



การทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอมะขามเพื่อหาความสัมพันธ์กับยีนต้านเชื้อรา
ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์

Data Mining of Expression of Antifungal Genes Database of
DNA-based Markers in *Tamarind indica* Using by Microsatellite.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
โดยผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2557



การทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอมะขามเพื่อหาความสัมพันธ์กับยีนต้านเชื้อรา
ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์

Data Mining of Expression of Antifungal Genes Database of
DNA-based Markers in *Tamarind indica* Using by Microsatellite

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง
เบญจพร ศรีสุวรรมาศ
กาญจน์ คุ่มทรัพย์
สมพงษ์ แสนเสนยา

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
โดยผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2557

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาจ 2557. การทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอมะขามเพื่อหาความสัมพันธ์กับยีนต้านเชื้อราด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก มะขามถูกจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการโดยการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มมะขามได้ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 มะขามพันธุ์ปลูก สีทอง เปรี๊ยะยักษ์ เปรี๊ยะพื้นเมือง กลุ่มที่ 2 มะขามพันธุ์ปลูก ชันดี น้ำผึ้ง อินทผาลัม นาครีนวล กลุ่มที่ 3 มะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง และ นิมนวล กลุ่มที่ 4 มะขามพันธุ์ปลูกศรีชมพู และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน *rbcl* จากมะขามทั้งหมดจำนวน 19 พันธุ์ปลูก โดยใช้โปรแกรม BioEdit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method ได้ผลคือ มะขามถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม และในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* ร่วมกัน พบว่า มีมะขามพันธุ์ปลูกบางส่วนที่มีลักษณะความสัมพันธ์ที่คล้ายกันในการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ เช่นในพันธุ์ปลูกชันตรี น้ำผึ้ง และอินทผาลัม ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พันธุ์ปลูกเปรี๊ยะยักษ์และเปรี๊ยะพื้นเมืองถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มีบางส่วนที่ให้ข้อมูลไม่สัมพันธ์กันเช่นเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์จัดพันธุ์ปลูกสีทอง น้ำผึ้งและหมื่นจง อยู่คนละกลุ่ม ในขณะที่การใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* จัดกลุ่มมะขามพันธุ์ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งจากสิ่งที่เกิดขึ้นดังกล่าว อาจเกิดข้อจำกัดขึ้นบางประการเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนน้อยในวิธีหนึ่ง แต่กลับมีการเพิ่มปริมาณได้ในบริเวณที่มีความแปรปรวนมากในอีกวิธีหนึ่ง จึงทำให้ผลการทดลองอาจไม่สามารถให้คำตอบได้อย่างชัดเจน จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวิธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

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

The study evolutionary relationships of each species planted tamarind. Tamarind is grouped relationship of evolution by studying DNA in microsatellite that can be grouped tamarind as follows: group 1, tamarind cultivated See tong, Preao yak and Preao puen muang, group 2 tamarind cultivated Khuntee, Num pueng, Intapalum, and Na Sre Nuan cultivated. Group 3 Muen jung and Nim Nun. Group 4 Sri chom poo cultivars. When testing evolutionary relationship with the sequence analysis in *rbcl* gene of tamarind total of 19 cultivars using BioEdit by Neighbor-Joining / UPGMA method works is tamarind were divided into 2 groups, and in the relationship. Phylogenetic with microsatellite. And technical analysis using gene sequences showed a tamarind *rbcl* together some cultivars are characterized by similar relationship to analyze both. As in cultivated Khuntee, Num pueng and Intapalum are in the same group. Planting native species Preao puen muang and Preao yak are in the same group. But there are some that do not correlate such information. Microsatellite be cultivated See tong, Num pueng and Muen jung Different groups While the use of gene sequence analysis using gene clustering *rbcl* tamarind seeds are in the same group. Which of these things happen. Potential limitations on the effectiveness of some of the tools used, such as the DNA molecule in a minor variability in the way. But were increased in areas with considerable variability in another way. Therefore, the results may not be able to answer clearly. We need to review and plan to find ways to develop molecular markers to comply with genetic studies to be appropriate and phylogenetic classification of tamarind efficiency even further.

กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย
ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาจารย์ผู้ร่วมวิจัยที่เอื้อเฟื้อวัสดุ
อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนแนวทางในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้
ด้วยดี ขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้ให้การสนับสนุน
ทุนวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
4. ขอบเขตของการวิจัย	5
5. ขอบเขตระยะเวลา	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับมะขาม	5
2. การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์	10
3. เชื้อราก่อโรคในมะขาม	13
4. การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล	15
5. เทคนิคทางชีวโมเลกุล	18
6. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์	21
7. ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ	25
8. การศึกษาระดับโมเลกุลของมะขาม	31
9. ชีวสารสนเทศ	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	34
1. การสกัดแยกอาร์เอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อ	34
2. การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ	34
3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	35
4. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	37
5. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์	39
6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)	39

7. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint analysis)	40
8. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล	41
9. การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล	41
บทที่ 4 ผลการวิจัย	43
1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ	43
2. ผลการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	46
3. การวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	47
4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการด้วยยีน <i>rbcl</i>	49
5. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน <i>rbcl</i>	53
6. การตรวจสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis	56
7. ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน <i>rbcl</i> ของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก	57
8. การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree	68
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	71
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมี	81
ภาคผนวก ข. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี	85
ภาคผนวก ค. ข้อมูลการวิเคราะห์ผลการทดลองและรายละเอียดลำดับดีเอ็นเอ	90
ประวัตินักวิจัย	97

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์	35
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l)	43
ตารางที่ 3 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A260/A280ของใบมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ	44
ตารางที่ 4 ไพรมเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์	46
ตารางที่ 5 แสดงการจัดกลุ่มมะขามจากขนาดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน 1.5 % agarose gel	48
ตารางที่ 6 พันธุ์ปลูกมะขามที่ใช้ในการทดสอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i>	50
ตารางที่ 7 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l) ของใบมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ	51
ตารางที่ 8 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A260/A280ของใบมะขาม	52
ตารางที่ 9 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>rbcl</i>	53
ตารางที่ 10 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>rbcl</i> ในมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก	54
ตารางที่ 11การจัดกลุ่มระหว่างเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เทคนิคการใช้ยีน <i>rbcl</i>	69

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะขามหวาน	9
ภาพที่ 2 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (2n=24) ของมะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู	10
ภาพที่ 3 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (2n=24) ของมะขามหวานพันธุ์ขันตี	11
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (2n=24)) ของมะขามหวานพันธุ์ประกายทอง	12
ภาพที่ 5 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (2n=24) ของมะขามหวานพันธุ์สีทอง	13
ภาพที่ 6 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะขาม 10 พันธุ์ปลูก บน 0.8% agarose gel	45
ภาพที่ 7 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะขาม 10 พันธุ์ปลูก บน 1.5 % agarose gel	47
ภาพที่ 8 แลบดีเอ็นเอจากยีน <i>rbcl</i> ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บน 1.5 % agarose gel	56
ภาพที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของ <i>Gymnocladus dioica</i> ขนาด 1,467 bp	57
ภาพที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของ <i>Tamarindus indica</i> ขนาด 1,398 bp	58
ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกอินทผลัม ขนาด 643 bp	58
ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภูกลม ขนาด 641 bp	59
ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภูปลิง ขนาด 671 bp	59
ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกสีทองเบา ขนาด 611 bp	60
ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกสีทองหนัก ขนาด 621 bp	60
ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกสีทองจุก ขนาด 649 bp	61
ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกขันตรีหยวก ขนาด 643 bp	61
ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกขันตรีสร้อย ขนาด 649 bp	62
ภาพที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีภักดี ขนาด 678 bp	62
ภาพที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกแสงอาทิตย์ ขนาด 671 bp	63
ภาพที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกประกายเพชร ขนาด 646 bp	63

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกประกายทอง ขนาด 671 bp	64
ภาพที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> มะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง ขนาด 672 bp	64
ภาพที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกพระโรจน์ ขนาด 645 bp	65
ภาพที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกน้ำผึ้ง ขนาด 713 bp	65
ภาพที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ ขนาด 654 bp	66
ภาพที่ 27 นิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกฝักดาบ ขนาด 644 bp	66
ภาพที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง ขนาด 645 bp	67
ภาพที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ของมะขามพันธุ์ปลูกเพชรบัวทอง ขนาด 657 bp	67
ภาพที่ 30 ความสัมพันธ์เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการของมะขามที่ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method	68
ภาพที่ 31 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)	86
ภาพที่ 32 ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)	86
ภาพที่ 33 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mupid-EXU® Gel Electrophoresis System)	87
ภาพที่ 34 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, SHIMADZU, รุ่น UV-1700)	87
ภาพที่ 35 สารละลายต้นตอที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB	88
ภาพที่ 36 ชุดสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์ (FTA™ Plant Kit, What Man, UK)	88
ภาพที่ 37 Agarose gel (Invitrogen™)	89
ภาพที่ 38 DNA Marker หรือ DNA Ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)	89
ภาพที่ 39 สีย้อมดีเอ็นเอ (6X Novel juice DNA staining dye, GeneDireX®)	89
ภาพที่ 40 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i> ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method	96

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะขาม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Tamarindus indica* Linn จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae Lindley เป็นไม้เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาแถบประเทศซูดาน ต่อมา มีการนำเข้ามาในประเทศแถบเขตร้อนของเอเชีย และประเทศแถบละตินอเมริกา และในปัจจุบันมีมากในเม็กซิโก เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่แตกกิ่งก้านสาขามากไม่มีหนาม เปลือกต้นขรุขระและหนา สีน้ำตาลอ่อน ใบเป็นใบประกอบ ใบเล็กออกตามกิ่งก้านใบเป็นคู่ ใบย่อยเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบและโคนใบมน ประกอบ ด้วยใบย่อย 10 - 15 คู่ ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกสีเหลืองและมีจุดประสีแดงหรือม่วงแดง อยู่กลางดอก 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 ขันดี ปากดุก เจ้าเนื้อเศรษฐกิจ ฝักดาบ ฯลฯ แหล่งปลูกมะขามหวาน ภาคเหนือที่จังหวัดเพชรบูรณ์แพร่ น่าน ลำปาง พิชณุโลก 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 ชาวสวนต้องเสียค่าใช้จ่ายไปกับการป้องกันกำจัด เป็นมูลค่ามหาศาลในแต่ละปี 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) ได้ทำการศึกษาค้นคว้าเชื้อราในมะขามโดยทำการทดลองเพาะเชื้อราในมะขามหวานสายพันธุ์ประกายทอง ตั้งแต่ระยะเป็นดอก ทั้ง ดอกตูม(ดอกยังไม่เปิด)และดอกบาน ฝักอ่อนมะขามอายุ 1 เดือน 3 เดือน 5 เดือน 8 เดือนและระยะ ฝักแก่หรือฝักสุก อายุ 9-10 เดือน ปรากฏว่าพบเชื้อราในรังไข่และฐานรองดอกของดอกบาน และฝัก มะขามทุกระยะที่นำมาตรวจเชื้อ ไม่พบเชื้อราในดอกตูมเพียงทริตเมนต์เดียว จากการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่า มะขามติดเชื้อราตั้งแต่ระยะเป็นดอก เกิดจากสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งคาดว่ามียู่มากมายในบรรยากาศภายในสวนมะขามปลิวไปตกบนยอดเกสรตัวเมียด้วยแรงลม และแมลงพาไปหรือติดอยู่กับ ละอองเกสรตัวผู้ซึ่งเข้าไปปฏิสนธิในรังไข่ สปอร์ของเชื้อราที่เข้าไปในรังไข่จะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อ เปลือกและเจริญอยู่ภายในฝักมะขามพร้อมกับเจริญเติบโตของฝักมะขาม ดังนั้นเมื่อตรวจเชื้อในฝักอ่อนทุกระยะและฝักแก่ที่ไม่มีรอยแตกหรือร่องรอยของการถูกทำลายด้วยเชื้อราจากผิวนอก จะตรวจพบเชื้อดังกล่าวอยู่ภายในฝักมะขาม

จากปัญหาดังกล่าวทำให้การกำจัดเชื้อราด้วยวิธีการกำจัดจากภายนอก เช่น การใช้ยากำจัดเชื้อรา การเก็บผลผลิตในที่แห้ง หรือกระบวนการเก็บเกี่ยวและเก็บรักษาที่ทำให้มะขามปราศจากเชื้อราเป็นไปได้ยากขึ้น แต่โดยทั่วไปแล้ว ในธรรมชาติของพืชเองนั้นมักมีกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งรบกวนอยู่ ทั้งในส่วนของดอกและผลในช่วงที่มีสิ่งรบกวนน้อย 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 นอกจากนั้นยังมีความสำคัญในกระบวนการเป็นปรสิตของ

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในการควบคุมโดยชีววิธีด้วยเอนไซม์ไคตินเนสใน เชื้อรานี้ส่วนมากจะเป็นสายเพปไทด์สายเดี่ยว (single peptide) ที่อาจจะมีบริเวณจับของไคติน (chitin binding domain) อยู่ด้วย จากงานวิจัยที่มีมาก่อนพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสนั้น มีบทบาทหลัก ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพราะผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ ประกอบด้วยไคตินงานทดลองในปี ค.ศ. 2002 โดย Pappinen และคณะ รายงานการถ่ายยีนไคตินเนส เข้าต้นเบิช (*Betula pendula*) โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าพืชผลิตโปรตีนไคตินเนส และแสดง ความต้านทานต่อเชื้อรา *Pyrenopeziza betulicola* ที่ก่อโรคใบจุดได้ และ Ornatawski และคณะ (2004) ทดลองถ่ายยีนไคตินเนสที่ได้จาก tobacco hornworm

จากการศึกษาเกี่ยวกับมะขามหวาน พบว่า มะขามหวานมีศัตรูธรรมชาติที่สร้างความเสียหาย ให้กับมะขามเป็นอย่างมาก ส่งผลกระทบต่อผลผลิต ชาวสวนต้องเสียค่าใช้จ่ายไปกับการป้องกันกำจัด เป็นมูลค่ามหาศาลในแต่ละปี ศัตรูธรรมชาติของมะขามดังกล่าวคือ เชื้อรา ซึ่งส่งผลกระทบต่อมะขาม ในทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะต้นอ่อน จนถึงระยะโตเต็มวัย เชื้อสามารถเข้าทำลายมะขาม ได้ทั้งส่วนใบ ดอก และฝักมะขาม จากข้อมูลดังกล่าว เบญจพร ศรีสุวรรณและจินตนา สนามชัยสกุล (2552) ได้ทำการศึกษาคาติเชื้อราในมะขามโดยทำการทดลองเพาะเชื้อราในมะขามหวานสายพันธุ์ ปรกายทอง ตั้งแต่ระยะเป็นดอก ทั้งดอกตูม (ดอกยังไม่เปิด) และดอกบาน ฝักอ่อนมะขามอายุ 1 เดือน 3 เดือน 5 เดือน 8 เดือนและระยะฝักแก่หรือฝักสุก อายุ 9-10 เดือน ปรากฏว่าพบเชื้อราในรังไข่และฐานรองดอกของดอกบาน และฝักมะขามทุกระยะที่นำมาตรวจเชื้อ ไม่พบเชื้อราในดอกตูม เพียงทรีตเมนต์เดียว จากการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่า มะขามติดเชื้อราตั้งแต่ระยะเป็นดอก เกิดจาก สปอร์ของเชื้อรา ซึ่งคาดว่ามียู่มากมายในบรรยากาศภายในสวนมะขามปลิวไปตกบนยอดเกสรตัว เมียด้วยแรงลม และแมลงพาไปหรือติดอยู่กับละอองเกสรตัวผู้ซึ่งเข้าไปปฏิสนธิในรังไข่ สปอร์ของเชื้อราที่เข้าไปในรังไข่จะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเปลือกและเจริญอยู่ภายในฝักมะขามพร้อมกับเจริญเติบโต ขึ้นของฝักมะขาม ดังนั้นเมื่อตรวจเพาะเชื้อในฝักอ่อนทุกระยะและฝักแก่ที่ไม่มีรอยแตกหรือร่องรอย ของการถูกทำลายด้วยเชื้อราจากผิวนอก จึงตรวจพบเชื้อดังกล่าว นอกจากนี้ผู้ทดลองยังพบว่าน้ำส้ม ควันไม้และสารสกัดสะเดาสามารถกำจัดเชื้อราจากมะขามได้ และได้แนะนำให้เกษตรกรชาวสวน มะขามใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาฉีดพ่นที่พื้นดินใต้ต้นมะขามเพื่อกำจัดเชื้อราและปรับปรุงดิน ร่วมกับการฉีดพ่นน้ำส้มควันไม้ตั้งแต่ระยะเป็นดอกและฉีดสารสกัดสะเดาในระยะเริ่มติดฝัก คำแนะนำนี้เป็น เพียงการป้องกันและลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในฝักมะขามเท่านั้น สำหรับมะขามฝักที่ได้รับสปอร์ ของเชื้อราตั้งแต่ยังเป็นดอกและเจริญเติบโตขึ้นมาพร้อมกับฝักมะขาม เมื่อใดที่ฝนตก อากาศชื้นและ อุณหภูมิสูง เช่นกรณีเกิดภาวะโลกร้อนในตอนต้นเดือนมกราคม 2553 เชื้อราจะเจริญอย่างรวดเร็วใน ฝักมะขาม แต่ถ้าอากาศไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา เชื้อราในฝักจะตายไปและถูกเนื้อเยื่อ

มะขามทำลายและกำจัดไปในที่สุด ในเบื้องต้นการแก้ไขด้วยการคัดเลือกพันธุ์ที่ต้านเชื้อราตามธรรมชาติ แล้วขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เบญจพร ศรีสุวรรณมาศและคณะ 2544) ร่วมกับเทคนิคการปักชำยอดในห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกับการขยายพันธุ์ต้นสักมงคลสายพันธุ์เสาชิงช้า (กรมป่าไม้, 2552) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของยีนด้วยเทคนิค DNA เครื่องหมายจะเหมาะสมที่สุด เนื่องจากมะขามเป็นพืชที่มีวงชีวิตยาวนาน เจริญเติบโตช้า ต้นมะขามอายุ 5-10 ปี จึงจะออกดอกให้ผลผลิตได้ การใช้เทคนิคตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเข้าช่วย จะทำให้ตรวจพบสายพันธุ์ที่ต้องการได้ตั้งแต่มะขามแตกใบอ่อนชุดแรก ไม่ต้องรอจนถึงระยะเวลาที่มะขามออกดอกออกผล จึงเป็นวิธีที่คาดว่าจะสามารถศึกษาความแตกต่างของชุดยีนระหว่างสายพันธุ์ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบกลไกการต้านเชื้อราของมะขามได้ในห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เพื่อศึกษาความแตกต่างของชุดยีนระหว่างมะขามสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อราและสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อรา การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จะทำให้ทราบว่ามะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมีถิ่นที่มาจากไหนอย่างไร

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีโดยที่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่งๆ (Powell *et al.*, 1996) ไมโครแซทเทลไลท์ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Simple Sequence Repeats (SSR), Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLP) และ Sequence-tagged Microsatellite Site (STMS) โดยทั่วไปไมโครแซทเทลไลท์ จะประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) มีตั้งแต่ 1-6 เบส โดยเบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)_n ซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)_n ซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA)_n และ ซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA)_n โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำ เบสซ้ำเหล่านี้พบกระจายอยู่บริเวณต่างๆของจีโนมประมาณ 10^{-4} - 10^{-5} โลกัส ในจีโนมของพืชเขตร้อนส่วนใหญ่ เช่น มะขามโพด จะพบลำดับเบสซ้ำ (GT)_n และ (AG)_n ในปริมาณมาก (ประมาณ 10^{-4} - 10^{-5}) ส่วนในจีโนมมะขามจะพบ (GGC)_n เสียเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปเบสซ้ำเหล่านี้ มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่บริเวณรอบๆ เบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะนี้ สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) เหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า “ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ หรือ เอสเอสอาร์-ไพรเมอร์” ไพรเมอร์เหล่านี้ จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่าง unique sequences ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนี้ ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Morgante and Oliveieri, 1993,

Brown *et al.*, 1996, Paterson, 1996, Powell *et al.*, 1996) ตัวอย่างเช่น การใช้ (GT)n ในการบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมพืช หรือนำมาใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ในมะขาม

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 ศึกษาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของมะขามด้วยเทคนิค ไมโครแซทเทลไลท์ ของมะขามต้นที่ต้านเชื้อราและต้นที่ติดเชื้อรา จากมะขาม 10 พันธุ์ปลูก ได้แก่ สีทอง ศรีชมภู ชันดี เปรี้ยวยักษ์ เปรี้ยวพื้นเมือง หมิ่นจง น้ำผึ้ง อินทผาลัม นิ่มนวล และนาศรีนวล เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปลูกและคัดเลือกพันธุ์ต้านเชื้อราของมะขามในจังหวัดเพชรบูรณ์

2.2 ศึกษาลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของมะขามที่มีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์เพื่อค้นหายีนที่มีลักษณะแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ต้านทานเชื้อราและสายพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อราด้วยเทคนิค ไมโครแซทเทลไลท์ จากมะขาม 10 พันธุ์ปลูก ได้แก่ สีทอง ศรีชมภู ชันดี เปรี้ยวยักษ์ เปรี้ยวพื้นเมือง หมิ่นจง พันธุ์น้ำผึ้ง อินทผาลัม พันธุ์นิ่มนวล พันธุ์นาศรีนวล

3. ศึกษาลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *rbcl* ที่ได้จากมะขามซึ่งยืนดับกล่าวมีความแตกต่างกันในระดับพันธุ์ปลูก

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.สามารถแก้ปัญหามะขามขึ้นราในจังหวัดเพชรบูรณ์ได้อย่างตรงจุดตรงประเด็น
- 2.ลำดับเบสของยีนต้านเชื้อราในมะขามที่ได้จากการทดลองสามารถขึ้นทะเบียนใน GenBank ได้
3. พันธุ์ปลูกมะขามต้านเชื้อราที่ได้จากการทดลอง สามารถจดสิทธิบัตรได้
4. เผยแพร่ในเว็บไซต์และวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยฯ
5. สามารถนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติได้
6. เป็นตัวชี้วัดในการประกันคุณภาพของมหาวิทยาลัยฯ ทั้ง กพร.สมศ.สกอ.และ กพอ.
7. เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์มะขามสายพันธุ์ต่าง ๆ ในจังหวัดเพชรบูรณ์ต่อไป

4. ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้มะขาม 10 พันธุ์ปลูก คือ สีทอง ศรีชมภู ชันดี เปรี้ยวยักษ์ เปรี้ยวพื้นเมือง หมิ่นจง พันธุ์น้ำผึ้ง อินทผาลัม พันธุ์นิ่มนวล พันธุ์นาศรีนวล จากจังหวัดเพชรบูรณ์เท่านั้น ทั้งต้นที่เจริญในธรรมชาติและเจริญในเรือนทดลอง

2. การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอใช้ชุด Kit Real Genomics ของบริษัท RBC Bioscience Crop ประเทศไต้หวัน

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ใช้คู่มือไพรเมอร์ ซึ่งสังเคราะห์โดย บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้

4. วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสซ้ำบนสายดีเอ็นเอของมะขามสายพันธุ์ต่างๆด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

5. การวางแผนการทดลองและสถิติที่ใช้

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ t-test ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ ด้วยเทคนิค DNA sequencing

5. ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2557

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับมะขาม

1.1 ลักษณะทั่วไปของมะขาม

มะขาม มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Tamarindus indica* Linn จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae Lindley เป็นไม้เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาแถบประเทศซูดาน ต่อมามีการนำเข้ามาในประเทศแถบเขตร้อนของเอเชีย 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

1.2 สันฐานวิทยาและอนุกรมวิธานของมะขามหวาน

อาณาจักร : Plantae

หมวด : Magnoliophyta

ชั้น : Liliopsida

อันดับ : Fabales

วงศ์ : Fabaceae

สกุล : *Tamarindus*

ชนิด : *T. indica*

พืชสกุลมะขาม (*Tamarindus*) จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae Lindley (or Leguminosae Juss.) มีถิ่นกำเนิดจากทางเอเชียใต้และแอฟริกาตะวันออก) มีเพียง 1 ชนิด (species) คือ *Tamarindus indica* L. ในประเทศไทยมะขามแบ่งออกเป็นมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศ ทำให้มีพันธุ์ต่าง ๆ กระจายอยู่ทั่วไปจังหวัดเพชรบูรณ์เป็นถิ่นปลูกมะขามหวานพันธุ์ดี และมีประวัติความเป็นมาที่ยาวนานด้านมะขามหวาน ได้มีการขึ้นทะเบียนกับกรมทรัพย์สินทางปัญญากระทรวงพาณิชย์ ทะเบียนเลขที่ สช.48100003 ประกาศตั้งแต่วันที่ 30 กันยายน 2548 ประกาศ โดยการขึ้นทะเบียนมะขามหวานเพชรบูรณ์ได้ประกาศไว้เป็นสินค้าที่มีสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ดังนี้ มะขามหวาน

เพชรบูรณ์ หมายถึง มะขามหวานฝักตรงจากพันธุ์ศรีชมพู พันธุ์ขันตี พันธุ์ประกายทอง พันธุ์ฝักดาบ พันธุ์หวานล่อน และมะขามหวานฝักโค้งจากพันธุ์ สีทอง พันธุ์สีทองเบา พันธุ์น้ำผึ้ง พันธุ์อินทผลัม พันธุ์หมื่นจง และพันธุ์แสงอาทิตย์ ซึ่งปลูกในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์

ในประเทศไทยมะขามแบ่งออกเป็นมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศทำให้มีพันธุ์ต่าง ๆ กระจายอยู่ทั่วไปจังหวัดเพชรบูรณ์เป็นถิ่นปลูกมะขามหวานพันธุ์ดี และมีประวัติความเป็นมาที่ยาวนานด้านมะขามหวาน ได้มีการขึ้นทะเบียนกับกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ 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 ลักษณะของต้นมะขามหวานเป็นทรงพุ่มแยกเป็น 2 แบบ คือทรงโปร่ง และทรงทึบ (พิจิตร โชคพัฒนา. 2546)

ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก (Pinnately compound leaves) มีใบย่อยติดอยู่ทั้ง 2 ข้างของแกนกลางใบ (Rachis) โดยใบย่อยจะเรียงเป็นแถวตามแกนกลาง (Raven. 1992) ใบย่อยมีประมาณ 10-20 คู่ เรียงสลับกันอย่างเป็นระเบียบ ใบย่อยแต่ละใบจะมีความกว้างประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร (กองบรรณาธิการกลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า. 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 อันก้านเกสรตัวผู้ (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 เมื่อฝักยังอ่อนจะมีสีเขียวสดหรือสีเขียวปนน้ำตาลและมีนวลหรือละอองสีน้ำตาลจับอยู่ จึงดูเป็นสีเขียวปนน้ำตาลเนื้อในสีขาวนวลรสเปรี้ยวจัด ต่อมาเมื่ออายุฝักมากขึ้นเนื้อจะมีสีเหลืองนวลแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ยวบแห้งล่อนออกจากเปลือก ส่วนเนื้อหุ้มเมล็ดจะติดกันยาวและมีเส้นใยยึดอยู่ภายใน 3 เส้นตามความยาวของฝัก ซึ่งเรียกว่า สาแหรก (กนก ชวนานนท์. 2534: 24)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะขามหวาน

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

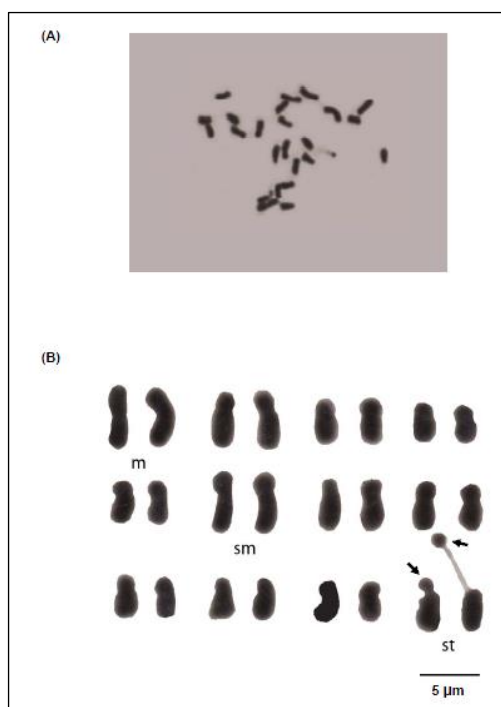
1.3 การเจริญของมะขามหวานในรอบปี

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

1.4 การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของมะขามหวานเพชรบูรณ์พันธุ์ศรีชมภู พันธุ์ชั้นดีพันธุ์ประจำท้องถิ่น และพันธุ์สีทอง โดยศึกษาคาร์ิโอไทป์จากรากที่เพาะด้วยเมล็ดได้ผลดังนี้

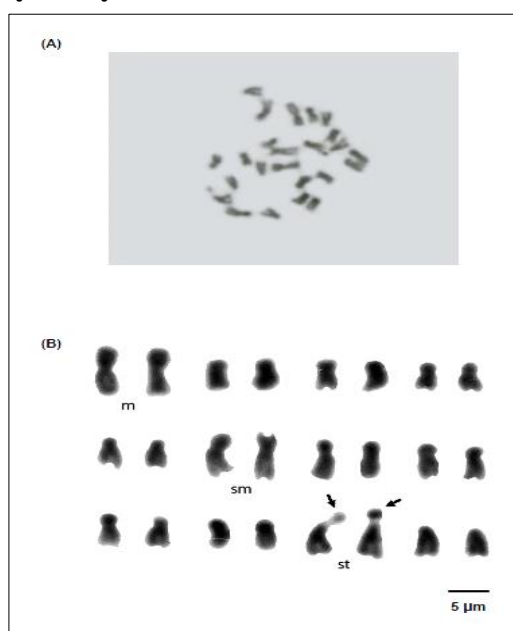
มะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดคือ $2n=24$ จำนวน 73 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 80 เซลล์ คิดเป็น 91.25เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นมะขามหวานพันธุ์ศรีชมภูจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 6 คู่ และซับเทโลเซนทริก 1 คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 46 ลักษณะที่สำคัญคือ มีแซทเทลไลท์ (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 2 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$) ของมะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู (A) และคาร์ิโอไทป์ (B) ที่กำลังขยายประมาณ 6,826 เท่า ลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์

ที่มา : สุวนิดา อัญจิรวโรจน์, (2550)

มะขามหวานพันธุ์ขันตี มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดคือ $2n=24$ จำนวน 79 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 93 เซลล์ คิดเป็น 84.95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น มะขามหวานพันธุ์ขันตีจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 5 คู่ และซับเทโลเซนทริก 2 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 44 ลักษณะที่สำคัญคือมีแซทเทลไลท์ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 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

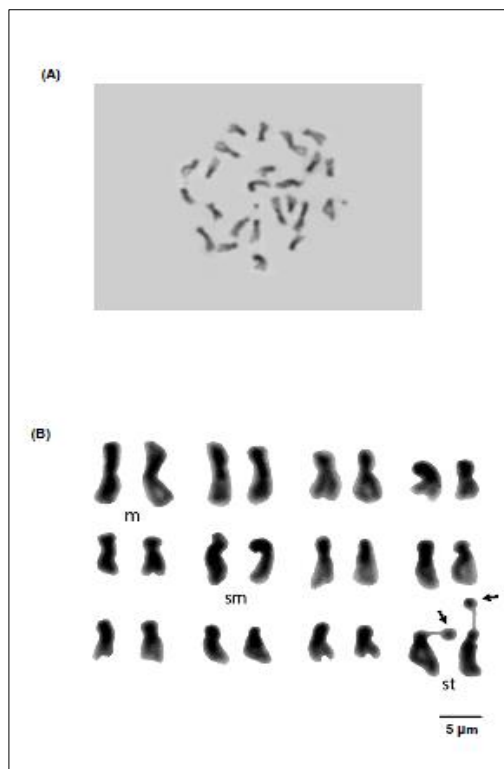


ภาพที่ 3 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$) ของมะขามหวานพันธุ์ขันตี (A) และคาร์ิโอไทป์ (B) ที่กำลังขยายประมาณ 3,713 เท่า ลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์

ที่มา : สุวนิดา อัญจิรวโรจน์, (2550)

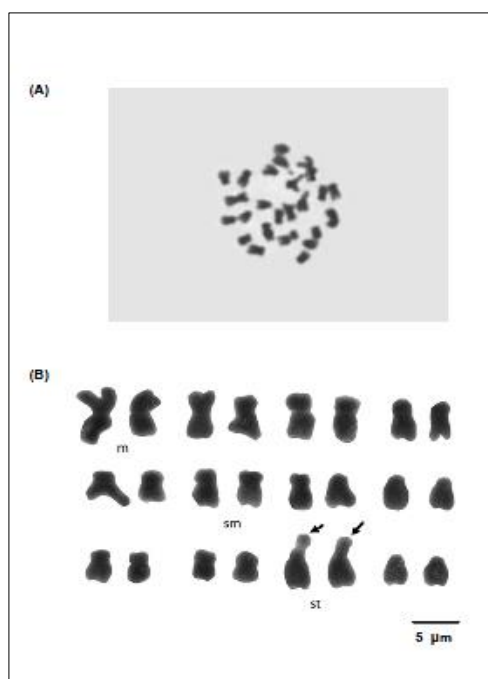
มะขามหวานพันธุ์ประกายทอง มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดคือ $2n=24$ จำนวน 68 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 90 เซลล์ คิดเป็น 75.55 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น มะขามหวานพันธุ์ประกายทองจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 6 คู่ และซับเทโลเซนทริก 1 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 46 ลักษณะที่สำคัญคือมีแซทเทลไลท์ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกโครโมโซมมีความยาวทั้งแขนตั้งแต่ 2.317-4.208 ไมโครเมตร เฉลี่ย 2.972 ± 0.546 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพันธ์ (Relative length หรือ RL) ตั้งแต่ 6.499-11.799 เปอร์เซ็นต์โครโมโซม

ขนาดใหญ่มี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1, 2, 3, 6, 7 และ 12 โครโมโซมขนาดเล็กมี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 4, 5, 8, 9, 10 และ 11



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$) ของมะขามหวานพันธุ์ประกายทอง (A) และคาริโอไทป์ (B) ที่กำลังขยายประมาณ 3,163 เท่าลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์ที่มาจาก : สุวนิดา อัญจิระโรจน์, (2550)

มะขามหวานพันธุ์สีทอง มีความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดคือ $2n=24$ จำนวน 87 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด 97 เซลล์ คิดเป็น 89.69 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นมะขามหวานพันธุ์สีทองจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n=24$ คาริโอไทป์ ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 5 คู่ และซับเทโลเซนทริก 2 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 44 ลักษณะที่สำคัญคือมีแซทเทลไลท์ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 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 5 ภาพถ่ายโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ($2n=24$) ของมะขามหวานพันธุ์สีทอง (A) และคาริโอไทป์ (B)ที่กำลังขยายประมาณ 5,433 เท่าลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์
ที่มา : สุวนิดา อัญจิรเวโรจน์, (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) ได้ทำการศึกษารูปร่างและลักษณะการติดเชื้อราในมะขามโดยทำการทดลองเพาะเชื้อราในมะขามหวานสายพันธุ์ประกายทอง ตั้งแต่ระยะเป็นดอก ทั้งดอกตูม(ดอกยังไม่เปิด)และดอกบาน ฝักอ่อนมะขามอายุ 1 เดือน 3 เดือน 5 เดือน 8 เดือนและระยะฝักแก่หรือฝักสุกอายุ 9-10 เดือน ปรากฏว่าพบเชื้อราในรังไข่และฐานรองดอกของดอกบาน และฝักมะขามทุกระยะที่นำมาตรวจเชื้อ ไม่พบเชื้อราในดอกตูมเพียงทรีตเมนต์เดียว จากการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่า มะขามติดเชื้อราตั้งแต่ระยะเป็นดอก เกิดจากสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งคาดว่ามียู่มากมายในบรรยากาศภายในสวนมะขามปลิวไปตกบนยอดเกสรตัวเมียด้วยแรงลม และแมลงพาไปหรือติดอยู่กับละอองเกสรตัวผู้ซึ่ง

เข้าไปปฏิกิริยาในรังไข่ สเปิร์มของเชื้อราที่เข้าไปในรังไข่จะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเปลือกและเจริญอยู่ภายในฝักมะขามพร้อมกับเจริญเติบโตของฝักมะขาม ดังนั้นเมื่อตรวจเชื้อในฝักอ่อนทุกระยะและฝักแก่ที่ไม่มีรอยแตกหรือร่องรอยของการถูกทำลายด้วยเชื้อราจากฝักนอก จะตรวจพบเชื้อดังกล่าวอยู่ภายในฝักมะขาม

จากปัญหาดังกล่าวทำให้การกำจัดเชื้อราด้วยวิธีการกำจัดจากภายนอก เช่น การใช้ยากำจัดเชื้อรา การเก็บผลผลิตในที่แห้ง หรือกระบวนการเก็บเกี่ยวและเก็บรักษาที่ทำให้มะขามปราศจากเชื้อราเป็นไปได้ยากขึ้น แต่โดยทั่วไปแล้ว ในธรรมชาติของพืชเองนั้นมักมีกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งรบกวนอยู่ ทั้งในส่วนของการออกดอกและติดผลในช่วงที่มีสิ่งรบกวนน้อย 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

กลุ่มนี้มีลักษณะการแสดงออกของยีนไคติเนสที่แตกต่างกันก็จะพอสรุปเบื้องต้นได้ว่า ความสามารถในการทนต่อเชื้อราที่นั้นเกิดจากระบบการทำงานของยีนไคติเนสและการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสได้

มะขามที่มีความต้านทานต่อเชื้อราที่แตกต่างกันจะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนไคติเนสที่แตกต่างกันเป็นผลให้มีกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไคติเนสซึ่งเป็นยีนที่มีความสามารถในการต้านเชื้อราที่แตกต่างกัน โดย ในมะขามพันธุ์ปลูกที่มีความต้านทานต่อเชื้อราจะมีการแสดงออกของยีนไคติเนสมากกว่ายีนไคติเนสในมะขามพันธุ์ปลูกที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อรา และเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของยีนไคติเนสในมะขาม จะพบว่ามีลำดับที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank Accession number HM222538 ซึ่งเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงของยีนต้านเชื้อรา

การสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช การแข่งขันและครอบครองพื้นที่การเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้อย่างรวดเร็วในดิน และการเป็นปรสิต โดยการสร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นสร้างเอนไซม์ย่อยสลายได้แก่ เอนไซม์ chitinase, β -1,3-glucanase, protease และ cellulase ออกมาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เอนไซม์ chitinase ทำหน้าที่ย่อยสลายไคติลินซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ N-acetyl-Dglucosamine ด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic bond (Fukamizo, 2000) chitinase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในโลกในการเป็นปรสิต เนื่องจากผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่มีไคติลินเป็นองค์ประกอบ 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) การจำแนกสายพันธุ์พืช เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาคำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม การใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษาลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชหลายๆ ประการ เช่น ผลผลิต และลักษณะการเจริญเติบโตของพืช โดยลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกัน การแสดงออกเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดยใช้

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาช่วยในการทำแผนที่ ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่สนใจจนสามารถนำส่วนของยีนที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีจำนวนเบสซ้ำในหนึ่งหน่วยเบสซ้ำประมาณ 1-6 เบส เรียงอยู่ต่อเนื่องกัน กระจายทั่วทั้งจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในโลกสิ่งหนึ่งๆ ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วมได้ (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน ไพรมเมอร์ (primer) ที่สร้างขึ้นสำหรับพีซีอาร์นั้น มีความจำเพาะเจาะจง แต่การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธีมาตรฐานค่อนข้างยุ่งยากใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และในปัจจุบันได้มีการทำฐานข้อมูลจากฐานข้อมูลสาธารณะ 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) แต่การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอบางบริเวณพบมาก บางบริเวณพบน้อย ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือส่วนนาร์หัสของยีน (non-coding region) โดยเฉพาะพวกที่ชุดซ้ำมีขนาดไม่เท่ากับ 3 เบส เพราะถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของชุดซ้ำจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีส่วนน้อยที่พบอยู่ส่วนนาร์หัสของยีนหรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่ชนาบข้างกับเบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะของลำดับเบสนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ โดยการออกแบบไพรมเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) เหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า ไมโครแซทเทลไลต์ไพรมเมอร์ ไพรมเมอร์เหล่านี้จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ ความหลากหลายของชนิดดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน ซึ่งจะใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Ince et al., 2009; Karaca et al., 2005; สุรินทร์, 2552) ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์นี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง ทั้ง

ในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางแผนตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะ ในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002)

อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญของการพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์นั้น ต้องใช้ระยะเวลานาน มีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายในการพัฒนาค่อนข้างสูงมาก โดยต้องอาศัยการโคลนไมโครแซทเทลไลต์ และการหาลำดับเบส เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่ขนานข้างกับไมโครแซทเทลไลต์ 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 โดยใช้หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจสอบและแยกขนาดโดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ

อะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 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 การพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะจะต้องมีการคัดกรอง EST ก่อน เพื่อลดความซ้ำซ้อนของข้อมูล และข้อมูล EST ส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ดังนั้น ในพืชพื้นเมืองอาจจะต้องใช้ข้อมูลของ EST ในพืชที่อยู่ในสกุลหรือวงศ์เดียวกัน ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ในพืชที่ยังไม่มีฐานข้อมูล

4. เทคนิคทางชีวโมเลกุล

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 ปฏิกริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90–95 °C ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °C เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ

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

หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA Polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่หนึ่ง เรียกว่า Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°C

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

ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA Polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72°C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอ สายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. DNA Polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพเมอร์จำเพาะ

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

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือชิ้นส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA Thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสง UV ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น

จากการใช้พื้นฐานความรู้ในการศึกษาลักษณะของยีนและการใช้เทคนิค PCR ร่วมกัน ทำให้เกิดเป็นงานวิจัยใหม่ๆ มากมาย สามารถวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน การตอบสนองและการต้านทานต่อสภาพแวดล้อมของพืชได้โดยการใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาเกี่ยวข้องดังงานวิจัยต่างๆ ได้แก่

