**. วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- พิจิตร โชคพัฒนา. (2546). โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. นนทบุรี: เกษตรสาส์น.
- เพชรบูรณ์. (2548). งานกาชาดมะขามหวานนครบาลเพชรบูรณ์. สืบค้นเมื่อ 3 ตุลาคม 2549, จาก <http://www.phetchabun.police.go.th/tour/history06.htm>
- มะขามหวานพันธุ์ต่าง ๆ (2550). “มะขามหวานที่นิยมปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์” สืบค้นเมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2550, จาก <http://www.phetchabun.doe.go.th/detailtam.html>
- มานะ ขาวเมฆ. 2554. การแสดงออกของไคตินเนสจากกระถินบ้านในข้าวไทยและข้าวญี่ปุ่น. โครงการงานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- วรินตรา ยอดไธสงแสงแข พงษ์ธนศำไพรินทร์ มุ่งมาตรจิษณวรรณแสง และนิวัตร จันท์ศิริพรชัย : **การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ ในการเก็บรักษาสารพันธุ์กรรมของ มัยโคพลาสมา กัลป์ลิเชพติคุม ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน**.สัตวแพทยสาร ฉบับที่ 1 :2557.
- วุฒิพงศ์ มหาคำ.(2554).DNA barcodes ของพืช หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด.ศูนย์วิจัยอนุรักษ์มรดกประยุกต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (ม.ป.ป.). คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวิตา แสไพศาล, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และพัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์. 2554. การโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานโรคใบจุดเป่ากระสุนในมะเขือเทศ. วารสารวิจัย มข. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุรินทร์ ปิยะโชติณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5 (2): 37-58
- สุพัตรา โพธิ์เอี่ยมนิชาภัทร ขอบอาภรณ์ตฤณเศรษฐ์ จีระพันธุ์นาคสดา พัทธรักษ์ และอนุรักษโพธิ์เอี่ยม. (ม.ป.ป.).**การระบุเพศของนกแก้วบางชนิด**. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- สุภัทรตันติวิทยมาศบุษบา ฤกษ์อำนวยโชค และสันดีสุขวัจน์. (ม.ป.ป.). **การเก็บดีเอ็นเอจากพื้นผิวหินที่ถูกสัมผัส**. สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม.
- อัญชลีวรรณ เมธีนิยพรมณมล ธนानันต์และธีระชัย ธนानันต์. (ม.ป.ป.).**การเก็บรักษาใบฝรั่งสำหรับสกัดแยกดีเอ็นเอ**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Areshchenkova T. and Ganai M.W. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from

- different sources. *Theor Appl Genet* 104: 229–235.
- Bermúdez-Humarán, L.G., García-García, A., Leal-Garza, C.H., Riojas-Váldez, V., Jaramillo-Rangel, G. and Montes-de-Oca-Luna, R. (2002). **Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds.** *Journal of Experimental Zoology* 292: 677–680.
- Burgoyne, L.A. (1996). **Solid medium and method for DNA storage.** US patent 5, 496, 562.
- Casey, A.E., Jones, K.L., Sandercock, B.K. and Wisely, S.M. (2009). **Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avia sexing.** *Molecular Ecology Resources*. 9: 61–65.
- Cerit, H. and Avanus, K. (2007). **Sex identification in avian species using DNA typing methods.** *World's Poultry Science Journal*. 63: 91–99.
- Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovieh, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayres, N. and Cartinhour, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*. 100: 713–722.
- Cohen-Kupiec, R. and I. Chet. 1998. **The molecular biology of chitin digestion.** *Current Opinion in Biotechnology*. 9: 270–277.
- Dawson, D.A., Darby, S., Hunter, F.M., Krupa, A.P., Jones, I.L. and Burke, T. (2001). **A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z chromosome polymorphism detected in auklets.** *Molecular Ecology Notes*. 1: 201–204.
- Devost, N.C. and Choy, F.Y.M. (2000). **Mutation analysis of Gaucher disease using dot-blood samples on FTA filter paper.** *American Journal of Medical Genetics*. 94: 417–420.
- Drabkova, L. J. Kirschner and C. Vlcek. (2002). Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. **Plant Molecular Biology Reporter**. 20: 161–75.
- Eason, D., Millar, C.D., Cree, A., Halverson, J. and Lambert, D.M. (2001). **A comparison of five methods for assignment of sex in the takahe (Aves: Porphyrio mantelli).** *Journal of Zoology*. 253: 281–292.
- Ellegren, H. (1996). **First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series*. 263: 1635–1641.
- Feng, S.P., Li, W.G., Huang, H.S., Wang, J.Y. and Wu, Y.T. 2009. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Molecular Breeding* 23: 85–9

- Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis substrate-binding and their application. **Curr Protein Peptide**. 1: 105-124.
- Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. (1999). **A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds**. *Journal of Avian Biology*. 30: 116–121.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J.G. (1998). **A DNA test to sex most birds**. *Molecular Ecology*. 7: 1071–1075.
- Guthrie, R. and Susi, A. (1963). **A simple phenylalanine method for the detecting phenylketone urine in large population of new born infants**. *The Journal of Pediatrics*. 32: 338-3343.
- He, G., Woullard, F.E., Marong, I. and Guo, B.Z. 2006. Transferability of Soybean SSR markers in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Science* 33: 22-28.
- Hirokazu Tsukaya, Yu Iokawa, Makiko Kondo and Hideaki Ohba (2005). **Large-scale general collection of wild-plant DNA in Mustang, Nepal**. Tokyo, Japan.
- Ince, A.G., Karaca, M. and Onus, A.N. 2010. Polymorphic microsatellite markers transferable across Capsicum species. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 285-291.
- Kentely, R.V., Rota, M.L., Matthewa, D.E. and Sorrells, M.E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, sorghum and wheat. *Plant Mol Biol*. 48: 501-510.
- Lawrenceville, N.J.; (2007). Tamarind Fruit. Retrieved February 27, 2007, from <http://www.tamarindfruit.com>
- Lampel, K.A., Orlandi, P.A. and Kornegay, L. (2000). **Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food borne bacterial pathogens**. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4539-4542.
- Lim, S.H., Liew, C.F., Lim, C.N., Lee, Y.H. and Goh, C.J. (1997). **A simple and efficient method of DNA isolation from orchid species and hybrids**. *Biologia Plant*. 41(2): 313-316.
- Lodhi, A. M., Y. Guang-Ning, F.W. Norman and I.R. Bruce. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, Vitis species and Ampelopsis. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13.
- Manual on Mutation Breeding. (1977). **IAEA Technical Reports No. 119 Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture**. Vienna, Austria.

- Michiels, A., Van den Ende, W., Tucker, M., Liesbet, V.R., and Laere, A.V., (2003). **“Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants”**. *Analytical Biochemistry*, 315:85-89.
- Pappinen, A., Y. Degefu, L. Syrjala, K. Keinonen and K. von Weissenberg. 2002. **Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola***. *Plant Cell Rept.* Available Source: <http://link.springer.de/search.htm> , November 27, 2002.
- Poncet, V., Rondeau, M., Trachant, C., Cayrel, A., Hamon, S., Kochko, A.D. and Hamon, P. 2006. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as makers for the *Coffea* genus. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 436-449.
- Powell, W., Machray, C., and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci.* 1: 215-222.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 6.
- Schnabel, A.; et al. (2003). Phylogenetic relationships in *Gleditsia* (Leguminosae) based on ITS sequences. *American Journal of Botany*. 90(2): 310-320.
- Schnabel, H.G. (2006). Species Descriptions Part 2. p. 742-744. Retrieved August 8, 2006, from <http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder2003-07-11.4726/PDF>. 2004.
- Tucker, S.C.; (2000). Floral development in tribe Detarieae (Leguminosae: Caesalpinioideae) *Amherstia*, *Brownea* and *Tamarindus*. *American Journal of Botany*. 87(10): 1385-1407.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Chitinase* มะขามที่ใช้ศึกษา Accession number HM222538