สุวิตา และคณะ (2554) ทำการโคลนยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ซึ่งเป็นโอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความต้านทานโรคใบจุดเป่ากระสุนในมะเขือเทศ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนไคตินเนสด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตพันธ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส เมื่อทำการโคลนยีนไคตินเนส โดยเชื่อมต่อผลิตพันธ์ 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 % ยีนไคตินเนสที่ได้

จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศเพื่อปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความต้านทานต่อโรคของมะเขือเทศ

มานะ ขาวเมฆ (2553) ศึกษาการแสดงออกของยีนไคตินเนสจากกระถินบ้านในข้าวไทยดอกมะลิ 105 และข้าวญี่ปุ่นโกชิอิการิ 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 พบว่าการแสดงออกของยีนไคตินเนสและยีน gus ในข้าวดอกมะลิ 105 จะมีมากกว่าในข้าวโกชิอิการิ โดยจะมีการแสดงออกในทุก ๆ ส่วนของข้าวทั้ง 2 ชนิด แต่จะมีการแสดงออกน้อยที่สุดในรากส่วนใน ใบ ลำต้น และเมล็ด จะมีการแสดงออกของยีนไคตินเนสและยีน gus มาก แสดงว่ายีนไคตินเนสจะมีในใบ ต้น และเมล็ดมากกว่าในราก เมื่อทดสอบการต้านเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* ในต้นข้าวทั้งข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิอิการิ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้น ปรากฏว่าต้นข้าวที่ได้รับการสเปรย์เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์หลังจากนั้นสองวันต้นข้าวมีลักษณะเหี่ยว ใบเริ่มเหลือง และเมื่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ต้นข้าวเหี่ยว ใบเกิดจุดสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ไม่ได้นิยพ่นเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่ไม่มียีนของไคตินเนสจะไม่สามารถต้านทานเชื้อรา จึงทำให้เกิดโรคเชื้อราในข้าวได้

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีจำนวนเบสซ้ำในหนึ่งหน่วยเบสซ้ำประมาณ 1-6 เบส เรียงอยู่ต่อเนื่องกัน กระจายทั่วทั้งจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในโลกสิ่งหนึ่งๆ ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วมได้ (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน ไพรมเมอร์ (primer) ที่สร้างขึ้นสำหรับพีซีอาร์นั้น มีความจำเพาะเจาะจง แต่การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธีมาตรฐานค่อนข้างยุ่งยากใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และในปัจจุบันได้มีการทำฐานข้อมูลจากฐานข้อมูลสาธารณะ 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 และ เบสซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA) n โดยที่ n เป็นจำนวนครั้งของเบสซ้ำ ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม (Powell et al., 1996) แต่การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอบางบริเวณพบมาก บางบริเวณพบน้อย ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือส่วนนำรหัสของยีน (non-coding region) โดยเฉพาะพวกที่ชุดซ้ำมีขนาดไม่เท่ากับ 3 เบส เพราะถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของชุดซ้ำจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีส่วนน้อยที่พบอยู่ส่วนนำรหัสของยีนหรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่ข้างกับเบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะของลำดับเบสนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) เหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า “ไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์” ไพรเมอร์เหล่านี้จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน ซึ่งจะใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Ince et al., 2009; Karaca et al., 2005; สุรินทร์, 2549) ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์นี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะ ในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002)

อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญของการพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์นั้น ต้องใช้ระยะเวลานาน มีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายในการพัฒนาค่อนข้างสูงมาก โดยต้องอาศัยการโคลนไมโครแซทเทลไลต์ และการหาลำดับเบส เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่ขนานข้างกับไมโครแซทเทลไลต์ 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 และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีน และประยุกต์ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดอย่างกว้างขวาง

เครื่องหมาย EST-SSR (expressed sequence tags) expressed sequence tags (EST) เป็นลำดับดีเอ็นเอส่วนที่เป็น complementary DNA (cDNA) ของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ทำหน้าที่

คัดลอกรหัสดีเอ็นเอบางส่วนของจีโนม โดยทั่วไป จะสัมพันธ์กับการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีการพัฒนาในส่วนที่มีการแสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของลำดับเบสดีเอ็นเอ และที่ในส่วนที่เป็นเอ็กซอน (exon polymorphism) (Poncet et al., 2006) ลำดับดีเอ็นเอที่พบใน EST มีขนาด 500-800 นิวคลีโอไทด์ จะเกี่ยวข้องกับยีนที่มีการแสดงออก การใช้ลำดับ EST จะสามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต 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 โดยใช้หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจสอบและแยกขนาดโดยใช้ฮอว์กเกอร์ และอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 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

การเกิดรูปแบบลายสัคยดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล (2545) ได้อธิบายไว้ว่า การทำให้เกิดรูปแบบลายสัคยดีเอ็นเอมี 3 วิธี ดังนี้

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

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

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

การใช้ประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ DNA

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล (2545) ได้สรุปประโยชน์จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอไว้ดังนี้

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

3.1 ช่วยในการตรวจสอบ Somaclonal Variation ในกรณีที่มีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 ช่วยในการตรวจสอบ linkage ระหว่าง DNA marker กับลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อพันธุ์พืช เช่น ต้านทานโรคและแมลง ฯลฯ เพื่อช่วยในการคัดเลือกและหาตำแหน่งยีนบนโครโมโซม

3.3 ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอเวลาออกดอกหรือผล

4. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืช

วิธีการจัดจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุล

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

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

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

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

เอ็นเอ ตรวจสอบที่สามารถเข้าคู่หรือจับกันกับสาย ดีเอ็นเอ เป้าหมายตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (DNA hybridization) กันได้

นอกจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้างต้นแล้ว ยังมีลักษณะลำดับดีเอ็นเอบางบริเวณที่มีคุณสมบัติในการใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งสามารถแยกสิ่งมีชีวิตได้ลึกกว่าระดับสปีชีส์ กล่าวคือ กระบวนการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญได้แก่ การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพโดยการศึกษาความหลากหลายชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม และการติดตามการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางชีวภาพในแต่ละพื้นที่ ทั้งสองขั้นตอนสำคัญนี้ต้องเกี่ยวข้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้อง ซึ่งผู้ที่จะทำหน้าที่นี้ได้ดีที่สุดคือนักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญในการระบุสิ่งมีชีวิตเฉพาะกลุ่ม อย่างไรก็ตาม การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้องสามารถกระทำได้รวดเร็วและยังคงถูกต้องแม่นยำ แนวคิดของการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์จำเพาะต่อสปีชีส์ในการระบุชนิดเกิดขึ้นจากการเล็งเห็นประโยชน์เมื่อประยุกต์ใช้ในเชิงอนุรักษ์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

Hebert และคณะ (2003) เสนอคำว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อใช้สำหรับเรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่งๆ ในจีโนมที่มีลำดับเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ ในทำนองเดียวกันกับแถบบาร์โค้ดของสินค้าที่ระบุชนิดของสินค้า กลุ่มวิจัยนี้ได้ทดสอบใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย

บริเวณยีน Cytochrome c oxidase subunit 1 (Cox1 หรือ COI) ความยาว 648 คู่เบสในการระบุชนิดของสัตว์ และพบว่าเป็นเครื่องมือในการระบุชนิดของสัตว์หลายกลุ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ โครงการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตหรือ The Barcode of Life Project ได้เริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 2003 (Hebert et al, 2003) และได้รับการสนับสนุนต่อเนื่องจากหน่วยงานที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือจาก Members details.htm สมาชิกได้มีส่วนร่วมในการทดสอบใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ และพบว่าลำดับเบสของยีน COI ใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดสัตว์ได้ค่อนข้างดี เช่น การศึกษานกในทวีปอเมริกาเหนือ พบว่านกทุกชนิดมีลำดับเบสของยีน COI ที่ต่างกันอย่างชัดเจน โดยมีความแตกต่างเฉลี่ยระหว่างชนิด (interspecific variation) และความแตกต่างเฉลี่ยภายในชนิด (intraspecific variation) เท่ากับ 7.93% และ 0.43% ตามลำดับ และจากงานวิจัยนี้ทำให้พบนกชนิดใหม่ 4 ชนิด เนื่องจากมีนก 4 ตัวอย่างที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างออกไป จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน พฤติกรรม ร่วมกับเสียงร้องใหม่จึงทำให้จัดนกที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างต่างนั้นเป็นนกชนิดใหม่ 4 ชนิด (Hebert et al., 2004)

ในขณะที่การค้นหาดีเอ็นเอบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดพืชยังเป็นความท้าทายเนื่องจากยีน COI จากไมโทคอนเดรียในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ ทำให้มีความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดพืชได้ นักวิจัยจึงมุ่งความสนใจมาที่ลำดับ

ดีเอ็นเอในพลาสติกจีโนมหลายกลุ่มวิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการระบุชนิดพืชของดีเอ็นเอบริเวณต่างๆ ในพลาสติก โดยบริเวณที่มีความเหมาะสมในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดควรมีลำดับเบสที่มีความแปรผันในต่างสปีชีส์ (interspecific variation) สูงกว่าความแปรผันภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecific variation) กลุ่มทำงานทางด้านพืช (Plant Working Group; PWG)

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

สำหรับในกลุ่มพืช ยังไม่สามารถระบุบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ได้แน่นอน ตัวอย่างการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับดีเอ็นเอที่ควรใช้เป็น DNA barcode ได้แก่ ในปี ค.ศ 1999 Hilu และ Alice ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Poaceae โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *matK* พบว่ายีนนี้ถอดรหัสให้กรดอะมิโนจำนวนไม่เท่ากันใน และพบการเพิ่มหรือการขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาบริเวณอื่น เช่น ยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS โดย Chase และคณะ (2005) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS จะเป็นข้อมูลที่ดี และมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genbank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่ม และพบว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcl* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่า จึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิด และน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสติกบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืช (<http://www.kew.org/barcoding/update.html>) แต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งาน

จริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในแง่ของการนำมาใช้เป็น DNA barcode

บริเวณ *rbcL* และ *matK*

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

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

rbcL เป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอยคาร์บอนไดออกไซด์เป็น ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) เอนไซม์ RubisCO ที่สมบูรณ์ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กรวมตัวกัน) จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO₂ ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcL* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาว

ตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (Kress & Erickson, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010) จุดเด่นของยีน *rbcL* ที่ CBOL Plant Working Group

พิจารณาว่าเหมาะสำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานคือ มีความเป็นมาตรฐานสากล และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก แม้ว่าประสิทธิภาพในการนำไปใช้แยกและระบุชนิดพืชจะค่อนข้างต่ำแต่เมื่อใช้ร่วมกับบริเวณอื่น เช่น *matK* จะให้ผลการแยกและระบุชนิดพืชได้ดีขึ้น ส่วนยีน *matK* เป็นยีนที่มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ maturase ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Group I introns splicing (Hilu & Liang, 1997) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานจะเลือกเพียงบางบริเวณของยีนให้มีความยาว 700-800 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ข้อดีของยีนนี้คือมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ระบุชนิดพืชได้ดีอีกทั้งยังให้คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในเกณฑ์ดีเช่นเดียวกับยีน *rbcL* แต่ข้อด้อยของยีน *matK* ที่เป็อุปสรรคสำหรับการนำไปใช้สร้าง DNA barcode คือมักไม่มีความเป็นมาตรฐานสากล กล่าวคือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนนี้ให้ผลสำเร็จน้อยมาก โดยเฉพาะในกลุ่มพืชไร่เมล็ดซึ่งให้ผลสำเร็จเพียง 10% ส่วนในพืชกลุ่มจิมโนสเปิร์มให้ผลประมาณ 83% และในพืชดอกให้ผลดีที่สุดประมาณ 90% (CBOL Plant Working Group, 2009)

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

เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่มีความจำเพาะขึ้นในหลอดทดลองโดยทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ จากการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่าง

1. เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ
2. ดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ 2 สายหรือไพรเมอร์ (DNA primer) ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ สายใหม่ เป็นตัวกำหนดขนาดของ ดีเอ็นเอที่ทำการสังเคราะห์
3. นิวคลีโอไทด์อิสระ

4. สายดีเอ็นเอ เป้าหมาย ภายในหลอดทดลอง

ภายหลังการทำปฏิกิริยาจะได้สาย ดีเอ็นเอ ใหม่จำนวนมากที่ถูกกำหนดขนาดตามระยะห่างของไพรเมอร์ทั้ง 2 สายที่เข้าจับบนสายต้นแบบเมื่อเริ่มปฏิกิริยาสังเคราะห์

เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ ที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

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

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

ผลที่ได้จากการตรวจสอบคือ แถบ ดีเอ็นเอ ขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น โดยขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอ จะถูกกำหนดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์ ที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์จับบนสาย ดีเอ็นเอ จุดจับของ ไพรเมอร์ บนสาย ดีเอ็นเอ ที่ต่างกันจึงทำให้ชิ้น ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน

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

การใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA

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

เครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (PCR machine)

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

การวิเคราะห์ผลผลิต ดีเอ็นเอ จากปฏิกิริยา PCR

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

การศึกษาระดับโมเลกุลของมะขาม

การศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ ในพืชสรุปได้ดังนี้

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

สมพงศ์ จันทรแก้ว (2554) โรคราแป้ง (powdery mildew) เป็นโรคที่สำคัญของถั่วเขียวที่ปลูกในช่วงที่มีสภาพอากาศแห้งและเย็นการที่โรคเกิดเฉพาะในฤดูหนาวเป็นข้อจำกัดที่ทำให้ความก้าวหน้าของการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ล่าช้า วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ ค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกับความต้านทานในถั่วเขียวสายพันธุ์ V 4718 เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน งานวิจัยนี้ได้สร้างประชากร F1 และ F2:3 จากผสมสมระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 (KPS1) ที่อ่อนแอต่อโรค (สายพันธุ์แม่) กับสายพันธุ์ V 4718 ที่ต้านทานต่อโรค (สายพันธุ์พ่อ)

พันธุ์พ่อ) แล้วปลูกทดสอบปฏิกิริยาของโรค พบว่า ปฏิกิริยาของโรคมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่องไม่สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต้านทาน และอ่อนแอได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานเป็นลักษณะปริมาณ และพบว่า ปฏิกิริยาของโรคไม่มีสหสัมพันธ์กับวันสุกแก่ ในส่วนของการวิเคราะห์เครื่องหมายโมโครแซเทลไลท์ในประชากร F2 พบว่า มี 2 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับความต้านทานโรคราแป้ง

สุนิดา อัญจิรวโรจน์ (2550) ได้ศึกษาคาร์โบไฮโปและชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่ามะขามทุกพันธุ์ปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์ มีจำนวนชุดของโครโมโซม $2n = 24$ โครโมโซม และสามารถใช้การมีแซเทลไลท์เฉพาะที่โครโมโซม บางตัวเป็นเครื่องหมายระดับโครโมโซมในการจำแนกชนิดของมะขามได้ นอกจากนี้ยังใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสในดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ rDNA ในนิวเคลียส เพื่อหาความแตกต่างของมะขามหวาน 10 พันธุ์ปลูก พบว่าลำดับเบสและแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับ 0.05

เบญจวรรณ รัตวัตร และ คณะ (2554) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 8 พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat (SSR) จากการศึกษาพบว่า ไพโรมอร์ที่ใช้คัดแยกลำดับเบสแบบซ้ำจำนวน 17 คู่ สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังได้ทั้ง 8 พันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 96 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 100 ถึง 380 คู่เบส แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน (polymorphic DNA) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.36 ค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.54 ถึง 0.83 และค่า Polymorphic information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.66 ถึง 0.90 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยวิธี unweighted pair group method arithmetic averages (UPGMA) โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) สามารถจัดมันสำปะหลังออกเป็น 3 กลุ่ม

นภาพร แก้วดวงดี และ คณะ (2555) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยมีหมากนวลเป็นกลุ่มนอก โดยสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) การทดลองใช้ไพโรมอร์ 33 แบบ พบว่าไพโรมอร์ 16 แบบสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างได้อย่างชัดเจน โดยเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวน 112 ตำแหน่ง และได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 381 แถบ จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์และสร้างเดนโดแกรมด้วยวิธี UPGMA พบว่าเดนโดแกรม (dendrogram) สามารถแยกมะพร้าวแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้ โดยมะพร้าวพวงร้อยกับมะพร้าวน้ำหอมมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic Similarity: S) เท่ากับ 0.82 เพราะมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน และมะพร้าวไฟมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับมะพร้าวกะทิมีค่า S เท่ากับ 0.79 จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าวนี จะช่วยส่งเสริมให้เกิดการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและแหล่งพันธุกรรมพืช

สมพงศ์ จันทรแก้ว และ คณะ (2554) ได้ทำการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกับความต้านทานในถั่วเขียวสายพันธุ์ V 4718 เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน งานวิจัยนี้ได้สร้างประชากร F1 และ F2:3 จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ กำแพงแสน 1 (KPS1) ที่อ่อนแอต่อโรค (สายพันธุ์แม่) กับสายพันธุ์ V 4718 ที่ต้านทานต่อโรค (สายพันธุ์พ่อ) แล้วปลูกทดสอบปฏิกิริยาของโรคพบว่า ปฏิกิริยาของโรคมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่องไม่สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต้านทาน และอ่อนแอได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานเป็นลักษณะปริมาณ และพบว่า ปฏิกิริยาของโรคไม่มีสหสัมพันธ์กับวันสุกแก่ ในส่วนของการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในประชากร F2 พบว่ามี 2 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับความต้านทานโรคระบาด

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

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

ชีวสารสนเทศ เป็นศาสตร์การจัดการข้อมูลทางชีววิทยาซึ่ง มีอยู่เป็นปริมาณมากเพื่อการประยุกต์มีจุดกำเนิดมาจากโครงการ The Human Genome Project ในปี 2533 โดยการสนับสนุนของสำนักสุขภาพแห่งชาติและกรมพลังงานแห่งสหรัฐอเมริกา โครงการนี้เป็นโครงการทางเทคโนโลยีทางชีวภาพที่สร้างความเปลี่ยนแปลงครั้งสำคัญอันหนึ่งของมนุษยชาติ มีการร่วมมือในระดับนานาชาติเพื่อศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนม มนุษย์ และต่อมาได้เกิดโครงการศึกษาจีโนมในสิ่งมีชีวิตอื่นอีก หลายชนิด เช่น จีโนมข้าว จีโนมหนู จีโนมยีสต์ เป็นต้น ทั้งหมดนี้ ก่อให้เกิดการพัฒนาเทคโนโลยีรวมถึงวิทยาการคอมพิวเตอร์ ควบคู่กันจนเป็นที่มาของศาสตร์ชีวสารสนเทศ โดยอาศัยการนำ ผลการทดลองจากการวิจัยในห้องปฏิบัติการ (in vitro informations) บันทึกลงในฐานข้อมูลที่แยกประเภทชัดเจน และเมื่อ ต้องการออกแบบการทดลองใหม่หรือตั้งสมมติฐานใหม่ก็นำข้อมูลดังกล่าวกลับมาช่วยวิเคราะห์ทำนายสมมติฐานหรือสร้างต้นแบบ การทดลองใหม่ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (in silico modeling) ล่วงหน้าก่อนการลงมือทำปฏิบัติการจริงได้ นับว่าเป็นการพัฒนาที่สำคัญยิ่ง ช่วยในการทำงานบางประเภทของ นักวิทยาศาสตร์ที่ในอดีตอาจเป็นไปได้เลย ตลอดจนลด ค่าใช้จ่ายและเวลาในการทำงาน ปัจจุบันมีฐานข้อมูลทางชีววิทยา ให้เลือกใช้หลากหลายตามการใช้งาน ตัวอย่างเช่น ข้อมูลของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของจุลชีพ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ เอนไซม์เซลล์ในรา ข้อมูลลิแกนด์แบบโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส ในแบคทีเรีย เป็นต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนจากสาย โพลีเปปไทด์หลายๆ สายของทั้งหมด หรือส่วนหนึ่งของสาย โพลีเปปไทด์ (alignment) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนาย โครงสร้างโปรตีน บริเวณที่จัดเรียงกันได้ดีที่สุดในโครงสร้าง จะมีการแสดงผลออกมาโดยการทำงานของโปรแกรมซึ่ง กำหนดค่า โดยผู้ใช้ การจัดเรียงที่ดีที่สุ่มนั้นมักเป็นการพยายามที่จะทำให้ ทั้งจำนวนของช่องว่างและ ลำดับกรดอะมิโนหรือดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) มีค่าน้อยที่สุด (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545) การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากการจัดเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ เป็นประโยชน์ต่อการทำงานทางชีวโมเลกุลมาก ทางด้านการวิเคราะห์หายีน โครงสร้างของยีน เช่น ส่วนที่ทำหน้าที่ ควบคุมการทำงานของยีน (regulatory elements) ส่วนที่จะ ทำการแปลรหัสเพื่อให้ได้โปรตีน (coding sequence) ซึ่ง สามารถ ประยุกต์ใช้ได้ในการบวนการโคลนเพื่อการสร้างโปรตีนลูกผสม ใหม่ๆ ขึ้น หรือแม้กระทั่งการจัดจำแนกและชี้เฉพาะสปีชีส์ของ สิ่งมีชีวิตโดยเทียบความคล้ายคลึงจากลำดับเบส และสร้าง แผนภาพ ต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตขึ้นมา เป็นต้น สำหรับในงานทางด้านโปรตีน มักเป็นการทำงานที่ เกี่ยวกับการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของโปรตีน วิธีการที่ง่ายที่สุดประกอบด้วย การเทียบบริเวณ หนึ่งบริเวณ หรือมากกว่าของโปรตีนเดียวกันแต่มาจากแหล่งที่มาที่ต่างกัน สามารถให้ข้อมูลที่เป็น ประโยชน์ได้เช่น