Tamarindus indica class III chitinase gene, partial cds

GenBank: HM222538.1

GenBank Graphics

>gi|308212835|gb|HM222538.1| Tamarindus indica class III chitinase gene, partial cds

```
TATTGGGGCCAAAACGGTAATGAAGCAAGCCTAGCAGAAGCATGTGCAACAGGAAAGTATTCTTATGTAA
ACATAGCCTTCCTTAACAAGTTTGGTAATGGCCAAGCTCCAGAAATCTTCATAGCTGGTCATTGTGGTCC
TCCCTTTTCAAACAATTGCTCTCTGGTTGGCAGCGACATCAAAAAATGCCAAAACCAAGGGATCAAGGTG
ATGCTATCTATTGGAGGGGCGAGTGGGAGTAGTTACTCTTTGCTTCCTCGGGTGATGCTAAAAATGTTT
CTGATTACTTGTGGAACAATTTCTTGGGAGGCGAGTCATCTTCACGCCCATTAGGGGACGCCGTATTAGA
TGGCATAGATTTTGAGATATTAATAACAGCACAAGATATCATGAAGACCTAGCGGGTCACCTCAAGTCA
CATAGCACTACGACTCAAAAATATGTTTACTTGAGTGCAGCACCTCAGTGCCCATTTCTGATGCCTACT
TGGGTACTTTACGGCAAAACAGGCCTTTTGGACTATGTTTGGGTGCAATTCTACAATGATCCTCACTGCCA
ATATAGCCAGGAAAATGTTGATGATCTTATGAAATCTTGAAATCATGGTCAATACATTTAAAGAGAGG
AAAGTATTTTTGGGGTTGCCAGCATCTCCGGCAGCAGCTGGTGGTTATGTTCTCTGATGTTCTTAATT
CTCAATTCTTCTGCTATTAAGGTTCTTCTTATGGTGGTGGTTATGCTTTGG
```

The screenshot displays the NCBI GenBank entry for the Tamarindus indica class III chitinase gene, partial cds (Accession number HM222538.1). The page includes the following sections:

- Search Bar:** A search bar with the text "Nucleotide" and a "Search" button.
- Display Settings:** A dropdown menu set to "GenBank".
- Sequence Information:**
 - LOCUS:** HM222538 753 bp DNA linear PLN 13-OCT-2010
 - DEFINITION:** Tamarindus indica class III chitinase gene, partial cds.
 - ACCESSION:** HM222538
 - VERSION:** HM222538.1 GI:308212835
 - KEYWORDS:** .
 - SOURCE:** Tamarindus indica
 - ORGANISM:** Tamarindus indica
 - REFERENCE 1 (bases 1 to 753):**
 - AUTHORS:** Datta,M. and Tomar,S.
 - TITLE:** Molecular cloning and structural characterization of the catalytic domain of class III chitinase from Tamarindus indica
 - JOURNAL:** Int J Life Sci Technol 3 (2), 16-28 (2010)
 - REFERENCE 2 (bases 1 to 753):**
 - AUTHORS:** Datta,M., Kumar,P. and Tomar,S.
 - TITLE:** Direct Submission
 - JOURNAL:** Submitted (12-MAY-2010) Biotechnology, IIT Roorkee, Roorkee, Uttarakhand 247667, India
 - FEATURES:** Location/Qualifiers
- Analysis Tools:**
 - Analyze this sequence:** Run BLAST, Pick Primers, Highlight Sequence Features, Find in this Sequence.
 - Related information:** Protein, Taxonomy.
 - Recent activity:** Turn Off, Clear.