1. ความเหมือนหรือความต่างระหว่างการทำนาย โครงสร้างผลึก (crystal structure) ของสองลำดับกรดอะมิโน ที่อิสระต่อกัน
2. ความเหมือนหรือความต่างระหว่างภายในกลุ่มของ โครงสร้างหนึ่งๆ ซึ่งมักจะได้มาด้วยการวิเคราะห์ NMR spectroscopy
3. ความเหมือนหรือความต่างระหว่างโครงสร้างที่ได้ มาจากการใช้ข้อมูลทาง X-ray diffraction และ NMR spectroscopy
4. ความเหมือนหรือความต่างที่เกิดขึ้นระหว่าง อะโป- (apo-) หรือ ฮาโล- (halo-) โปรตีน
5. การเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างโปรตีนที่เกิดขึ้นเมื่อมีการ จับกับลิแกนด์ (ligand) โคแฟกเตอร์ (cofactor) หรือโลหะ

โปรแกรมเปรียบเทียบโครงสร้างโปรตีนคู่เหมือนส่วนใหญ่ มักถูกออกแบบเพื่อให้มาเทียบ โครงสร้างโปรตีนคู่เหมือน (homologous protein) ที่มาจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน มีโปรแกรม จำนวนมากมายและมีหลายยุทธวิธีที่ใช้กันในปัจจุบัน ในบทความนี้ จะขอยกตัวอย่างโดยสังเขป เพื่อประกอบ ความเข้าใจเท่านั้น ตัวอย่างที่ยกมานี้เป็นเพียงหลักการเบื้องต้นของการทำงานที่ นักอนุชีววิทยาใช้ใน งานวิจัย โดยส่วนใหญ่กระบวนการนี้มี สองแบบ (Higgins and Taylor, 2000) 1. สำหรับการประยุกต์ เพื่อวัตถุประสงค์เชิงวงศาคาน วิวัฒนาการหรือที่เรียกกันว่าวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogeny) จำเป็นที่ จะต้องสนใจจำนวนข้อมูลที่จะนำมาเทียบ วัตถุประสงค์ก็ เพื่อที่จะเพิ่มความแม่นยำได้ระหว่างการ จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือกรดอะมิโน (alignment of nucleotide or amino acid sequence) ที่ ใกล้เคียงกันที่ใกล้เคียงความจริง และเพื่อลดความ คลาดเคลื่อนทางสถิติให้มากที่สุดเช่นกัน 2. สำหรับ งานที่ต้องการหาโปรตีนที่ใกล้เคียงกับข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ นักวิทยาศาสตร์มักจะใช้โปรแกรม ที่ สามารถทำการเทียบลำดับโดยหาบริเวณที่เหมาะสมได้โดย อัตโนมัตินี้ โดยโปรแกรมจะทำการเลือก บริเวณการเริ่มเทียบโดย อัตโนมัตินี้ได้ทันที เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติหรือโครงสร้างของ โปรตีนที่ ต้องการศึกษากับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) เป็นศาสตร์เรียนรู้ด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพแขนงใหม่ ที่จะ เป็นวิชาการแขนงหนึ่งซึ่งมีความสำคัญมากที่สุด ในการศึกษาวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตในศตวรรษที่ 21 ผู้เชี่ยวชาญหลายท่านถึงกับกล่าวไว้ว่าศาสตร์แขนงชีววิทยาในยุคใหม่นี้ จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบจาก purely lab-based science ไปเป็น information science และแนวโน้มดังกล่าวก็เริ่มปรากฏให้เห็น เป็นรูปธรรมมากขึ้นในขณะนี้

ชีวสารสนเทศศาสตร์พัฒนามาจากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพด้านจีโนม จีโนมิกส์และโปรตีโอมิกส์ ประกอบกับพัฒนาการของวิทยาการทางด้านคอมพิวเตอร์และระบบ ฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ พืช สัตว์ และมนุษย์ ข้อมูลดังกล่าวมีอยู่ มากมายมหาศาล ก่อให้เกิดการพัฒนากระบวนการเก็บข้อมูล การวิเคราะห์และสังเคราะห์ข้อมูล ตลอดจน

การแปลผลจากข้อมูล โดยการผสมผสานกับงานวิจัยทางด้านคณิตศาสตร์ ด้านสถิติ และวิทยาการคอมพิวเตอร์ยุคใหม่ที่พัฒนาก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน

ข้อมูลทางชีววิทยาที่เกี่ยวกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) อย่างเช่น ข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมต่างๆ, ข้อมูลลำดับรหัสของโปรตีนชนิดต่างๆ, ข้อมูลปริมาณของชีวโมเลกุลชนิดต่างๆรวมถึงระดับการแสดงออกของยีน(gene)ต่าง ๆ อย่างพวกข้อมูลของ mRNA และโปรตีนที่ได้จากยีน(gene)นั้นๆ, และข้อมูลหมายเหตุต่างๆ (annotation data) โดยจะเอาข้อมูลเหล่านี้ไปทำการจัดเรียงลำดับรหัสของโปรตีน การจัดโครงสร้างของโปรตีน การทำนายโครงสร้างของโปรตีน การค้นหายีน(gene) หรือ การสร้างแบบจำลองทางวิวัฒนาการต่างๆ เป็นต้น เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้มีจำนวนมากและมีความซับซ้อนมาก หากศึกษาชีวสารสนเทศศาสตร์(Bioinformatics) จะทำให้การจัดเก็บ สืบค้น และประมวลผลข้อมูลต่างๆเหล่านี้ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 นำใบมะขาม จากมะขาม 10 พันธุ์ปลูก ได้แก่ สีสทอง ศรีชมพู ชันดี เปรี้ยวยักษ์ เปรี้ยวพื้นเมือง หมื่นจง น้ำผึ้ง อินทผลัม นิ่มนวล และนาศรีนวลเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20°C

1.2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Dolye & Dolye (1987) ทำได้โดยนำตัวอย่างใบอ่อนของมะขามมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และชั่งให้น้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม นำใส่โกร่งและเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่าง บดตัวอย่างให้เป็นผงจนละเอียด เติมสารละลาย Extraction buffer 500 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 0.1 M Tris – HCl, 0.05 M EDTA, 0.1 M NaCl และ 0.5% SDS) ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Proteinase K 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในระหว่างที่บ่มให้พลิกกลับหลอดไปกลับมาเบาๆเป็นครั้งคราว เติมสารละลาย Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนบนใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) 500 ไมโครลิตร อีกครั้ง กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนบนใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม Isopropanol ที่แช่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วย 100% ethanol และเติมสารละลาย 70% Ethanol: 10 mM Ammonium Acetate 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปกลับมาเบาๆ เทสารที่เหลือทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง โดยทิ้งไว้ประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง เติมสารละลาย TE buffer 40 ไมโครลิตร และเติม RNase A 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 40 นาที และเก็บไว้ที่ -20°C

2. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

2.1 วิธี Gel electrophoresis ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบความสว่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) 0.8 % agarose gel นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

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

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

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

3. การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทดสอบใช้ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 10 พันธุ์โดยทดสอบจากปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่ปริมาณ 50 นาโนกรัม เป็นแม่แบบ โดยเลือกไพรเมอร์ 1 เส้น เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี และนำผลผลิตของอาร์เอพีดีมาตรวจสอบผลด้วย 1.5 % agarose gel

3.2 ตรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ 40 เส้น มาทดสอบกับดีเอ็นเอหนึ่งตัวอย่าง เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตรต่อหลอด (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. DNA templat (50 ng/ μl)	1	50 ng
2. Buffer (10 เท่า)	1.5	1.0 เท่า
3. MgCl_2 (50 mM)	7.5	2.5 mM
4. dNTP (10 mM)	0.3	200 μM
5. Primer (4 μM /100 μl)	1.2	2.0 μM
6. Taq DNA polymerase	0.25	0.5 U/15 μl

(2U/ μ l)		
7. ddH ₂ O ปลอดเชื้อ	10	-
รวม	15	-

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ให้เข้ากันในหลอดสำหรับ PCR และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยมีรายละเอียดของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 predenature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ	
ขั้นที่ 2 denature	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที	} จำนวน 40 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
ขั้นที่ 3 final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ	

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

3.3 นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ที่เลือกได้ในข้อ 4.2

3.4 ตรวจสอบผลบน agarose gel 1.2%

4. การวิเคราะห์ผล

4.1 การคำนวณหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาขนาดน้ำหนักของโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างจากระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.2 เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์มะขามที่มีความสามารถทนเค็มระดับต่างกัน จะถูกคัดเลือกเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาในที่เกี่ยวข้องต่อไป

4.3 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (% Polymorphism: P) โดยเปลี่ยนขนาดน้ำหนักโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอเป็นข้อมูลตัวเลข 0 และ 1 โดยเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่น้ำหนักโมเลกุลหนึ่งให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่พบชิ้นดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 1 เมื่อพบชิ้นดีเอ็นเอ นับชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมาทั้งหมด และจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์มะขาม นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรม

จากสูตร

$$P = N_p / N_A \times 100$$

P = เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรม

N_p = จำนวนชนิดเอ็นเอที่แตกต่าง

N_A = จำนวนชนิดเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาทั้งหมด

5. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. ใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสจากจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอมะขามพันธุ์ปลุกสีทอง ศรีชมพู ขันดี เปรี้ยวยักษ์ เปรี้ยวพื้นเมือง หมิ่นจง พันธุ์น้ำผึ้ง อินทผลัม พันธุ์นิ่มนวล พันธุ์นาศรีนวล อย่างละ 5 ต้น ของทุกพันธุ์ปลุกจากการทดลอง โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยใช้ชุด kit “Real Genomic GP50” ของ บริษัท RBC Bioscience Crop Taiwan เก็บไว้ที่ -20°C

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Kit มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

Tissue dissociation

- 1.1.1 ตัดใบพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆ 50-100 mg ใบสด/ใบแช่แข็ง (ถ้าแห้งใช้ 5 mg – 100 mg)
- 1.1.2 บดตัวอย่างใน Liquid N_2 จนละเอียดเป็นผง
- 1.1.3 ใช้ข้อดูดสารชนิดโลหะที่สะอาดดักผงใบพืชใส่ลงในหลอด microcentrifuge

Lysis

- 1.1.4 ใส่ 400 μl GP1 buffer
- 1.1.5 ใส่ 5 μl RNase A (10 mg/ml) ปั่นด้วย vortexing ห้ามผสม GP1 buffer กับ RNase ก่อนใช้
- 1.1.6 incubate ที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างนั้นกลับหลอดทุก 5 นาที
- 1.1.7 ใส่ 100 μl GP2 buffer ผสมด้วย vortexing
- 1.1.8 แช่ในน้ำแข็งทุบละเอียด 3 นาที
- 1.1.9 วาง filter column ลงในหลอด collection ขนาด 2 ml แล้วเทสารนี้ผ่าน filter
- 1.1.10 ปั่นเป็นเวลา 3 นาที ที่ 13,000 rpm
- 1.1.11 ทิ้ง filter column ค่อย ๆ เทซูเปอร์นาแตนท์จาก collection tube ลงในหลอด microcentrifuge tube อันใหม่

DNA binding

- 1.1.12 เติม GP3 buffer (isopropanol) ประมาณ 1.5 เท่า เขย่าด้วย vortexing 5 นาที (ตัวอย่าง ใส่ 750 ul GP3 ลงใน 500 ul ของ lysate)
- 1.1.13 วาง GD column บน collection tube ขนาด 2 ml
- 1.1.14 ใส่ 700 ul ของ ของผสม (รวมทั้งของที่ตกตะกอน) จาก step ก่อน บน GD column
- 1.1.15 ปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 1.1.16 เทของใส่ทิ้ง แล้ววาง GD column กลับลงไปใน collection tube
- 1.1.17 ทำข้อ 14-16 อีกครั้ง เทของผสมส่วนที่เหลือ ลงไปใน GD column
- 1.1.18 เทส่วนใส่ทิ้ง แล้ววาง GD column กลับลงไปใน collection tube Wash
- 1.1.19 ใส่ 400 ul ของ W1 buffer ลงใน GD column
- 1.1.20 ปั่นที่ 13,000 rpm 30 วินาที
- 1.1.21 รินส่วนใส่ทิ้ง ใส่ GD column กลับลงไปใน collection tube
- 1.1.22 ใส่ 600 ul ของ wash buffer (ethanol ลงใน GD column)
- 1.1.23 ปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 1.1.24 รินส่วนใส่ทิ้ง ใส่ GD column กลับลงไปใน collection tube
- 1.1.25 ปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ตัวอย่างแห้ง

DNA Elution

- 1.1.26 ย้าย GD column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge อันใหม่ที่ตัดฝาทิ้ง
- 1.1.27 ใส่ 100 ul ของ preheated elution buffer ตรงกลางของ column
- 1.1.28 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ในอุณหภูมิห้อง
- 1.1.29 นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 1.1.30 ย้ายสารละลาย DNA ที่กรองได้ใส่ 1.5 ml microtube อันใหม่ ปิดฝานำไปแช่ใน -20°C

1.2 ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 15 นาที ในสารละลาย Tris-acetate (TAE) buffer, pH 5.0 (Tris-acetate 0.04 โมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1.0 % เป็นตัวกลาง และใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น marker ย้อมแผ่นอะกาโรสเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel documentation รุ่น Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Canada)

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

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

- ขั้นที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที
- ขั้นที่ 3 Primer annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที
- ขั้นที่ 4 Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- ขั้นที่ 5 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

6. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ ปฏิกิริยาประกอบด้วย

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

ปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นที่ 1 94 °C เป็นเวลา 3 นาที, ขั้นที่ 2 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นที่ 3 55-60 °C เป็นเวลา 30 วินาที, ขั้นที่ 4 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที ทำซ้ำ

ขั้นที่ 2-4 35 รอบ และขั้นที่ 5 72 °C เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลพอลิอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 10 % และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

7 . การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint analysis)

2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะขาม 5 พันธุ์ปลูก ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160) โดยใช้โปรแกรม ‘Multiple sequence alignment with hierarchical clustering’ (Corpet, 1989) และ BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) ลงทะเบียน (submitted) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างผ่านทางฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

ตรวจนับแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad Laboratories, Canada) และให้คะแนน (Scored) โดยให้คะแนนจากการปรากฏ (present) ของแถบที่ตำแหน่งนั้นๆ ให้เท่ากับ 1 และการไม่ปรากฏแถบ (absent) เท่ากับ 0 นำชุดข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเหมือนหรือใกล้เคียงกัน (Similarity index, S.I.) ตามสมการของ Nei และ Li (1979) ดังนี้

$$S.I. = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

เมื่อ x และ y คือ มะขามพันธุ์ปลูก x และ y

N_{xy} คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันในทั้งมะขามพันธุ์ปลูก x และ y

N_x และ N_y คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก

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

7.1 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 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการ

เสื่อมสภาพได้ง่ายและเพื่อไม่ต้องการให้เกิดปฏิกิริยาก่อนการเติม cDNA จึงควรเติม *Taq* DNA polymerase นี้นลงในปฏิกิริยาเป็นอันดับสุดท้ายใน master mix ก่อนการเติม cDNA เมื่อเตรียม master mix เรียบร้อยแล้ว ทำการปิเปตสารลงในหลอดทดลองแต่ละตัวอย่าง หลังจากนั้นเติม cDNA แต่ละตัวอย่างลงไปและเริ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermal cycler

7.2 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 - 1,00 bp มักเตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้นที่ประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากการทดลองนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 200 bp และ 246 bp การตรวจสอบจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ให้มากขึ้นเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นของ agarose gel ที่มีค่าสูง ช่องว่างระหว่างโมเลกุลในเนื้อสารจะยิ่งมีค่าลดลง จึงทำให้ดีเอ็นเอที่ยิ่งมีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไปตามแรงดันกระแสไฟฟ้าได้ลดลง ในขณะที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะยังคงสามารถเคลื่อนผ่านช่องว่างระหว่างโมเลกุลของ agarose gel ได้ ด้วยเหตุนี้ การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้ดีขึ้น

7.3 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความหลากหลาย หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในรูปของค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (per locus average) ของแอลลีลที่ประกอบด้วย averaged number of alleles (N_a), effective number of alleles (A_e) และ allelic richness (R) และรวมถึงค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ทั้งค่าสังเกต (observed heterozygosity, H_o) และค่าคาดคะเน (expected heterozygosity, H_e) และทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) ในแต่ละประชากร โดยการวิเคราะห์ ณ แต่ละตำแหน่งที่มีความหลากหลายแบบทางพันธุกรรม (polymorphic locus) ด้วยวิธี likelihood ratio test (Yeh *et al.*, 1999) และวิเคราะห์รวมทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยวิธี Chi-square test (Smouse *et al.*, 1983) ตรวจวิเคราะห์ null allele ในทุก

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

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยวิธี analysis of molecular variance (AMOVA) โดยระบุกลุ่มประชากรตามที่ปรากฏในโครงสร้างความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างให้ครอบคลุมทุกระดับที่ปรากฏในโครงสร้าง โดยตรวจสอบจากค่า F-statistics (inbreeding coefficients หรือ fixation indexes) ซึ่งคำนวณจากค่า variance components แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า P ในทุกระดับ และทุกคู่ประชากร ของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า P ที่ 0.02 (Fu, 1997; Alonso and Armour, 2001; Excoffier *et al.*, 2006; Holsinger, 2012) การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรทุกคู่ ใช้การวิเคราะห์ค่า P ของ F_{st} ระหว่างคู่ประชากร (PF_{st}) และวิธี exact test (P_{exact}) ภายใต้ระดับนัยสำคัญของค่า P ที่ได้รับการปรับโดยใช้ Bonferroni correction เพื่อความถูกต้องสำหรับการทดสอบแบบ multiple tests (Rice, 1989) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.1

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบของมะขาม 10 สายพันธุ์ คือ สีทอง ศรีชมภู ชันตี เปรี้ยวยักษ์ เปรี้ยวพื้นเมือง หมิ่นจง น้ำผึ้ง อินทผลัม น้มนวล และนาศรีนวล เมื่อตรวจสอบผลบน 0.8% agarose gel ที่ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide เมื่อวัดเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในขั้นตอน PCR ต่อไป และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอสามารถหาค่าเข้มข้นได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l)

พันธุ์ปลูก	ความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/μl)			
	สกัดครั้งที่	1	2	3
สีทอง		1173.3	256.6	208.3
ศรีชมภู		910.0	826.6	645.0
ชันติ		943.3	943.3	821.6
เปรี้ยวยักษ์		618.3	651.6	626.1
ประกายทอง		676.0	636.0	665.0
เปรี้ยวพื้นเมือง		1351.6	1088.3	906.6
หมื่นจง		1100.0	1208.3	1128.3
น้ำผึ้ง		925.0	961.6	968.3
อินทผลัม		913.0	876.6	853.3
น้มนวล		870.0	846.6	801.6
นาศรีนวล		826.6	736.6	873.3

หลังจากการสกัดดีเอ็นเอ หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm และหาความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) หากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6 -1.8 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.6 แสดงว่าดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์อื่นๆ และถ้า

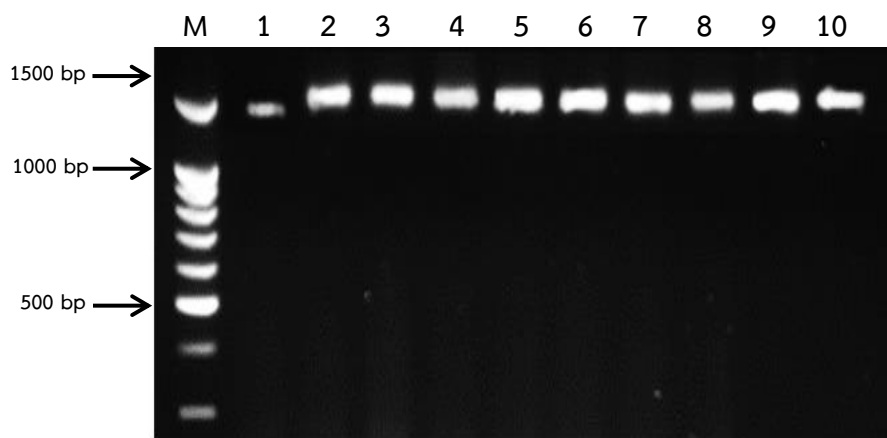
มากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งจากการตรวจสอบดังกล่าวได้ค่าสัดส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A_{260}/A_{280} ของใบมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ

พันธุ์ปลูก	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280})				
	ซ้ำที่	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
สีทอง		1.7	1.9	1.6	1.7
ศรีชมภู		2.0	2.1	1.8	1.9
ขันตี		2.1	1.8	1.8	1.9
เปรี้ยวยักษ์		1.7	1.7	1.9	1.7
ประกายทอง		1.8	1.9	1.9	1.8
เปรี้ยวพื้นเมือง		2.0	1.8	1.6	1.8
หมื่นจง		1.7	2.1	2.0	1.9
น้ำผึ้ง		2.1	2.0	1.6	1.9
อินทผาลัม		1.6	1.8	1.7	1.7
นิ่มนวล		1.9	1.7	1.6	1.7
นาศรีนวล		1.6	1.7	1.6	1.6

เมื่อวัดค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแล้ว นำมาตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟเรซิส และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย Spectrophotometer เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ หากขึ้นจีโนมิกดีเอ็นเอมีความสมบูรณ์ ไม่แตกหักเสียหายมากนัก ดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะรวมตัวกันอยู่บริเวณด้านบนของเจลและมักไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลลงไปยังด้านล่างได้มากนัก การสกัดดีเอ็นเอของพืชควรเลือกใบอ่อนของพืช เพราะเป็นแหล่งของดีเอ็นเอที่แท้จริง และสอดคล้องกับการทดลองของ Michiels และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษาการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบของพืชโดยการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของใบอ่อนและใบแก่ พบว่า ใบพืชอ่อนจะมีองค์ประกอบของสารประกอบประเภทพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) และพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compounds) น้อยกว่าใบแก่ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะมีผลต่อปฏิกิริยากับโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกในรูปของตะกอนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ สารประกอบพอลิแซคคาไรด์และพอลิฟีนอลิกยังมีส่วนในการยับยั้งดีเอ็นเอในขั้นตอนการสกัดอีกด้วย ซึ่ง

สอดคล้องกับ Lim และคณะ (1997) ภายหลังจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล พบว่า ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและอาจมีการปนเปื้อนของสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีอยู่ในพืช จากดีเอ็นเอที่ได้ สามารถนำมาตรวจสอบโดยวิธีการเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในภาพที่.....