ภาพที่ 14 ฐานข้อมูล NCBI แสดงรายละเอียดของยีน *Chitinase*

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Chitinase*

- | | | | | | | |
|----|--------------|---|----------------------|-----|---|----|
| 1. | Left Primer | : | GAGTCATCTTCACGCCCATT | GC% | = | 50 |
| | Right Primer | : | CCCAAGTAGGCATCAGGAAA | GC% | = | 50 |
| 2. | Left Primer | : | AGCTGGTCATTGTGGTCCTC | GC% | = | 55 |
| | Right Primer | : | AATGGGCGTGAAGATGACTC | GC% | = | 50 |
| 3. | Left Primer | : | GAGTCATCTTCACGCCCATT | GC% | = | 50 |
| | Right Primer | : | GGCCTGTTTGCCGTAAAGTA | GC% | = | 50 |
| 4. | Left Primer | : | AGCTGGTCATTGTGGTCCTC | GC% | = | 55 |
| | Right Primer | : | CCTCCCAAGAAATTGTTCCA | GC% | = | 45 |
| 5. | Left Primer | : | GAAGCATGTGCAACAGGAAA | GC% | = | 45 |
| | Right Primer | : | AGCATCACCTTGATCCCTTG | GC% | = | 50 |

www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/

อังกฤษ ▼ คุณต้องการแปลหรือไม่

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence	Primer3Manager	Help
	About	Source Code

Task: Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Main	General Settings	Advanced Settings	Internal Oligo	Penalty Weights	Sequence Quality
-------------	-------------------------	--------------------------	-----------------------	------------------------	-------------------------

Sequence Id:

Paste source sequence below Or upload sequence file:

```
TATTGGGGCCAAAACGGTAATGAAGCAAGCCTAGCAGAAGCATGTGCAACAGGAAAGTATTCTTATGTAA
ACATAGCCTTCCCTTAACAAGTTTGGTAATGSCCAAGCTCCAGAAATCTTCATAGCTGGTCATTGTGGTCC
TCCCTTTTCAACAATTGCTCTCTGTTGGCAGCGACATCAAAAATGCCAAACCAAGGGATCAAGGTG
ATGCTATCTATTGGAGGGGCGAGTGGGAGTAGTTACTCTCTTGCCTCCTCGGGTGAIGCTAAAAATGTTT
CTGATTACTTGTGGAACAATTTCTTGGGAGGCGAGTCATCTTCAGGCCATTAGGGGACGCCGTATTAGA
TGGCATTAGATTTTGAATATTAAATAACAGCACAGATATCATGAAGACCTAGCGGGTCACCTCAAGTCA
CATAGCACTACGACTCAAAAATATGTTTACTTGGAGTGCAGCACCTCAGTGCCCATTTTCTGATGCCTACT
TGGGTACTTTACGGCAACAGGCCTTTTGAATATGTTTGGGTGCAATTTCTACATGATCCTCAGTGCCA
ATATAGCCAGGAAATGTTGATGATCTTATGAATCTTGAAATCATGGTCAATACATTAAAAAGAGAGG
AAAGTATTTTGGGGTTGCCAGCATCTCCGGCAGCAGCTGGTGGTTATGTTCTCCTGATGTTCTTAATT
CTCAAAATCTTCTGCTATTAAAGGTTCTTCTATGGTGGTGTATGCTTTGG
```

Mark selected region:

ภาพที่ 15 ฐานข้อมูล NCBI แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Chitinase*

www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

Pair 1:

☒ Left Primer 1:

Sequence:

Start: 313 Length: 20 bp Tm: 60.1 °C GC: 50.0 % ANY: 3.0 SELF: 1.0

☒ Right Primer 1:

Sequence:

Start: 494 Length: 20 bp Tm: 60.1 °C GC: 50.0 % ANY: 3.0 SELF: 0.0

Product Size: 182 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 2.0

```

1      TATTGGGGCC AAAACGGTAA TGAAGCAAGC CTAGCAGAAG CATGTGCAAC
51     AGGAAAGTAT TCTTATGTAA ACATAGCCTT CCTTAACAAG TTTGGTAATG
101    GCCAAGCTCC AGAAATCTTC ATAGCTGGTC ATTGTGGTCC TCCCTTTTCA
151    AACAATTGCT CTCTGGTTGG CAGCGACATC AAAAAATGCC AAAACCAAGG
201    GATCAAGGTG ATGCTATCTA TTGGAGGGGC GAGTGGGAGT AGTTACTCTC
251    TTGCTTCCTC GGGTGATGCT AAAAAATGTTT CTGATTACTT GTGGAACAAT
301    TTCTTGGGAG GCAGTCATC TTCACGCCCA TTAGGGGACG CCGTATTAGA
351    TGGCATAGAT TTTGAGATAT TAAATAACAG CACAAGATAT CATGAAGACC
401    TAGCGGGTCA CCTCAAGTCA CATAGCACTA CGACTCAAAA ATATGTTTAC
451    TTGAGTGCAG CACCTCAGTG CCCATTTCCT GATGCCTACT TGGGTACTTT
501    ACGGCAAACA GGCCTTTTGT ACTATGTTTG GGTGCAATTC TACAATGATC
551    CTCCTGCCA ATATAGCCAG GGAAATGTTG ATGATCTTAT GAAATCTTGG
601    AAATCATGGT CAATACATTT AAAAGAGAGG AAAGTATTTT TGGGGTTGCC
651    AGCATCTCCG GCAGCAGCTG GTGGTTATGT TCCTCCTGAT GTTCTTAATT
701    CTCAAATCTT TCCTGCTATT AAAGGTCTCT CTTATGGTGG TGTATGCTT
751    TGG

```

ภาพที่ 16 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A_{260}/A_{280} ของใบมะขาม เมื่ออบแห้งและระยะเวลาในการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน

พันธุ์ปลูก	อุณหภูมิที่ใช้ ในการอบแห้ง	ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอ (A_{260}) (ng/ μ l)				A_{260}/A_{280} (ng/ μ l)			
		ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)			
		1	7	14	30	1	7	14	30
ประกายทอง	40	1351.6 $\pm$ 25.9 ^a	1088.3 $\pm$ 99.2 ^a	406.6 $\pm$ 24.6 ^a	101.6 $\pm$ 35.4 ^a	5.8	7.3	1.3	0.5
	45	1100.0 $\pm$ 61.7 ^a	208.3 $\pm$ 46.4 ^b	128.3 $\pm$ 2.8 ^b	48.3 $\pm$ 20.8 ^b	4.3	0.8	0.1	0.1
	50	76.0 $\pm$ 62.1 ^c	76.0 $\pm$ 62.1 ^b	65.0 $\pm$ 23.0 ^b	45.0 $\pm$ 18.2 ^b	0.2	0.2	0.2	0.1
สีทอง	40	1173.3 $\pm$ 92.9 ^a	770.0 $\pm$ 34.6 ^a	256.6 $\pm$ 24.6 ^a	208.3 $\pm$ 35.4 ^a	1.5	9.2	2.5	1.2
	45	925.0 $\pm$ 32.7 ^b	461.6 $\pm$ 2.8 ^b	68.3 $\pm$ 2.8 ^b	43.3 $\pm$ 20.8 ^b	4.6	3.4	0.2	0.6
	50	838.3 $\pm$ 12.5 ^b	68.3 $\pm$ 2.8 ^c	51.6 $\pm$ 23.0 ^b	26.1 $\pm$ 18.2 ^b	3.3	0.2	0.3	0.1
ขันตี	40	943.3 $\pm$ 25.6 ^a	943.3 $\pm$ 15.0 ^a	821.6 $\pm$ 20.2 ^a	765.0 $\pm$ 10.0 ^a	14.1	17.9	7.0	4.1
	45	913.0 $\pm$ 25.6 ^{ab}	876.6 $\pm$ 20.2 ^a	753.3 $\pm$ 10.4 ^{ab}	615.0 $\pm$ 18.0 ^b	18.2	4.0	3.7	2.8
	50	870.0 $\pm$ 18.0 ^b	846.6 $\pm$ 76.5 ^a	601.6 $\pm$ 142.9 ^b	50.0 $\pm$ 37.7 ^c	7.4	6.3	3.6	0.2
ศรีชมภู	40	910.0 $\pm$ 22.9 ^a	826.6 $\pm$ 57.9 ^a	645.0 $\pm$ 49.2 ^a	250.0 $\pm$ 50.0 ^a	18.2	9.9	4.8	0.7
	45	826.6 $\pm$ 57.9 ^b	736.6 $\pm$ 30.5 ^a	573.3 $\pm$ 15.2 ^b	166.6 $\pm$ 28.8 ^b	9.9	22.1	2.4	0.4
	50	735.0 $\pm$ 27.8 ^c	601.6 $\pm$ 63.7 ^b	518.3 $\pm$ 16.0 ^b	16.6 $\pm$ 2.88 ^c	6.3	12.0	2.0	0.1

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของ PCR product และค่า A_{260}/A_{280} ของใบมะขาม เมื่ออบแห้งและระยะเวลาในการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน

พันธุ์ปลูก	อุณหภูมิที่ใช้ใน การอบแห้ง	ความเข้มข้นของPCR product(A_{260}) (ng/ μ l)				A_{260}/A_{280} (ng/ μ l)			
		ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)			
		1	7	14	30	1	7	14	30
ประกายทอง	40	483.3 $\pm$ 28.8 ^a	483.3 $\pm$ 28.8 ^a	333.3 $\pm$ 28.8 ^a	166.66 $\pm$ 76.3 ^a	2.4	2.4	3.3	2.0
	45	450.0 $\pm$ 50.0 ^{ab}	300.0 $\pm$ 50.0 ^b	250.0 $\pm$ 50.0 ^{ab}	116.66 $\pm$ 28.8 ^a	1.7	0.9	0.9	0.5
	50	383.3 $\pm$ 28.8 ^b	266.6 $\pm$ 28.8 ^b	200.0 $\pm$ 50.0 ^b	66.66 $\pm$ 28.8 ^a	1.4	1.1	0.7	0.7
สีทอง	40	850.00 $\pm$ 50.0 ^a	800.00 $\pm$ 50.0 ^a	516.67 $\pm$ 28.8 ^a	83.33 $\pm$ 57.7 ^a	1.1	0.9	1.1	1.3
	45	683.33 $\pm$ 28.8 ^b	466.67 $\pm$ 57.7 ^b	383.33 $\pm$ 28.8 ^b	66.67 $\pm$ 28.8 ^a	1.2	1.2	1.6	0.7
	50	366.67 $\pm$ 28.8 ^c	283.33 $\pm$ 28.8 ^c	283.33 $\pm$ 28.8 ^c	66.67 $\pm$ 28.8 ^a	1.3	1.3	1.9	0.8
ขันตี	40	433.33 $\pm$ 28.8 ^a	433.33 $\pm$ 28.8 ^a	383.33 $\pm$ 76.3 ^a	383.33 $\pm$ 28.8 ^a	1.5	1.6	1.2	1.9
	45	383.33 $\pm$ 28.8 ^a	316.66 $\pm$ 28.8 ^b	283.33 $\pm$ 104.0 ^{ab}	150.00 $\pm$ 0.0 ^b	4.6	1.7	2.1	0.9
	50	316.66 $\pm$ 28.8 ^b	150.00 $\pm$ 50.0 ^c	133.33 $\pm$ 57.7 ^b	83.33 $\pm$ 28.8 ^c	1.9	1.5	0.9	0.5
ศรีชมพู	40	505.00 $\pm$ 8.6 ^a	503.33 $\pm$ 28.4 ^a	266.67 $\pm$ 28.8 ^a	136.67 $\pm$ 22.5 ^a	2.2	2.3	1.3	0.6
	45	476.67 $\pm$ 20.2 ^{ab}	376.67 $\pm$ 5.7 ^b	216.67 $\pm$ 57.7 ^{ab}	30.00 $\pm$ 5.0 ^b	1.9	5.5	1.1	0.1
	50	445.00 $\pm$ 30.9 ^b	338.33 $\pm$ 32.4 ^b	166.67 $\pm$ 28.8 ^b	16.67 $\pm$ 2.8 ^b	1.6	1.7	0.8	0.1