ภาพที่ 6 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะขาม 10 พันธุ์ปลูก บน 0.8% agarose gel

- หมายเหตุ Lane M คือ 100 bp DNA Maker
- Lane ที่ 1 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกสีทอง (SE)
 - Lane ที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภู (SC)
 - Lane ที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกขันตี (KT)
 - Lane ที่ 4 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ (PY)
 - Lane ที่ 5 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง (PM)
 - Lane ที่ 6 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง (MJ)
 - Lane ที่ 7 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกน้ำผึ้ง (NP)
 - Lane ที่ 8 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกอินทผาลัม (IN)
 - Lane ที่ 9 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกนิ่มนวล (NN)
 - Lane ที่ 10 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกนาศรีนวล (NS)

2. ผลการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

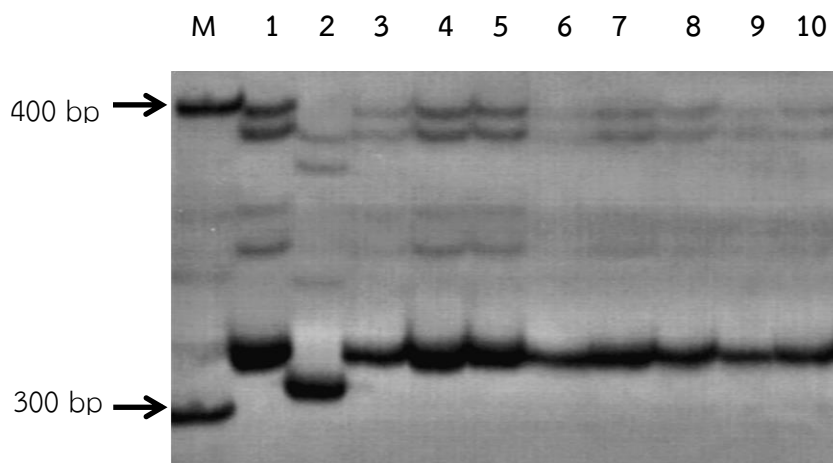
2.1 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของมะขาม

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจด้วยไพรเมอร์ที่แตกต่างกันตามความสามารถของไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถเข้าจับกับจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามในแต่ละพันธุ์ปลูก โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มีจำนวนทั้งหมด 5 คือ 5' AGAAACCCACTGATTGGTCACAC 3', 5' ACAACCTTGCCAAAATACTGAG 3', 5' GCTCCAGCTCGCAGTTTAACG 3', 5' AATTGATCAGCACAGGGAGGAAC3' และ 5' GTACCTCAAGCTTTGCTGCTC 3' ซึ่งใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะขามในแต่ละพันธุ์ปลูกได้ ดังตารางที่ 3 ตารางที่ 4 ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะขามทั้ง 10 พันธุ์ปลูกเป็นต้นแบบ

ลำดับที่	พันธุ์มะขาม	นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จาก ปลาย 5' ไปยัง 3'
1	สีทอง (SE)	5' AGAAACCCACTGATTGGTCACAC 3' 5' CCAATGTGGTTCATCTTCCTTCA 3'
2	สีชมพู (SC)	5' ACAACCTTGCCAAAATACTGAG 3' 5' CTGCACGTTGACCTCCCTTTAAC 3'
3	ขันตี (KT)	5' AGAAACCCACTGATTGGTCACAC 3' 5' CCAATGTGGTTCATCTTCCTT CA 3'
4	เปรี้ยวยักษ์ (PY)	5' ACAACCTTGCCAAAATACTGAG 3' 5' CTGCACGTTGACCTCCCTTTAAC 3'
5	เปรี้ยวพื้นเมือง (PM)	5' GCTCCAGCTCGCAGTTTAACG 3' 5' GGAATTCAGTCCCGTTGCTG 3'
6	หมื่นจง (MJ)	5' AGAAACCCACTGATTGGTCACAC 3' 5' CCAATGTGGTTCATCTTCCTTCA 3'
7	น้ำผึ้ง (NP)	5' AATTGATCAGCACAGGGAGGAAC3' 5' CCAATGTGGTTCATCTTCCTTCA 3'
8	อินทผลัม (IN)	5' GTACCTCAAGCTTTGCTGCTC 3' 5' CACCAACACAAAGATTAGCACG 3'
9	นิ่มนวล (NN)	5' AGAAACCCACTGATTGGTCACAC 3' 5' CCAATGTGGTTCATCTTCCTTCA 3'
10	นาครีนวล (NS)	5' AATTGATCAGCACAGGGAGGAAAC 3' 5' CCAATGTGGTTCATCTTCCTTCA 3'

3. การวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะขาม 10 สายพันธุ์ คือ สีทอง ศรีชมภู ชันดี เปรี้ยว ยักษ์ เปรี้ยวพื้นเมือง หมื่นจง น้ำผึ้ง อินทผลัม นมโนล และนาศรีนวล ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของมะขาม 10 สายพันธุ์ดังกล่าว เมื่อตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel พบไพรเมอร์ทุกเส้นที่ใช้ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะขามได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามจากไพรเมอร์แต่ละเส้นมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกันดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะขาม 10 พันธุ์ปลูก บน 1.5 % agarose gel

- หมายเหตุ Lane M คือ 100 bp DNA Maker
- Lane ที่ 1 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกสีทอง (SE)
 - Lane ที่ 2 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภู (SC)
 - Lane ที่ 3 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกชันดี (KT)
 - Lane ที่ 4 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ (PY)
 - Lane ที่ 5 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวพื้นเมือง (PM)
 - Lane ที่ 6 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง (MJ)
 - Lane ที่ 7 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกน้ำผึ้ง (NP)
 - Lane ที่ 8 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกอินทผลัม (IN)
 - Lane ที่ 9 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกนมโนล (NN)
 - Lane ที่ 10 คือ ดีเอ็นเอจากใบมะขามพันธุ์ปลูกนาศรีนวล (NS)

จากผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของมะขามจำนวน 10 พันธุ์ปลูก แสดงถึงการจัดจำแนกกลุ่มของมะขามจากการเข้าจับขึ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละสาย ทำให้สามารถจัดกลุ่มมะขามได้เบื้องต้นว่า มะขามพันธุ์ปลูกแต่ละพันธุ์ปลูกมีลำดับวิวัฒนาการร่วมกันอย่างไร ในภาพของ 1.5% agarose gel แสดงการจัดกลุ่มของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกดังตารางที่ 4

ตารางที่ 5 แสดงการจัดกลุ่มมะขามจากขนาดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใน 1.5 % agarose gel

กลุ่ม	พันธุ์ปลูก	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (bp)							
		400	380	370	350	340	330	320	300
1.	1. สีสทอง 2. เป็รียวยักษ์ 3. เป็รียวพื้นเมือง	✓	✓		✓	✓		✓	
2.	1. ชันดี 2. น้ำผึ้ง 3. อินทผลัม 4. นาศรีนวล	✓	✓		✓	✓			
3.	1. หมื่นจง 2. นิมนวล	✓	✓						
4.	1. ศรีชมภู		✓	✓			✓		✓

จากตาราง พบว่า มะขามถูกจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการโดยอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ให้เข้าจับกับดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งวิธีการนี้เป็นคุณสมบัติพิเศษข้อหนึ่งของบริเวณเบสซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการใช้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์กรรม จากผลการจัดกลุ่มพบว่า สามารถจัดกลุ่มมะขามได้ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 มะขามพันธุ์ปลูก สีสทอง เป็รียวยักษ์ เป็รียวพื้นเมือง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400, 380, 350, 340, 320 ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าว มะขามพันธุ์ปลูกสีทอง เป็นมะขามหวาน เปลือกหนา สีสน้ำตาลนวล เนื้อหนาสีน้ำตาลอมเหลือง เมล็ดใหญ่ รสชาติหวาน ขณะที่ มะขามพันธุ์ปลูกเป็รียวยักษ์ เป็นมะขามเป็รียวมีรูปร่างยาวหรือโค้งงอ เปลือกหนาไม่แตก มีสีน้ำตาลปนเขียวเมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาลอมเทา และมะขามพันธุ์ปลูกเป็รียวพื้นเมือง และเป็รียวพื้นเมืองจะมีลักษณะฝักเล็ก ค่อนข้างแบน เปลือกสีน้ำตาลอ่อน รสเป็รียว กลุ่มที่ 2 มะขามพันธุ์ปลูก ชันดี น้ำผึ้ง อินท

ผาลัม นาศรีนวล พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400, 380, 350, 340 ซึ่ง มะขามหวานพันธุ์ชั้นดีมีลักษณะฝักตรงหรืออาจโค้งเล็กน้อย ฝักจะสั้นกว่าพันธุ์ศรีชมภูแต่สามารถมองเห็นข้อปล้องชัดเจนกว่าน้ำหนักเบา เปลือกสีน้ำตาลเข้ม เนื้อหนานุ่มฉ่ำ รสชาติหวาน เมล็ดเล็ก มะขามพันธุ์นี้เป็นพันธุ์เบา ติดฝักในเดือน พฤษภาคม ฝักเล็กยาว โค้งงอมาก ฝักสุกจะมีเนื้อหนา รสชาติหอมหวานคล้ายน้ำผึ้งแต่ฝาด พันธุ์อินทผาลัม เป็นมะขามพันธุ์เบา ฝักตรงโค้งเล็กน้อย รสเปรี้ยวเล็กน้อย กลุ่มที่ 3 มะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง และ นิมนวล พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400, 380 โดยมะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง ลักษณะฝักโค้งเกือบครึ่งวงกลม มีความหวานจัด และกลุ่มที่ 4 มะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภู พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 380, 370, 330 และ 300 มะขามพันธุ์ศรีชมภู เป็นมะขามหวานพันธุ์เบา ฝักตรงกลมใหญ่แบนเหมือนท้องปลิงหรือฝักตรง ฝักสุกมีสีน้ำตาล เปลือกบางเนื้อหนาสีน้ำตาลอมเหลือง เมล็ดเล็กและล่อน รสชาติหวาน ค่าสัมประสิทธิ์ความต่างสามารถคำนวณจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ พบว่า กลุ่มที่ 1 มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 2 ที่ 80 % มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 3 ที่ 40% และมีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 4 ที่ 20 % กลุ่มที่ 2 มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 3 ที่ 50% และมีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 4 ที่ 25% ส่วนกลุ่มที่ 3 มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 4 ที่ 20% จะเห็นได้ว่าการจัดกลุ่มดังกล่าว สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามได้เบื้องต้น อย่างไรก็ตาม การจัดกลุ่มดังกล่าว ยังคงต้องมีการใช้องค์ประกอบอย่างอื่นร่วมด้วยในการพิจารณา เนื่องจาก ในพืชบางชนิดที่อยู่ต่างสปีชีส์กันอาจมีบางบริเวณที่พบว่าตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ที่คล้ายคลึงกันซึ่งต้องนำข้อมูลส่วนอื่นมาพิจารณาประกอบด้วย จากรายงานการศึกษาของ Demdoun et al., (2012) และ Poncet et al. (2006) พบว่า transferability ของไมโครแซทเทลไลท์ในพืช สกุลเดียวกันจะมีอัตราสูงกว่าพืชต่างสกุล อย่างไรก็ตาม พบว่า ไมโครแซทเทลไลท์ที่พบใน EST (EST microsatellite) จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืช ต่างชนิดและต่างสกุลได้ในอัตราที่สูงกว่า G-microsatellite โดยเฉพาะในไม้ยืนต้น (tree species) และ พืชตระกูลถั่ว ทั้งนี้เนื่องมาจาก EST-microsatellite พัฒนามาจากยีนที่มีการอนุรักษ์

4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการด้วยยีน *rbcl*

จากเหตุผลดังกล่าว จึงต้องมีการศึกษาการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ร่วมกับการจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแท่นยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับสปีชีส์และยังสามารถจำแนกได้ลึกกว่าระดับสปีชีส์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ศึกษา

ยีน *rbcl* หรือ Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase/oxygenase ซึ่งเป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) เอนไซม์ RubisCO ที่สมบูรณ์ หน่วยย่อยขนาดใหญ่และขนาดเล็กรวมตัวกัน) จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO₂ ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis & Soltis, 1998) ความยาวของยีน *rbcl* มีความแปรผันเล็กน้อยในพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้าง DNA barcode จะใช้เพียงบางส่วนของยีนที่มีความยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (Kress & Erickson, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010) จุดเด่นของยีน *rbcl* ที่ CBOL Plant Working Group พิจารณาว่าเหมาะสำหรับเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานคือ มีความเป็นมาตรฐานสากล และให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดีมาก

จากการศึกษาดังกล่าว จึงได้นำข้อมูลข้างต้นมาใช้ในการร่วมกันในจำแนกมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกเพื่อแสดงถึงลักษณะการมีความสัมพันธ์ร่วมกันทางวิวัฒนาการ ซึ่งในการศึกษารั้งนี้ได้มีการตัดมะขามบางพันธุ์ปลูกออก ได้แก่ นาศรีนวล และนิ่มนวล เนื่องจากข้อมูลจากตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอมีไม่เพียงพอ และปริมาณจีโนมมิกซ์ดีเอ็นเอที่จัดเก็บไว้ มีการเสื่อมสภาพ แต่ได้มีการเพิ่มจำนวนพันธุ์ปลูกของมะขามอีกจำนวนหนึ่งจนได้ตัวอย่างดีเอ็นเอมะขามเพื่อใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ได้ทั้งหมด 19 พันธุ์ปลูก ได้แก่ อินทพาลัม ศรีชมภูกลม ศรีชมภูปลิง สีทองเบา สีทองหนัก สีทองจุก ขันดีหยวก ขันดีสร้อย ศรีภักดี แสงอาทิตย์ ประกายเพชร ประกายทอง เปรี๊ยะพื้นเมือง พระโรจน์ น้ำผึ้ง เปรี๊ยะยักษ์ ฝักดาบ หมื่นจง และเพชรบัวทอง ดังรายชื่อและอักษรย่อแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 6 พันธุ์ปลูกมะขามที่ใช้ในการทดสอบความใกล้เคียงทางสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

ลำดับ	พันธุ์ปลูก (ชื่อไทย)	พันธุ์ปลูก (ชื่ออังกฤษ)	ตัวย่อ
1.	อินทพาลัม	Intapalum	ITPL
2.	ศรีชมภูกลม	Sri chom poo klom	SCPK
3.	ศรีชมภูปลิง	Sri chom poo pling	SCPP
4.	สีทองเบา	See tong bow	STB
5.	สีทองหนัก	See tong nag	STN

6.	สีทองจุก	See tong jook	STJ
7.	ขันตีหยวก	Khuntee youoag	KTY
8.	ขันตีสร้อย	Khuntee soy	KTS
9.	ศรีภักดี	Sri pag dee	SPD
10.	แสงอาทิตย์	Sang ar tid	SAT
11.	ประกายเพชร	Pra kai phet	PKP
12.	ประกายทอง	Pra kai tong	PKT
13.	เปรี้ยวพื้นเมือง	Preao puen muang	PPM
14.	พระโรจน์	Pra roj	PRR
15.	น้ำผึ้ง	Num pueng	NUP
16.	เปรี้ยวยักซ์	Preao yak	PRY
17.	ฝักดาบ	Fag dup	FAD
18.	หมื่นจง	Muen jung	MUJ
19.	เพชรบัวทอง	Phet boua tong cutivar	PBT

จากตัวอย่างดังกล่าว ได้ทำการสกัดและหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างมะขามแต่
ละพันธุ์ปลูก โดยแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l) ของใบมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ

ลำดับ	พันธุ์ปลูก	ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอ (A260) (ng/ μ l)		
		1	2	3
1.	อินทผลัม (ITPL)	483.30	483.3	333.31
2.	ศรีชมภูกลม (SCPK)	450.74	360.0	350.23
3.	ศรีชมภูปลิง (SCPP)	383.33	366.6	330.54
4.	สีทองเบา (SCB)	450.21	420.00	516.67
5.	สีทองหนัก (STN)	483.33	466.67	483.33
6.	สีทองจุก (STJ)	366.67	383.33	383.33
7.	ขันตีหยวก (KTY)	433.33	433.33	423.33
8.	ขันตีสร้อย (KTS)	383.33	316.66	383.33

9.	ศรีภักดี (SPD)	386.66	350.00	333.33
10.	แสงอาทิตย์ (SAT)	405.00	403.33	466.67
11.	ประกายเพชร (PKP)	476.67	376.67	216.67
12.	ประกายทอง (PKT)	445.00	338.33	166.67
13.	เปรี้ยวพื้นเมือง (PPM)	451.63	488.3	406.6
14.	พระโรจน์ (PRR)	300.23	308.3	328.3
15.	น้ำผึ้ง (NUP)	376.35	370.23	365.56
16.	เปรี้ยวยักษ์ (PRY)	473.35	470.25	456.62
17.	ฝักดาบ (FAD)	325.25	361.61	368.35
18.	หมื่นจง (MUJ)	438.36	468.37	451.62
19.	เพชรบัวทอง (PBT)	443.31	343.33	421.65

หลังจากการสกัดดีเอ็นเอ หาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm และหาความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นจีโนมิกดีเอ็นเอและค่า A_{260}/A_{280} ของใบมะขาม

ลำดับ	พันธุ์ปลูก	สัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm (A_{260}/A_{280})			ค่าเฉลี่ย
		1	2	3	
1.	อินทผลัม (ITPL)	1.6	2.0	1.8	1.8
2.	ศรีชมภูกลม (SCPK)	2.0	2.3	1.7	2.0
3.	ศรีชมภูปลิง (SCPP)	2.3	2.1	1.7	2.0
4.	สีทองเบา (SCB)	2.1	1.8	2.0	1.9
5.	สีทองหนัก (STN)	1.8	1.8	2.3	1.9
6.	สีทองจุก (STJ)	1.7	1.6	2.3	1.8
7.	ขันตีหยวก (KTY)	1.6	2.2	1.8	1.8
8.	ขันตีสร้อย (KTS)	2.3	2.1	1.9	2.1
9.	ศรีภักดี (SPD)	1.5	2.0	1.6	1.7

10.	แสงอาทิตย์ (SAT)	1.7	1.5	2.2	1.8
11.	ประกายเพชร (PKP)	1.7	2.3	2.0	2.0
12.	ประกายทอง (PKT)	1.5	1.9	2.1	1.8
13.	เปรี้ยวพื้นเมือง (PPM)	1.6	1.9	1.9	1.8
14.	พระโรจน์ (PRR)	2.0	1.7	1.9	1.8
15.	น้ำผึ้ง (NUP)	2.1	1.8	1.8	1.9
16.	เปรี้ยวยักษ์ (PRY)	1.9	1.6	2.0	1.8
17.	ฝักดาบ (FAD)	2.1	1.8	2.2	2.0
18.	หมื่นจง (MUJ)	1.7	2.0	1.9	1.8
19.	เพชรบัวทอง (PBT)	1.8	2.1	2.0	1.9

5. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *rbcl*

เมื่อได้ปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอตามต้องการแล้ว นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบโดยโปรแกรม Primer 3 ซึ่งฐานข้อมูลของยีน *rbcl* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ได้จากฐานข้อมูล NCBI ใน Nucleotide Sequence mode โดยอ้างอิงใน Tamarindus indica chloroplast *rbcl* gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, specimen_voucher: PCU:TI-PY/P3 ; Accession Number : AB378730.1 ขนาด 1,398 base pair ซึ่งสามารถให้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน *rbcl* ได้ทั้งหมดจำนวน 5 คู่ โดยมีเปอร์เซ็นต์ CG อยู่ระหว่าง 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 8 ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl*