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ (Agarose Gel Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงสร้างของโมเลกุลของสาร การแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส มักทำให้ตัวกลางที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่พวกโพลีเมอร์ สำหรับดีเอ็นเอนิยมแยกโดยใช้อะกาโรส หรือโพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวกลาง การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แยก บ่งชี้และทำขึ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากการเตรียมอะกาโรสเจลทำได้สะดวกกว่าการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล การตรวจหาแถบของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันสามารถทำได้โดยการย้อมอะกาโรสเอธิเบียมโบรไมด์ แล้วตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเบียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเรืองแสง(fluorescence) เมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัม สามารถถูกตรวจพบได้โดยวิธีนี้ การแยกดีเอ็นเอโดยโพลีอะคริลาไมด์ยุ่งยากกว่า แต่มีอำนาจการแยก (resolving power) สูงกว่าอะกาโรสเจลมากโดยสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงคู่เบสเดียวออกจากกันได้ จึงใช้ได้ดีในเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อะกาโรสเป็นสารโพลีเมอร์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ถ้ากำหนดให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้นตรง ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโมเลกุลกับระยะทางที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถแสดงได้ในรูปของกราฟซึ่งจะเห็นว่าสำหรับแต่ละความเข้มข้นของอะกาโรสเจลจะมีช่วงที่การเคลื่อนที่กับ $\log$ ของขนาดโมเลกุลมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ซึ่งช่วงขนาดของดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางนั้นได้รวบรวมไว้

ในปัจจุบันมีการใช้อะกาโรสในงานอิเล็กโทรโฟรีซิสเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก ผู้ผลิตหลายบริษัทจึงทำการผลิตอะกาโรสชนิดพิเศษสำหรับใช้ในงานอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเฉพาะซึ่งเป็นอะกาโรสที่บริสุทธิ์ปราศจากสารเจือปนซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไปหลังจากแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล และปราศจากการปนเปื้อนจากนิวคลีเอสซึ่งทำลายกรดนิวคลีอิก

ในการเตรียมเจลจะนำอะกาโรสมาหลอมในบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ประมาณ 8 แล้วเทลงในถาดรองเจลเมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วจึงทำการหยดดีเอ็นเอลงในหลุมแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เจล ดีเอ็นเอ ซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ต่อไปนี้

1. ขนาดของดีเอ็นเอ

อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบสดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าเพราะมีแรงเสียดทานมากกว่าและโมเลกุลจะเคลื่อนผ่านรูของเจลยากกว่า

2. ความเข้มข้นของอะกาโรส

ขณะที่ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ารู้มีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่

ของดีเอ็นเอจะสูงกว่าเจลที่มีรูขนาดเล็ก ขนาดของรูภายในเจลจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรสอะกาโรสยิ่งมีความเข้มข้นมากรูภายในจะมีขนาดเล็กลง การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรส จะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส ตามสมการ

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

u = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจล

u_0 = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสภาพที่ไม่มีในอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง(retardation coefficient)

ตารางที่ 7 ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ไปในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ

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

3. โครงรูปของดีเอ็นเอ

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

4. องค์ประกอบของบัฟเฟอร์

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและความแรงไอออนของบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้สำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอมี 4 ชนิด ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 2 นิยมเตรียมบัฟเฟอร์เข้มข้นเก็บไว้ เช่น 10X buffer หมายความว่า เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้จริง TAE, TPE และ TBE ใช้กับดีเอ็นเอสายคู่ ส่วนบัฟเฟอร์ด่าง(alkaline buffer) ใช้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ตารางที่ 8 แสดงบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้ในอิเล็กโทรโฟรีซิส (working solution)	บัฟเฟอร์เข้มข้น/1000 ml (stock solution)
Tris-acetate(TAE)	1X:0.04 M Tris-acetate0.001 M EDTA	10X:48.4 g Tris base11.4 ml glacial aceticacid20 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0)
Tris-phosphate(TPE)	1X:0.09 M Tris- phosphate0.002 M EDTA	10X:108 g Tris base15.5 ml 85% phosphoric acid40 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0)
Tris-borate(TBE)	0.5X:0.045 M Tris-borate0.002 M EDTA	5X:54 g Tris base27.5 ml boric acid20 ml of 0.5 M EDTA(pH 8.0)
AlkalineButter	1X:50mM NaOH1 mM EDTA	10X:5 ml 10 N NaoH2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

วัสดุและอุปกรณ์

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

วิธีทำ

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

การเตรียมสารละลาย

1. 5x TBE (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)
 - 54 กรัม Tris base
 - 27.5 กรัม Boric acid
 - 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2. 1 x TBE

5 x TBE 1 ส่วน:น้ำ 4 ส่วน

3. 10 mg/ml ethidium bromide

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

4. 10 x gel-loading buffer

0.4 % bromophenol blue

0.4 % xylene cyanol

50 % glycerol in water

ประวัตินักวิจัย

1. นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง เกิดเมื่อวันที่ 11 พฤษภาคม 2521

ภูมิลำเนา บ้านเลขที่ 72/2 ถนนผดุงราษฎร์ ต.หล่มสัก อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา ด้านชีววิทยาโมเลกุล)

2. รศ. ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ

ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

ประวัติการศึกษา และประวัติการทำงาน

ประวัติการศึกษา

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

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

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

ประวัติการทำงาน

เริ่มรับราชการเมื่อวันที่ 10 สิงหาคม 2516 ในตำแหน่ง ครูตรี โรงเรียนภัทรญาณวิทยา อ.นครชัยศรี จ. นครปฐม จากนั้นได้ย้ายไปรับราชการยังโรงเรียนปัญญาวรคุณและโรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ ได้เลื่อนตำแหน่งเป็นอาจารย์ 1 และอาจารย์ 2 ตามลำดับ ต่อมาได้สอบโอนไปรับราชการยังกรมการฝึกหัดครู ณ วิทยาลัยครูเพชรบูรณ์ เมื่อ 24 สิงหาคม 2537 ตำแหน่งอาจารย์ 2 ระดับ 5 ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนเป็นสถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ และเป็นมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ในปัจจุบัน ได้รับการแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8 เมื่อวันที่ 5 มีนาคม 2545 และตำแหน่งรองศาสตราจารย์ ระดับ 9 เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2549 ในระหว่างรับราชการ ได้ปฏิบัติหน้าที่สำคัญหลายอย่าง

- เป็นหัวหน้าภาควิชาชีววิทยา (2542-2543)

- เป็นประธานโปรแกรมชีววิทยาประยุกต์ (2544-2546)

- เป็นหัวหน้างานชีววิทยาศูนย์วิทยาศาสตร์ฯ (2542-2546)
- เป็นเจ้าหน้าที่พัสดุของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2542-ปัจจุบัน)
- เป็นเจ้าหน้าที่พัสดุของศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2542-2546)
- เป็นที่ปรึกษาโครงการ พสวท.โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ (2533-2536)
- เป็นที่ปรึกษาโครงการ สควค. สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ (2542-2544)
- เป็นกรรมการร่างและเขียนหลักสูตรชีววิทยาของ สสวท. ฉบับ 2533
- เป็นผู้ชำนาญสาขาสีวิทยา สสวท. (2528-2534)
- เป็นกรรมการตัดสินโครงงานวิทยาศาสตร์ระดับจังหวัดและระดับประเทศ
- เป็นคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิตรวจและประเมินผลงานทางวิชาการของกลุ่มมหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือตอนล่าง (2549)
 - เป็นคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิตรวจและประเมินผลงานทางวิชาการ สาขาวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช (2549)
 - เป็นคณะกรรมการตรวจและประเมินผลงานวิชาการของ สำนักงานเขตพื้นที่การศึกษาเพชรบูรณ์เขต 1, 2 และ3 (2550-ปัจจุบัน)
 - เป็นคณะกรรมการตรวจผลงานวิชาการของ สำนักงานเขตพื้นที่การศึกษาพิจิตรเขต 1 (2550-ปัจจุบัน)
 - เป็นคณะกรรมการตรวจผลงานวิชาการของ สำนักงานเขตพื้นที่การศึกษาอุทัยธานีเขต 2 (2550-ปัจจุบัน)
 - เป็นที่ปรึกษาชมรมแพทย์แผนไทยจังหวัดเพชรบูรณ์ (2546- 2550)
 - เป็นที่ปรึกษาชมรมแพทย์แผนไทยและแปรรูปสมุนไพรเพชรบูรณ์ (2551)
 - ฯลฯ