ลำดับ	ไพรเมอร์ 5'-3'	Start	Tm (°C)	%CG
1.	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3'	1,100	60.07	50.0
	R 5' GCAAGATCACGTCCCTCATT 3'	1,283	60.08	50.0
2.	F 5' GTTGCTTCGGGAGGTATTCA 3'	1,099	60.07	50.0
	R 5' GCAAGATCACGTCCCTCATT 3,	1,283	60.08	50.0
3.	F 5' CTCTCTACCGGTGTTCTGC 3,	1,077	59.87	60.0
	R 5' GCAAGATCACGTCCCTCATT 3,	1,283	60.08	55.0

4.	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	1,100 1,293	60.07 60.27	50.0 55.0
5.	F 5' GTTGCTTCGGGAGGTATTCA 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	1,099 1,293	60.07 60.27	50.0 55.0

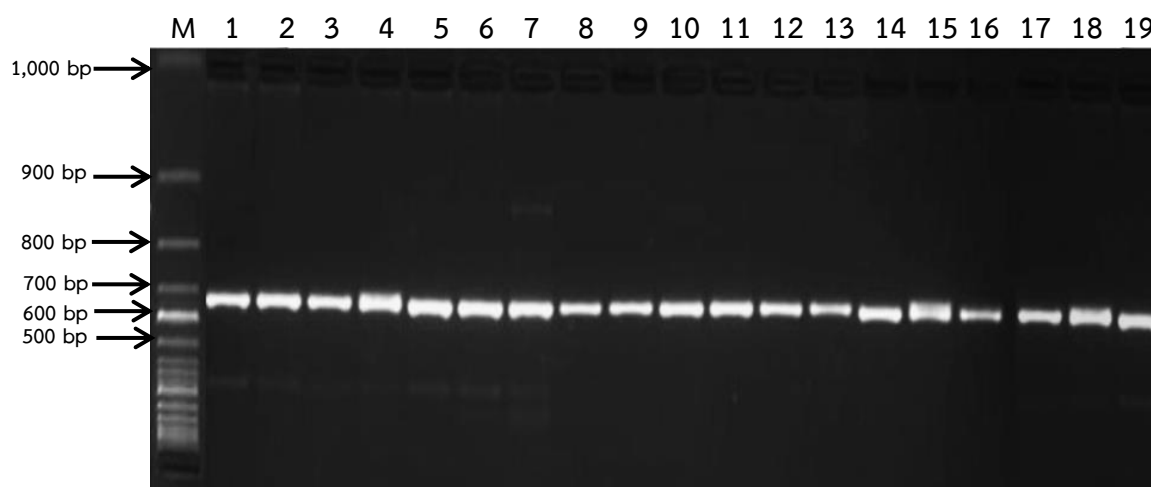
จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* ในมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ได้โดยไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุด 1 คู่จากทั้งหมด 5 คู่ และเมื่อนำมาตรวจสอบใน 1.5 % agarose gel สามารถให้ผลดังตารางที่ 9 และดังแสดงในภาพที่ 8 ตารางที่ 10 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* ในมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก

ลำดับ	พันธุ์ปลูก	ไพรเมอร์	ขนาด PCR product (bp)
1.	อินทผลัม (ITPL)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3' R 5' GCAAGATCACGTCCCTCATT 3'	643
2.	ศรีชมภูกลม (SCPK)	F 5' GTTGCTTCGGGAGGTATTCA 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	641
3.	ศรีชมภูปลิง (SCPP)	F 5' CTCTCTACCGGGTGTCTGC 3, R 5' GCAAGATCACGTCCCTCATT 3,	671
4.	สีทองเบา (SCB)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	611
5.	สีทองหนัก (STN)	F 5' GTTGCTTCGGGAGGTATTCA 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	621
6.	สีทองจุก (STJ)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	649
7.	ขันตีหยวก (KTY)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	643
8.	ขันตีสร้อย (KTS)	F 5' GTTGCTTCGGGAGGTATTCA 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	649
9.	ศรีภักดี (SPD)	F 5' CTCTCTACCGGGTGTCTGC 3, R 5' GCAAGATCACGTCCCTCATT 3,	679

10.	แสงอาทิตย์ (SAT)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	671
11.	ประกายเพชร (PKP)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	646
12.	ประกายทอง (PKT)	F 5' GTTGCTTCGGGAGGTATTCA 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	671
13.	เปรี้ยวพื้นเมือง (PPM)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	642
14.	พระโรจน์ (PRR)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	645
15.	น้ำผึ้ง (NUP)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	713
16.	เปรี้ยวยักษ์ (PRY)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	654
17.	ฝักดาบ (FAD)	F 5' GTTGCTTCGGGAGGTATTCA 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	644
18.	หมื่นจง (MUJ)	F 5' CTCTCTACCGGGTGTCTGC 3, R 5' GCAAGATCACGTCCCTCATT 3,	645
19.	เพชรบัวทอง (PBT)	F 5' TTGCTTCGGGAGGTATTCAC 3, R 5' ACCCTCACGAGCAAGATCAC 3,	657

6. การตรวจสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

หลังจากนำดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เรียบร้อยแล้ว นำมาตรวจสอบคุณภาพของชิ้นดีเอ็นเอและการเกิดแถบของชิ้นดีเอ็นเอ พบว่า ขนาดของดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ระหว่าง 600 – 700 base pair



ภาพที่ 8 แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณยีน *rbcl* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บน 1.5 % agarose gel โดย

Lane M	อินทผลัม (ITPL)	Lane 10	แสงอาทิตย์ (SAT)
Lane 1	ศรีชมภูกลม (SCPK)	Lane 11	ประกายเพชร (PKP)
Lane 2	ศรีชมภูปลิง (SCPP)	Lane 12	ประกายทอง (PKT)
Lane 3	สีทองเบา (SCB)	Lane 13	เปรี้ยวพื้นเมือง (PPM)
Lane 4	สีทองหนัก (STN)	Lane 14	พระโรจน์ (PRR)
Lane 5	สีทองจุก (STJ)	Lane 15	น้ำผึ้ง (NUP)
Lane 6	ขันตีหยวก (KTY)	Lane 16	เปรี้ยวยักษ์ (PRY)
Lane 7	ขันตีสร้อย (KTS)	Lane 17	ฝักดาบ (FAD)
Lane 8	ศรีภักดี (SPD)	Lane 18	หมื่นจง (MUJ)
Lane 9	อินทผลัม (ITPL)	Lane 19	เพชรบัวทอง (PBT)

7. ลำดับนิวคลีโอไทด์บนตำแหน่งยีน *rbcl* ของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก

หลังจากที่ได้ดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งยีน *rbcl* จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้จากมะขามทั้ง 19 พันธุ์ปลูกแล้ว นำดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการส่งตรวจ ซึ่งหลังจากการส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ได้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งยีน *rbcl* จากมะขามทั้งหมด 19 พันธุ์ปลูก เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกโดยอาศัยความแตกต่างจากลำดับยีน *rbcl* ของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกด้วยโปรแกรม Bioedit โดยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1 เพื่อสร้างเป็นแผนภาพ Phylogenetic tree โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* จากมะขามทั้ง 19 พันธุ์ปลูกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในภาพที่ 9 - 29

LOCUS *Gymnocladus dioica* 1,467 bp (base pair)

rbcl nucleotide sequence :

```

1   GATGGGCGTC TATCTGCATG ACTACTTAAC AGGGGGTGCA ATACTACTTC TCATTATGCC
61  GGGATAATGG TCTTTCTTCT ATCCTCGTGA AGCATGCAGT TATCGTAGAC AAATGGTATG
121 CACTTTCTGT ACTAGCTAAG CGTTACGTAT GTCTGTGGAG ATCATATCGC TGGTACCGTA
181 GTAGGTAAAC TTGAAGGGGA AAGAGAGATC ACTTAGGCTT TGTTGATTTA CTACGTGATG
241 AGTTTATTGA AAAAGATCGA AGCCGCGGTA TTTATTTTCAT CAGGATTGGG TCCTCTACCG
301 TGTTCCTGCCC GTTGCTTCGG GGGGTATTCA CGTTGGCATA GCCTGCTCTG ACCGAGATCT
361 TTGGGATGAT TCCGTACTAC AATTCGGTGG AGGAACTTTA GGGCACCCCTT GGGGAAATGC
421 ACCCGGTGCC GTAGCTAATG AGTCTAGAAG CATGTGTCAA CTCGTAATGA GGGACATCTT
481 CGTGAATGAA ATTATTCGTG AGCTAGAAAT GGATGCTGAC T

```

ภาพที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของ *Gymnocladus dioica* ขนาด 1,467 bp ซึ่งใช้เป็นลำดับเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของมะขามทั้ง 19 พันธุ์ปลูก

LOCUS *Tamarindus indica* 1,398 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1 AGATGGGAGT CTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61 CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACATCT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA C

```

ภาพที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของ *Tamarindus indica* ขนาด 1,398 bp ซึ่งใช้เป็นลำดับเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของมะขามทั้ง 19 พันธุ์ปลูก

อินทผาลัม 643 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1 GAATGGGAGT TTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61 CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA T

```

ภาพที่ 11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกอินทผาลัม ขนาด 643 bp

ศรีชมภูกลม 641 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  GGGCGGGGGG TTAGCTGCTG CATTAGCTGC TAGCGAGCTC AATAGCTGTT CTGCGCGACT
61  CGAATTGCTG CATTGCTGC AGTCCTCGAA GCGCTCATTA CTGCTGGAGT CGGGCTGCAT
121 TAGCTGCTCG TCCTCAATTA CTGCTGCATT AGCCTGAGGA GTCCGAATTG CTGTTAGTGC
181 TGCAAGTCCA GTAAAGGTGC AAGGATAAAT CACTTAAGTT TTGAAGATTT ACTACCTGTT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCC TCAAGATTGG GTACTCTACC
301 GTGATCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCGACTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAACTAGAAA TGGATCCTGA C

```

ภาพที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภูกลม ขนาด 641 bp

ศรีชมภูปลิง 671 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGAGT TTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGGG CCGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA T

```

ภาพที่ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภูปลิง ขนาด 671 bp

สีทองเบา 611 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGTTGGGAGT TTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTG CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGGTGG GATCATTCCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA A

```

ภาพที่ 14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกสีทองเบา ขนาด 611 bp

สีทองหนัก 621 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  GGGGAAGATGG TTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG ATGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA T

```

ภาพที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกสีทองหนัก ขนาด 621 bp

สีทองจุก 649 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  ATACGCTGAT ATAGCTGCTC GAGAACTTAA CTGCGGGTGC AATACTATTA CTCAGTATGT
61 CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACATCT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA C

```

ภาพที่ 16 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกสีทองจุก ขนาด 649 bp

ขันตี่หยวก 643 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGAGGT CTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61 CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACATCT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA C

```

ภาพที่ 17 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกขันตี่หยวก ขนาด 643 bp

ชั้นดีสร้อย 649 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGAGT TTATCTGGAT GTCAACTCCA CCGGGGGGGC CATACTAGTG CTCACTATGT
61  AGGGATGGTG GTCTTTCTTC CCCTTGGGTG CCTGATGCCT CCATGATTGA CAATTGGCTT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA GCTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCGAA A

```

ภาพที่ 18 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกชั้นดีสร้อย ขนาด 649 bp

ศรีภักดี 678 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  GAATGGGAGT TTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATAGTAGTA CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGGG CCGCATGCCT CTATCGAATA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTTCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA A

```

ภาพที่ 19 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกศรีภักดี ขนาด 678 bp

แสงอาทิตย์ 671 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGGT TCCTCTGCAT GTCTACTTCC TCGGGGGGGC CATACTTGTT GTCATCTTGT
61  AGGGTTAGTG GTCGGTCTTT CCTCCGGGTG CCTGATGCCT CCACAATTGA CGAATGGTCT
121 CCAAAGATTG TCAGAGGCAT GCCAAACGTG AATCTCCGAA AACGGAATCC CTGGTAGAGT
181 AGTACCCAAT CTTGAAGGTG AAATAAATAC CGCTTCGATC TTTTCAATA AAATCATCAC
241 GTAGTAAATC AACAAAACCT AAACCGTGAT TTCTCTTCC TCCAGTTTAC CTACAGTACC
301 GTGATATGAT CGTTCCACCG GGAGACAATC ACGTACGCTT TGCTAGTACT GACGAAAATC
361 ATACCGATTG TTCTGTACTA CGATAACGTG CATGCATTCA GGGACACGAT GGTGAAGAAG
421 TAGCCAATCC CGACAATAAT GAGCCAAGCA GTATTTGCGG ATCCCCTGTT AAGTAGTCAT
481 TTACGATAGG AACTCCCAAT TCTCTCGAAA TACTCTTTT A

```

ภาพที่ 20 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกแสงอาทิตย์ ขนาด 671 bp

ประกายเพชร 646 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGAGT CTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACATCT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA C

```

ภาพที่ 21 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกประกายเพชร ขนาด 646 bp

ประกายทอง 671 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  GGATGCGTGC TTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGCT CTCATTATGT
61  CGGGTCAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG ATGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCC TCAAGATTGG GTACTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CCATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGAAGATG
421 CACCCGGCGC CATACCTAAT TAGTCTAGCA GCATGTGTCG ACTCCCCCG CGGGACACTT
481 TCGTGAACGA CCCTATCCCT CAGTTAAAAA TGGCTCCTGA T

```

ภาพที่ 22 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกประกายทอง ขนาด 671 bp

เปรี้ยวพื้นเมือง 672 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  GGGTGGAGGC TTATCGGCAG GTCTACTCCC AGGTGGGACC CATACTAGTT CTCATCGTGT
61  CGGGATGGTG CCGTTACTTC TCCCCCGGG CCTGATGCCT CCACCATAGT CGAATGGTCT
121 GCATTGATCG TACTAGGCAT GCGTTACGTT TGTCTGTGGA CATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTACTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAACTAGAAA TGGATCCTGA C

```

ภาพที่ 23 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกเปรี้ยวพื้นเมือง ขนาด 672 bp

พระโรจน์ 645 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGAGT CTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACATCT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA C

```

ภาพที่ 24 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกพระโรจน์ ขนาด 645 bp

น้ำผึ้ง 713 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  GAATGGGAGT TTACCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGTGC AATACTAGTG CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGGTGG GATCATGTCTG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGTCCGCTCT GACAAAGATC
361 TTTAGCATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA A

```

ภาพที่ 25 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกน้ำผึ้ง ขนาด 713 bp

เปรี้ยวยักษ์ 654 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGAGT TTCTCGGCAT GACACCTTCC TCGGGGGGGC CATACTATTG CTCACTCTGT
61  AGGGACTGTG GCCTTTCTTC CCCCCGGGTG CCAAATTCCT CCATAATTGA CAAATGGCTT
121 GCATATTCTG TACTAGCTGA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA GCTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA A

```

ภาพที่ 26 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกเปรี้ยวยักษ์ ขนาด 654 bp

ฝักดาบ 644 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGAGT TTATCTGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAAATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTAA T

```

ภาพที่ 27 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลุกฝักดาบ ขนาด 644 bp

หมื่นจง 645 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

1  AGATGGGAGT TTATCAGCAT GACTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTCTTTCTTC CATCCTCGTG AAGCATGCAG TTATCGTAGA CAGATGGTAT
121 GCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 TCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTAA A

```

ภาพที่ 28 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง ขนาด 645 bp

เพชรบัวทอง 657 bp

rbcl nucleotide sequence :

```

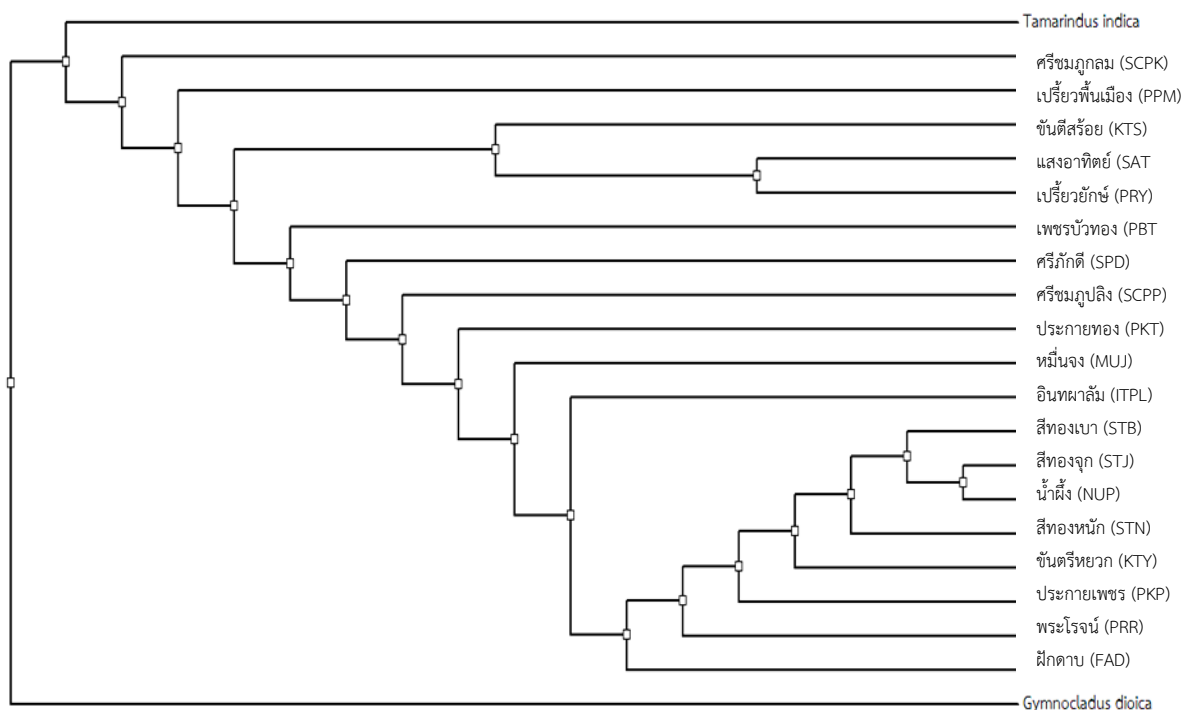
1  GATTGGGAGT TTATCTCCAT GGCTACTTAA CAGGGGGCGC AATACTAGTT CTCATTATGT
61  CGGGATAATG GTGTTTCTTC CATCCTGGGG CCGAATGCCT CCATCGTAGA CAGATGGTCT
121 CCATTTTCTG TACTAGCTAA GCGTTACGTT TGTCTGTGGA GATCATATCG CTGGTACTGT
181 AGTAGGTAAA CTGGAAGGGG AAAGAGAAAT CACTTAGGTT TTGTTGATTT ACTACGTGAT
241 GATTTTATTG AAAAAGATCG AAGCCGCGGT ATTTATTTCA TCAAGATTGG GTCCTCTACC
301 GTGTTCTGCC CGTTGCTTCG GGAGGTATTC ACGTTGGCAT AGCCCGCTCT GACCGAGATC
361 TTTGGGATGA TTCCGTACTA CAATTTGGTG GAGGAACTTT GGGACACCCT TGGGGAAATG
421 CACCCGGTGC CGTAGCTAAT GAGTCTAGAA GCATGTGTCA ACTCGTAATG AGGGACTCTT
481 GCGTGAATGA AATTATCCGT GAGCTAGAAA TGGATCCTGA A

```

ภาพที่ 29 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูกเพชรบัวทอง ขนาด 657 bp

8. การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree

จากตาราง 4 พบว่ามะขามทั้งหมดจำนวน 19 พันธุ์ปลูก มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกันโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 ในการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *rbcl* ระหว่างพันธุ์ปลูกมะขามข้างต้น ใช้โปรแกรม CLUSTAL X (1.83) ในการทำ multiple alignment และใช้โปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1 ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 30 ซึ่งเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ที่มีความใกล้ชิดกันของมะขามในไอโซเลตต่างๆ จะเห็นได้ว่า มะขามพันธุ์ปลูกสีทองจุก (STJ) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะขามพันธุ์ปลูกน้ำผึ้ง (NUP) และยังมีมะขามพันธุ์ปลูกสีทองเบา (STB), สีทองหนัก (STN), ชันตรีหยวก (KTY), ปรายเพชร (PKP), พระโรจน์ (PRR) และมะขามพันธุ์ปลูกฝักดาบ (FAD) นอกจากนี้ ยังมีความสัมพันธ์กับมะขามพันธุ์ปลูกอินทผลาลัม (ITPL), หมื่นจง (MUJ), ปรายทอง (PKT), ศรีชมภูปลิง (SCPP), ศรีภักดี (SPD) และเพชรบัวทอง (PBT) ที่ยังจัดว่ามีความสัมพันธ์กันอยู่ในกลุ่มนี้ ส่วนในการจัดกลุ่มของมะขามอีกกลุ่มหนึ่งสามารถจัดได้ดังนี้คือ มะขามพันธุ์ปลูกแสงอาทิตย์ (SAT) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะขามพันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์ (PRY) นอกจากนี้ ยังมีความสัมพันธ์กับมะขามพันธุ์ปลูกขันตีสร้อย (KTS), เปรี้ยวพื้นเมือง (PPM) และมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภูกลม (SCPK) ตามลำดับ



ภาพที่ 30 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของมะขามที่ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามจำนวน 10 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ มะขามพันธุ์ปลูกสีทอง, เปรี๊ยะยักษ์, และเปรี๊ยะพื้นเมืองถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ขณะที่มะขามพันธุ์ปลูกขันตี, น้ำผึ้ง, อินทผลัม และนาครินวล ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง และนิ่มนวลถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ขณะที่มะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง ถูกแยกออกจากพันธุ์ปลูกอื่นๆอย่างชัดเจน และเมื่อมีการนำมะขามาจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามจำนวน 19 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* ซึ่งเป็นยีนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความจำเพาะในระดับพันธุ์ปลูก พบว่า มะขามพันธุ์ปลูกสีทองจุก, น้ำผึ้ง, สีทองเบา, สีทองหนัก, ขันตีหยวก, ปรกกายเพชร, พระโรจน์, อินทผลัม, หมื่นจง, ปรกกายทอง, ศรีชมภูปลิง, ศรีภักดี และเพชรบัวทองจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากในลำดับแรกๆ และเริ่มมีความใกล้ชิดกันน้อยลงตามลำดับ ส่วนการจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอีกกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ มะขามพันธุ์ปลูกแสงอาทิตย์, เปรี๊ยะยักษ์, ขันตีสร้อย, เปรี๊ยะพื้นเมือง, และมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมภูกลม ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่าง 2 วิธีการ สามารถจัดกลุ่มมะขามในแต่ละพันธุ์ปลูกได้โดยเทียบจากตารางที่ 11 ซึ่งแสดงถึงการจัดกลุ่มร่วมกันระหว่างเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการใช้ความจำเพาะของลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงการจัดกลุ่มพันธุ์มะขามระหว่างการจัดกลุ่มด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์และการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl*

ลำดับ	เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์	กลุ่มที่	การวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน <i>rbcl</i>	กลุ่มที่
1.	สีทอง (SE)	I	อินทผลัม	II
2.	สีชมพู (SC)	IV	ศรีชมภูกลม	III
3.	ขันตี (KT)	II	ศรีชมภูปลิง	II
4.	เปรี๊ยะยักษ์ (PY)	I	สีทองเบา	I
5.	เปรี๊ยะพื้นเมือง (PM)	I	สีทองหนัก	I
6.	หมื่นจง (MJ)	III	สีทองจุก	I
7.	น้ำผึ้ง (NP)	II	ขันตีหยวก	I
8.	อินทผลัม (IN)	II	ขันตีสร้อย	III
9.	นิ่มนวล (NN)	III	ศรีภักดี	II
10.	นาครินวล (NS)	II	แสงอาทิตย์	III

11.	-		ประกายเพชร	I
12.	-		ประกายทอง	II
13.	-		เปรี้ยวพื้นเมือง	III
14.	-		พระโรจน์	I
15.	-		น้ำผึ้ง	I
16.	-		เปรี้ยวยักษ์	III
17.	-		ฝักดาบ	I
18.	-		หมื่นจง	II
19.	-		เพชรบัวทอง	II

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก มะขามถูกจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการโดยการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มมะขามได้ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 มะขามพันธุ์ปลูก สีทอง เปรี๊ยะยักษ์ เปรี๊ยะพื้นเมือง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400, 380, 350, 340, 320 base pair กลุ่มที่ 2 มะขามพันธุ์ปลูก ชันดี น้ำผึ้ง อินทผาลัม นาครีนวล พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400, 380, 350, 340 base pair กลุ่มที่ 3 มะขามพันธุ์ปลูกหมื่นจง และ นิ่มนวล พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400, 380 และกลุ่มที่ 4 มะขามพันธุ์ปลูกศรีชมพู พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 380, 370, 330 และ 300 base pair จากการค่าสัมประสิทธิ์ความต่างสามารถคำนวณจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ พบว่า กลุ่มที่ 1 มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 2 ที่ 80 % มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 3 ที่ 40% และมีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 4 ที่ 20 % กลุ่มที่ 2 มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 3 ที่ 50% และมีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 4 ที่ 25% ส่วนกลุ่มที่ 3 มีความใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 4 ที่ 20% จะเห็นได้ว่าการจัดกลุ่มดังกล่าว สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามได้เบื้องต้น ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมามีการทดลองที่มีประสิทธิภาพจะขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ ไพรเมอร์เหล่านี้จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน ซึ่งจะใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Ince et al., 2010; Karaca et al., 2005; สุรินทร์, 2549) อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญของการพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์นั้น ต้องใช้ระยะเวลานาน มีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายในการพัฒนาค่อนข้างสูงมาก โดยต้องอาศัยการโคลนไมโครแซทเทลไลต์ และการหาลำดับเบส เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่خابข้างกับไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งจะเป็นอุปสรรคสำหรับพืชที่ไม่มีข้อมูลลำดับเบสใน GENBANK มาก่อน นอกจากนี้แล้ว ปัญหาทางด้านเทคนิคที่พบอยู่บ่อยๆ คือ การวิเคราะห์ผลค่อนข้างยาก หากได้แถบดีเอ็นเอที่เป็นหลายแถบ (stutter bands) อาจทำให้การอ่านแถบดีเอ็นเออาจผิดพลาดได้ (He et al., 2003; สุริพร, 2546) และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน *rbcl* จากมะขามทั้งหมดจำนวน 19 พันธุ์ปลูก โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method ทำให้ได้ผลคือ มะขามพันธุ์ปลูกสีทองจุก มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะขามพันธุ์ปลูกน้ำผึ้ง และสีทองเบา, สีทองหนัก, ชันตรีหยวก, ประกายเพชร, พระโรจน์ และฝักดาบ นอกจากนี้ ยังมีความสัมพันธ์กับมะขามพันธุ์ปลูกอินทผาลัม, หมื่นจง, ประกายทอง, ศรีชมพูปลิง, ศรีภักดี และเพชรบัวทอง ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งคือ มะขามพันธุ์แสงอาทิตย์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะขามพันธุ์ปลูกเปรี๊ยะยักษ์ ยังมีความสัมพันธ์กับมะขามพันธุ์ปลูกชันดีสร้อย, เปรี๊ยะพื้นเมือง และมะขามพันธุ์ปลูกศรีชมพูกลม ตามลำดับ

จากผลการทดลอง พบว่า ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามจำนวน 10 พันธุ์ปลูก ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ และเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* ร่วมกัน พบว่า มีมะขามพันธุ์ปลูกบางส่วนที่มีลักษณะความสัมพันธ์ที่คล้ายกันในการวิเคราะห์ทั้งสองแบบ เช่นในพันธุ์ปลูกชั้นตรี น้ำผึ้ง และ อินทผลัมถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พันธุ์ปลูกเปรี้ยวยักษ์และเปรี้ยวพื้นเมืองถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่มีบางส่วนที่ให้ข้อมูลไม่สัมพันธ์กันเช่น เทคนิคไมโครแซทเทลไลต์จัดพันธุ์ปลูกสีทอง น้ำผึ้งและหมื่นจง อยู่คนละกลุ่ม ในขณะที่การใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับยีนด้วยการใช้ยีน *rbcl* จัดกลุ่มมะขามพันธุ์ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งจากสิ่งที่เกิดขึ้นดังกล่าว อาจเกิดข้อจำกัดขึ้นบางประการเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเครื่องมือทางโมเลกุลที่ใช้ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความแปรปรวนน้อยในวิธีหนึ่ง แต่กลับมีการเพิ่มปริมาณได้ในบริเวณที่มีความแปรปรวนมากในอีกวิธีหนึ่ง จึงทำให้ผลการทดลองอาจไม่สามารถตอบโจทย์ที่ต้องการทราบได้อย่างชัดเจนนัก ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอ 7 บริเวณในพลาสมิดเพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โคด ได้แก่ *atpF-atpH* spacer, ยีน *matK*, ยีน *rbcl*, ยีน *rpoB*, ยีน *rpoC1*, *psbK-psbI* spacer และ *trnH-psbA* spacer เกณฑ์ที่ใช้ประกอบการพิจารณาความเหมาะสมคือ การได้มาซึ่งลำดับดีเอ็นเอ คุณภาพของข้อมูล และความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ จากการศึกษาครั้งนี้ PWG สรุปว่าบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นดีเอ็นเอบาร์โคดในพืชคือ *rbcl* และ *matK* โดยต้องใช้ข้อมูลจากทั้งสองยีนร่วมกันในการระบุชนิดพืช (2-locus barcode) (CBOL Plant Working Group, 2009) อย่างไรก็ตามแม้คณะกรรมการระดับสูงของ CBOL สรุปยืนยันว่า *rbcl* และ *matK* ได้รับความเห็นชอบในการถูกกำหนดให้เป็นดีเอ็นเอบาร์โคดในพืชบก แต่คณะกรรมการยังคงเห็นควรว่าการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณอื่นสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โคดจะยังเป็นประโยชน์ในการเป็นข้อมูลสำรองสำหรับความต้องการในบางกรณีที่ข้อมูลจาก *rbcl* และ ไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกสปีชีส์ พืชบางกลุ่ม (CBOL, 2009)

สำหรับในกลุ่มพืช ยังไม่สามารถระบุบริเวณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode ได้แน่นอน ตัวอย่างการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับดีเอ็นเอที่ควรใช้เป็น DNA barcode ได้แก่ ในปี ค.ศ 1999 Hilu และ Alice ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Poaceae โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *matK* พบว่ายีนนี้ถอดรหัสให้กรดอะมิโนจำนวนไม่เท่ากันใน และพบการเพิ่มหรือการขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาบริเวณอื่น เช่น ยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS โดย Chase และคณะ (2005) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ถึงแม้ว่าข้อมูลลำดับเบสของยีน *rbcl* และ บริเวณ ITS จะเป็นข้อมูลที่ดี และมีเก็บอยู่เป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล Genbank แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็น DNA barcode ได้ เนื่องจากไม่สามารถใช้ได้ในพื้นที่บางกลุ่ม และพบว่ายีน *matK* มีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่น เช่น สูงกว่ายีน *rbcl* 2-3 เท่า ทำให้มีตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์มากกว่า จึงทำให้เหมาะสมในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับสกุลและชนิด และน่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็น DNA barcode เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากการประชุมโดยนักวิทยาศาสตร์ ในเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 จัดที่ New York Botanical Garden ซึ่ง

ได้ข้อสรุปว่า ดีเอ็นเอในพลาสมิดบริเวณ *matK* น่าจะเป็นบริเวณหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น DNA barcode สำหรับการระบุพืช แต่ยังคงต้องทำการทดสอบเพื่อประเมินศักยภาพสำหรับการใช้งานจริงต่อไป ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *matK* ในแง่ของการนำมาใช้เป็น DNA barcode ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวนี้ จึงต้องมีการทบทวนและวางแผนเพื่อค้นหาวิธีการในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมให้มีความเหมาะสมและสามารถจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของมะขามให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

กรมทรัพย์สินทางปัญญา. (2548). ประกาศโฆษณาการรับขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์.

สืบค้นเมื่อ 26 มกราคม 2558, จาก <http://www.ipthailand.org/upload/Geography>
ขวัญใจ พัฒนาเจริญวงศ์ วิชาวิ ชั้นโรจน์ สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง และกิตติพัฒน์
อุโฆษกิจ. 2552. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันจากเหมือง
ข้อมูล ESTs. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16 คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี.

ณัฐจิรวรรณ ปุณวันและคณะ.(2531). “ชนิดและสารพิษของเชื้อราในมะขามหวาน” วารสาร
วิทยาศาสตร์การแพทย์. 30 (1) ,3-8.

ธีรวรรณ ชันทอง.(ม.ป.พ.) Restriction Fragment Length Polymorphism สืบค้นเมื่อ 24
กุมภาพันธ์ 2553 จาก [http://www.student.chula.ac.th/-49371019/restriction_](http://www.student.chula.ac.th/-49371019/restriction_fragment_length_)
[fragment_length_](http://www.student.chula.ac.th/-49371019/restriction_fragment_length_)

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, ฐิตียา กองเกิน และณอม บุตตโคตร. (2544). การเติบโตและการเจริญของ
เนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานพันธุ์ประกายทอง ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.

เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์ จังหวัด
เพชรบูรณ์.

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, 2544. การเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อต้นอ่อนมะขามหวานใน
หลอดแก้ว. เพชรบูรณ์: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และจินตนา สนามชัยสกุล. 2552. ศึกษาช่วงเวลาของการติดเชื้อราและผลการ
ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา สมุนไพรหมัก สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้ง
เชื้อราจากมะขามหวาน(พันธุ์ประกายทอง)ในห้องปฏิบัติการ.เพชรบูรณ์: คณะ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

ปฎิภาณี ชันธโภค. 2550. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประเมินทางเคมีของมะขามบางสายพันธุ์ที่มี
ฤทธิ์เป็นยาระบายที่ดี. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิจิตร โชคพัฒนา. 2546.คู่มือการปลูกมะขามหวาน.พิมพ์ครั้งที่2.นนทบุรี: สำนักพิมพ์เกษตรสาส์น.

ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ. 2550. การศึกษาความหลากหลายของพืชโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย
เทคนิคชีวเคมีขั้นสูง: การวิจัยทางเภสัชศาสตร์และการพัฒนายาใหม่, หน้า 47-65.

กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พรินท์.

- วิเชษฐ์ สีสามานิตย์. 2550. ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics): ความรู้พื้นฐานที่ควรรู้. เทคนิคชีวเคมีขั้นสูง: การวิจัยทางเภสัชศาสตร์และการพัฒนายาใหม่, หน้า 1-20. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พรินท์.
- วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิติลกรัตน์, และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2547. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2546. สถานภาพงานบริการด้านเทคโนโลยีชีวภาพ. ปทุมธานี: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2547. เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วยตนเอง. กรุงเทพมหานคร: งานนิเทศสัมพันธ์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สุชาดา สุขห่อง. 2548. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรร. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 19: 75-85.
- สุนิดา อัญจิระเวโรจน์ อัจฉริยา รังษิรุจิ และธวัช ดอนสกุล.(2551). คาร์โบไฮเดรตและชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน(พืชสกุลมะขาม)ในจังหวัดเพชรบูรณ์. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 24(1):183-198.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5 (2): 37-58
- สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็มสมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ประชาชน
- อภิชาติ วรรณวิจิตร.(2550). “วิธีการ RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)” สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฉบับที่ 28 สืบค้นเมื่อ 19 กุมภาพันธ์ 2553 จาก http://guru.sanook.com/search/Knowledge_search.php?q=%C7%D4%B8%D...
- Anon. 1976. *Tamarindus indica* L. In the wealth of India (Raw materials series) Vol.X, pp. 122-144. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research.
- 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.

- Atienzar, F. A., and Jaha, A. N. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research*. 613: 76-102.
- Baldwin, B. G., Anderson, J. M., Wojciechowski, M. F., Canopbell, C. S., and Donoghue, M. J. the ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Bell, C. D. 2004. Preliminary phylogeny of Valerianaceae (Dipsacales) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 340-350.
- BhattacharMMA, P. K., Bal, S., and Mukherji, R. K. 1994. Studies on the characteristics of some products from tamarind (*Tamarindus indica* L.) kernels. *Journal of Food Science and Technology (India)* 31: 372-376.
- Brown, S.M., Szewc-McFadden, A. K., and Kresovich, S. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. *In*. *Methods of plant genome analysis : Their merits and pitfalls*. Jauhar, P.P. (ed.). CRS Press, Boca raton, FL. U.S.A. Pp. 147-159.
- CBOL. 2009. CBOL approves *matK* and *rbcL* as the barcode regions for land plants: Statements by the executive committee. <http://www.barcoding.si.edu>
- CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 106: 12794-12797.
- Chapman, K. R. 1984. Tamarind. *In* tropical tree fruits for Australia. Compiled by Page, P. E., information series Q 183018, pp. 83-86. Brisbane: Queensland Department of Primary Industries.
- Chase, W. M., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, M.J, Kesanakurthi, P. R., Haidar, N. And Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1889-1895.
- Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, 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 Chet, I. (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotech.* 9, 270–277.
- Demdoun, S., F. Munoz, I. Delgado, J. Valderrabano and A. Wunsch. 2012. EST-SSR cross-amplification and genetic similarity on *Onobrychis* genus. *Genet. Resour. Crop.Evol.* doi10.1007/s10722-011-9681-x
- Diallo, B.O., Jolly, H.I., McKey, D., McKey, M.H., and Chevallier. 2007. Genetic diversity of *Tamarindus indica* populations: Any clues on the origin from its current distribution. *American Journal of Biotechnology* 6: 853-860.
- Dieffenbach, C. w., and Dveksler, G. S. 2003. PCR primer: Laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh leaf Tissue. *Photochemical Bulletin* 19:11-15
- Ebihara, A., Nitta, J.H. & Ito, M. 2010. Molecular species identification with rich floristic sampling: DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan. *PLoS ONE* 5: e15136.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., Percy, D. M., Hajibabaei, M. and Barrett, S. C. H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3: e2802.
- 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
- Ford, C. S., Ayres, K. L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J. V. A., Kelly, L. J., Wikström, N., Hollingsworth, P. M., Duff, R. J., Hoot, S. B., Cowan, R. S., Chase, M. W. and Wilkinson, M. J. 2009. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 1-11.
- Gibbon, D., and Pain, A. 1985. *Crop of Drier Regions of the Tropics*. New York: Longman.
- Gonzalez, M.A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S.A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A.,

- Thébaud, C. & Chave, J. 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PloSONE* 4: e7483.
- Gunaseena, H. P. m., and Hughes, A. 2000. Tamarind: *Tamarindus indica* L. 1st ed. Wiltshire: Redwood books.
- Hasan, S. K., and Ijaz, S. 1972. Tamarind-A review. *Science Industry (Karachi)* 9: 131-137.
- 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.
- Hershkovitz, M A., and Zimmer, E. A. 1996. Conservation Patterns in angiosperm rDNA-ITS2. *Nucleic Acids Research* 24: 2857-2867.
- Hilu, K.W. & Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in Plant systematics. *American Journal of Botany* 84: 830-839.
- Ince, A.G., Karaca, M. and Onus, A.N. 2010. Polymorphic microsatellite markers transferable across Capsicum species. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 285-291.
- International Centre for Underutilized Crops Institute of Irrigation and Development Studies, University of Southampton.. 2001. Tamarind: field manual for extension Workers.
- jeanmougin, F.,Thompson, J.D.,GonM, M., Higgins, D.G. and Gibson,T.J.(1998). Multiple Sequence Alignment with Cluster x. *Trends in Biochemical Sciences*. outhampton : International Centre for Underutilized Crops. 23:403-405.
- Karaca, M., Ince, A.G., Elmasulu, S.Y., Onus, A.N. and Turgut, K. 2005. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Anal Biochem*. 343: 353-355.
- Kass, E., and Wink, M. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS1 and 2). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 65-88.
- 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.

- Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. PLoS ONE 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508
- Kulkarni, R. S., Gangaprasad, S., and Swamy, G.S. K. 1993. Tamarind: Economically an important minor forest produce. Minor Forest Products News. 3: 6.
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Papulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G. & Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2923-2928.
- Lefevre, J. C. 1971. Review of the literature on the tamarind. Fruits 26: 687.
- Morgante, M., and Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J. 3:175-182.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., Steeves, R. A. D. and Janovec, J. 2007. Testing candidates plant barcode regions in the Myristicaceae. Molecular Ecology Resources 8: 480-490.
- Ornatowski, W., J. Jayaraj, T.C. Todd, W.T. Schapaugh, S. Muthukrishnan and H.N. Trick. 2004. Introduction and constitutive expression of tobacco hornworm (*Manduca sexta*) chitinase gene in soybean. In vitro Cell. and Dev. Biol. Plant 40(3): 260-265 .
- Pappinen, A., Degefu, Y., Syrjälä, L., Keinonen, K., 2002. Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows resistance to *Pyrenopeziza betulicola*. Plant Cell Rep. 20, 1046–1051.
- Paterson, A.H., Tanksley, S.D., and Sorrells, M.E. 1991. DNA markers in plant improvement. Adv. Agron. 46:39-90.
- 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.

- Naresh, V., Yamini, K.N., Rajendrakumar, P. and Kumar, V.D. 2009. EST-SSR Markerbased assay for genetic purity assessment of safflower hybrids. *Euphytica* 170:347-353.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.M. & Specht, C.D. 2007. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding makers for species identification of cycads. *PLoS ONE* 2: e1154.
- Seberg, O. and Petersen, G. 2009. How many loci does it take to DNA barcode a crocus? *PLoS ONE* 4: e4598.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for Phylogenetic analysis. In: *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. D.E., Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle (Eds.), pp.1-42. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Swofford, D.L.(2003). *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Method)*. Beta Version 4.0610. Sunderland, Massachusetts. Seminar Associates.
- The Royal Botanic Gardens, Kew. 2007. Phase 2 Update. DNA barcoding Available Source: [http://www.kew.org/barcoding /update.html](http://www.kew.org/barcoding/update.html). June 21, 2007.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายต้นต่อ CTAB buffer

1.1 CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ (50 มิลลิลิตร)

ชั่ง CTAB	5.0	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

1.2 Tris-HCl 1 โมลาร์ (25 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris base	3.03	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร

1.3 EDTA 1 โมลาร์ (20 มิลลิลิตร)

ชั่ง EDTA	7.44	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

1.4 NaCl 3 โมลาร์ (50 มิลลิลิตร)

ชั่ง NaCl	8.77	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

2. การเตรียมเอนไซม์ Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

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

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเอนไซม์ RNase A (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชั่ง RNase-A	1	มิลลิกรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

4. TE buffer (250 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris base	0.303	กรัม
EDTA	0.093	กรัม

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

10. การเตรียม CTAB buffer สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (800 ไมโครลิตร)

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

หมายเหตุ: เขย่าสารละลายให้เข้ากัน และอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

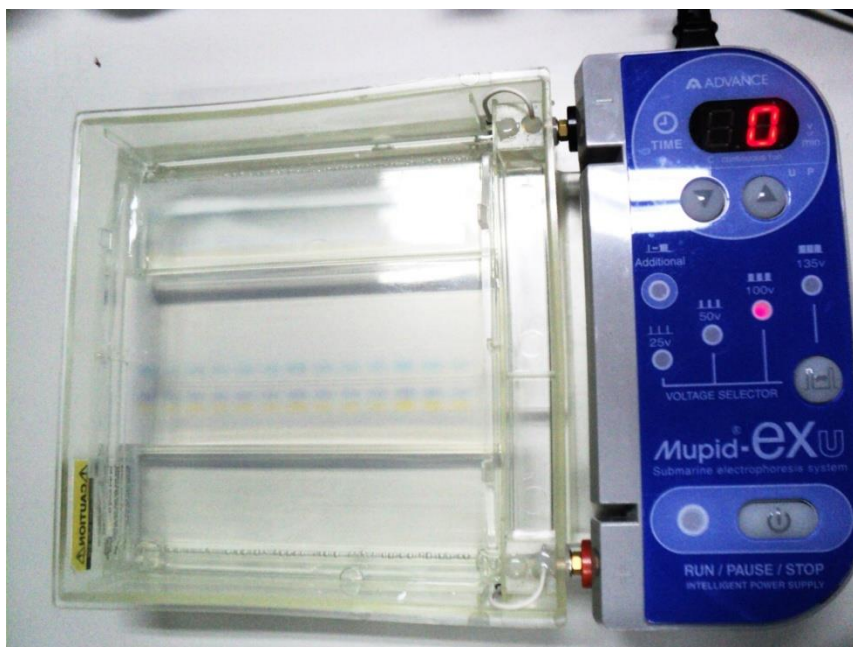
ภาคผนวก ข



ภาพที่ 31 เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Swift™ MaxPro Thermal Cycler)



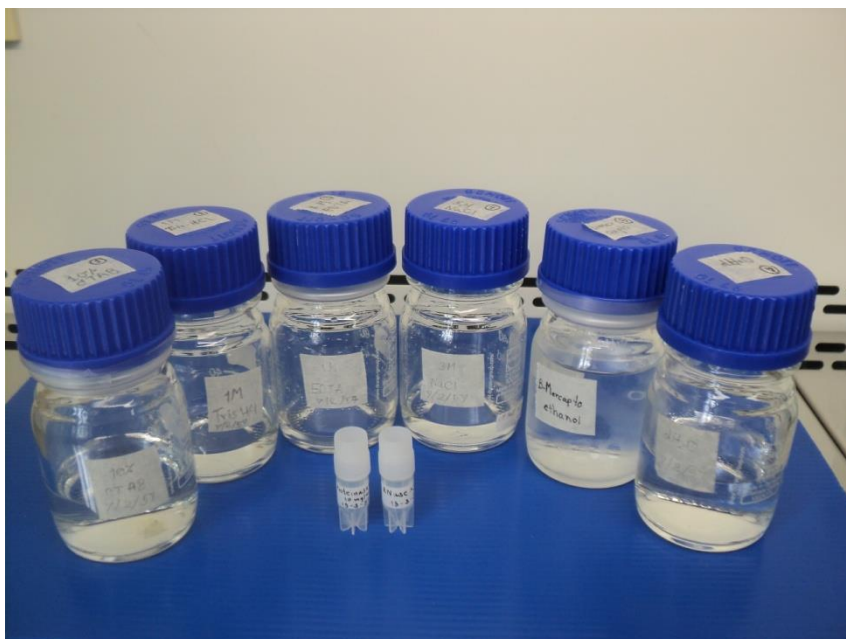
ภาพที่ 32 ชุดเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ (UV Transilluminator, ยี่ห้อ UVP, รุ่น LLC Upland, cambridge, UK)



ภาพที่ 33 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส
(Mupid-EXU[®] Gel Electrophoresis System)



ภาพที่ 34 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer,
ยี่ห้อ SHIMADZU, รุ่น UV-1700)



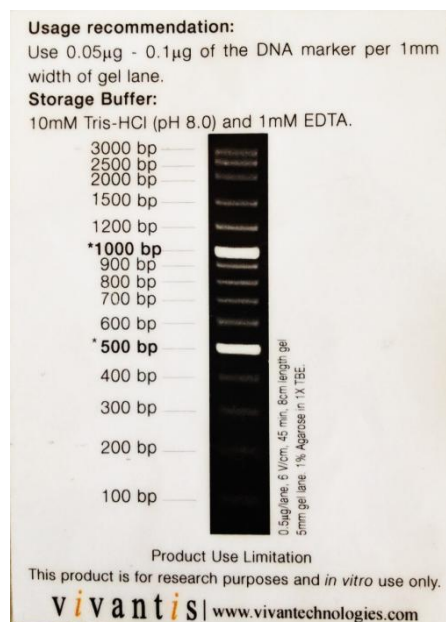
ภาพที่ 35 สารละลายต้นต่อที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB



ภาพที่ 36 ชุดสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีกระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์
(FTA™ Plant Kit, What Man, UK)



ภาพที่ 37 Agarose gel (Invitrogen™)



ภาพที่ 38 DNA Marker หรือ DNA Ladder
(VC 100bp Plus DNA Ladder, ViVaantis)



ภาพที่ 39 สีย้อมดีเอ็นเอ (6X Novel juice DNA staining dye, GeneDireX®)

ภาคผนวก ค

Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a2.1

Settings for this run:

Cycle 18: OTU 1 (0.05911) joins OTU 2 (-0.01381)
Cycle 17: node 1 (1.13804) joins OTU 4 (0.21421)
Cycle 16: OTU 12 (0.58289) joins OTU 18 (-0.00239)
Cycle 15: OTU 10 (0.01110) joins node 12 (0.02245)
Cycle 14: node 1 (0.08496) joins OTU 15 (0.04871)
Cycle 13: node 1 (0.02767) joins node 10 (0.04404)
Cycle 12: node 1 (0.00600) joins OTU 21 (0.00839)
Cycle 11: node 1 (0.01323) joins OTU 11 (0.02103)
Cycle 10: OTU 8 (0.01481) joins OTU 17 (0.03809)
Cycle 9: node 1 (0.00699) joins OTU 5 (0.00125)
Cycle 8: node 1 (0.00455) joins OTU 14 (0.04753)
Cycle 7: node 1 (0.00103) joins OTU 20 (0.00211)
Cycle 6: node 1 (0.00007) joins OTU 3 (-0.00005)
Cycle 5: OTU 6 (-0.00003) joins node 8 (0.00528)
Cycle 4: node 6 (0.00002) joins OTU 7 (-0.00002)
Cycle 3: node 6 (0.00001) joins OTU 9 (-0.00001)
Cycle 2: node 6 (0.00001) joins OTU 13 (-0.00001)
Cycle 1: node 6 (0.00001) joins OTU 16 (-0.00001)

ค่าการวิเคราะห์จากโปรแกรม Bioedit

Tamarindus indica chloroplast rbcl gene for ribulose 1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, specimen_voucher: PCU:TI-PY/P3

GenBank: AB378730.1

LOCUS AB378730 1398 bp DNA linear PLN 07-JAN-2009

DEFINITION Tamarindus indica chloroplast rbcl gene for ribulose
1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds,
specimen_voucher: PCU:TI-PY/P3.

ACCESSION AB378730

VERSION AB378730.1 GI:219687669

KEYWORDS .

SOURCE chloroplast Tamarindus indica

ORGANISM Tamarindus indica

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
Pentapetalae; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Caesalpinioideae;
Detarieae; Tamarindus.

REFERENCE 1

AUTHORS Sukrong,S., Khanthapok,P. and Pongsamart,S.

TITLE DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind
cultivars with high laxative activity

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1398)

AUTHORS Sukrong,S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-FEB-2008) Contact:Suchada Sukrong Chulalongkorn
University, Pharmacognosy; Phyathai, Bangkok 10330, Thailand

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1398

/organism="Tamarindus indica"

/organelle="plastid:chloroplast"

ORIGIN

1 cttgsgttca aaagcsgtgt taaagattat aaattgactt attatactcc tgactatgaa
 61 accaaggata ctgatatctt ggcagcattc cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc
 121 gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa tcttctactg gtacatggac aactgtgttg
 181 accgacgggc ttaccagcct tgatcggtac aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt
 241 gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat gtagcttacc ccttagacct tttgaagaa
 301 ggttctgtta ctaacatgtt tacttccatt gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg
 361 cgcgctctac gtctggagga tttgcgaatc cctacttctt atattaaaac tttccagggt
 421 ccgcctcacg gtatccaagt tgagagagat aaattgaaca agtatggccg tcccctattg
 481 ggatgtacta ttaaacctaa attggsgtta tccgctaaga attacggtag agcsgtttat
 541 gaatgtctcc gcsgtggact tgattttacc aaagatgatg agaacgtgaa ttcccaacca
 601 tttatgcgtt ggagagaccg tttcttattt tsgccgaag caatttataa agcacaggcc
 661 gaaacgggtg aaattaaagg gcattacttg aatgctactg cgggtacatg ggaagaaatg
 721 ataaaaagag ctgtatttgc gagagaattg ggagttccta tcgtaatgca tgactactta
 781 acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg gtcattatt gtcgggataa tgggtactt
 841 cttcacatcc atcgtgcaat gcatgcagt atcgatagac agaagaatca tggatgcat
 901 tttcgtgtac tagctaaagc gttacgttg tctggtggag atcatattca cgctsgtact
 961 gtagtaggta aactggaagg ggaagagaa atcactttag gttttgttga tttactacgt
 1021 gatgatttta ttgaaaaaga tcgaagccgc ggtatttatt tctactaaga ttgggtctct
 1081 ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga ggtattcacg tttggcatat gccgctctg
 1141 accgagatct ttggagatga ttccgtacta caatttggtg gaggaacttt gggacaccct
 1201 tggggaaatg caccgggtgc cgtagcta atcgtagctc tagaagcatg tgtacaagct
 1261 cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtgag ggtaatgaaa ttatccgtga ggtagcaaa
 1321 tggagtcctg aattagctgc tgcttgtgaa gtaggaagg aaatcaaatt tgaattccca

FASTA Format

Tamarindus indica chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, specimen_voucher:

PCU:TI-PY/P3

GenBank: AB378730.1

[GenBank Graphics](#)

|AB378730.1| Tamarindus indica chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, specimen_voucher: PCU:TI-PY/P3

```
CTTGGGTTCAAAGCGGTGTTAAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAGGATACTGA
TATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCGCCCGAAGAAGCAGGTGCCGCAGTAGCTGCT
GAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACCGACGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGAT
GCTACCACATCGAGCCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTT
GAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTCTTTGGGTTCAAGGCCCTGCGCGCTCT
ACGTCTGGAGGATTTGCGAATCCCTACTTCTTATATTAATAAACTTTCCAGGGTCCGCCTCACGGTATCCAAGTTG
AGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGCCGTCCTTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGGGGTTATCCGCT
AAGAATTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGA
ATTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAA
ACGGGTGAAATTAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCGGGTACATGGGAAGAAATGATAAAAAGAGCTGTAT
TTGCGAGAGAATTGGGAGTTCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGGGGATTACCCGCAAATACTAGCTT
GGCTCATTATTGTCGGGATAATGGTCTACTTCTTACATCCATCGTGCAATGCATGCAGTTATCGATAGACAGA
AGAATCATGGTATGCATTTTCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTTGTCTGGTGGAGATCATATTCACGCTGGT
ACTGTAGTAGGTAAGTGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTTGTTGATTTACTACGTGATGATTTTAT
TGAAAAAGATCGAAGCCGCGGTATTTATTTCACTCAAGATTGGGTCTCTCTACCGGGTGTCTGCCCGTTGCTT
CGGGAGGTATTCACGTTTGGCATATGCCCGCTCTGACCGAGATCTTTGGAGATGATTCCGTACTACAATTTGG
TGGAGGAACTTTGGGACACCCTTGGGGAAATGCACCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGT
GTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGTGAGGGTAATGAAATTATCCGTGAGGCTAGCAAATGGA
GTCCTGAATTAGCTGCTGCTTGTGAAGTATGGAAGGAAATCAATTTGAATTCCCAGCAATGGATACTTTGTAA
```

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* accession number AB378730

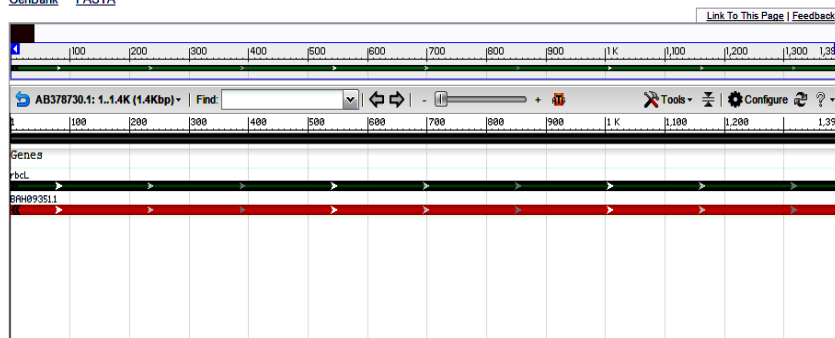
NCBI Resources ☒ How To ☒ Gmail - Sign up with Google <https://www.gmail.com/intl/th/mail/help/about.html> Sign in to NCBI

Nucleotide

Display Settings: ☒ GraphicsSend: ☒

Tamarindus indica chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, specimen_voucher: PCU:TI-PY/P3

GenBank: AB378730.1

[GenBank](#) [FASTA](#)Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Recent activity [Turn Off](#) [Clear](#)

Tamarindus indica chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase... Nucleotide

T.indica chloroplast rbcL gene

Nucleotide

Tamarindus indica chloroplast, complete genome Nucleotide

tamarindus indica rbcL (18) Nucleotide

tamarindus indica microsatellite (0) Nucleotide

[See more...](#)

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

Gymnocladus GTTGGTTCAAAGCTGGGTTAAAGATATAAATTGCTTATTATCCTGACTATGAAACCAAACTCTGTATCTTGGCAGCATTAGAACTCTCAACTGAGCCTAGGGTGCCGCGTAGCTGGAACTCTACA

Tamarindus i CTTGGTTCAAAGCGGGTTAAAGATATAAATTGCTTATTATCCTGACTATGAAACCAAGATCTGTATCTTGGCAGCATTAGAACTCTCAACTGAGCCTAGGGTGCCGCGTAGCTGGAACTCTACA

ITPL ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

SCPK GCTAGCGAGTCTCGAGCTGCTGATAGCTGCGTCTCGATTAGCTGCGATAGCTGCTGCGATTAGCTGCTGCAATTTGGGGATCTGATTAGCTAAGTGTGCGAGTCTCGAATTTAGCT

SCPP ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

STB ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

STN ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

STJ AGAATCTAACTGCGGGGCTGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

KTY ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

KTS TCAACTCCACCGGGGCTGCGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

SPD ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

SAT TCTACTTCTCCGCGGGTCTGCGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

PRP ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

PKT ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

PPM TCTACTTCCACGGTGGGTCAACGATACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

PRR ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

NUP ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

PPY ACACCTTCCCGGGGGTCTGCGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

FAD ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

MUJ ACTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

PBT GCTACTTAAACAGGGGGAACGCAAACTACTAGTGTCTATTATGTCGGGAAATGGTCTACTTCTCCATCCATCGTGCAATCATGCAAGTATCTGTAGACAAATGGTATGCAATTTCTGTGTACTAGCG

120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

Gymnocladus TCTACATGACAACTGTGTGCGAGGCTAGCTTCTGTTAAAGGCGATGCTACCACTAGCCCTGGGAGGAGAACTCAATTTATTTGCTTATGATGCTTACCTTTGACCTTTTGAAGAGGTTCT

Tamarindus i TCTACATGACAACTGTGTGCGAGGCTAGCTTCTGTTAAAGGCGATGCTACCACTAGCCCTGGGAGGAGAACTCAATTTATTTGCTTATGATGCTTACCTTTGACCTTTTGAAGAGGTTCT

ITPL CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

SCPK TTAGCTGTGCTTGTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

SCPP CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

STB CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

STN CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

STJ CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

KTY CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

KTS CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

SPD CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

SAT AGAGCCAAAGCTGAATCTCCGCAACAGAAATCCCTGGTAGTAGTACCAGTCTGGAAGGTGAAATGAAATACCGCTTCGATCTTTTCAATAATCATCACGTAGTAAATCAACAAACCTTA

PRP CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

PKT CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

PPM CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

PRR CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

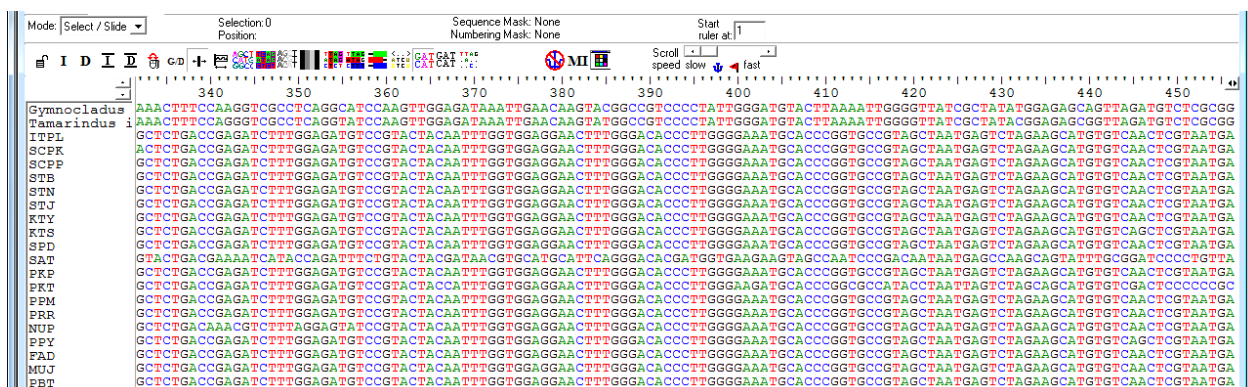
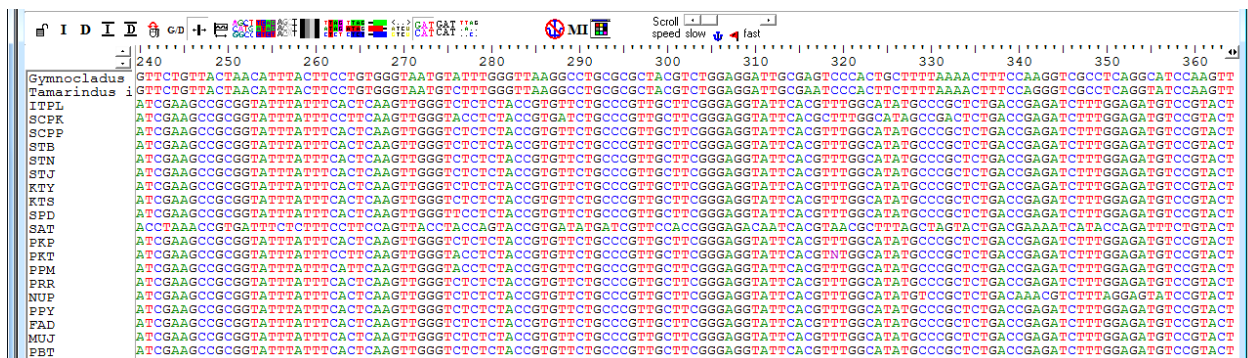
NUP CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

PPY CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

FAD CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

MUJ CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA

PBT CTAGCGTTAGCTTTGCTGTGGAGATCATATTCCGCTGGTACTGTAGTAGGTAAGTAACTGGAAGGGGAAAGAGAAATCACTTTAGGTTTGTGATTTTACGTGATGATTTTATTGAAAAGATCGA



ภาพที่ 40 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit ด้วยวิธี Neighbor-Joining/UPGMA method

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Surachest Aiumsumang

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ ไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์ มือถือ 0899612694

e-mail : tophesun@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ จากคณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากคณะ
วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับวุฒิการศึกษาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา สาขาย่อย
ชีววิทยาโมเลกุล

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีววิทยาโมเลกุล พันธุศาสตร์โมเลกุล

งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง, ดวงกมล แม่นศิริ. (2554). การใช้วิตามินซีในการส่งเสริมความทนต่อสภาวะ
เครียดเกลือในมะขาม (*Oryza sativa* L.). ใน: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับ
บัณฑิตศึกษาครั้งที่ 12 (สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ). หน้า 544 – 553. บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง, เบญจพร ศรีสุวรรณ. (2557). การแสดงออกของยีนไคตินเนสในการ

ต้านทานโรคราในมะขาม. ในการประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่
ที่ 1 สานพลังปัญญา เพื่อพัฒนาสุขภาพ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้สังคมพหุ
วัฒนธรรม. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

ประวัติผู้วิจัยร่วม 1

ชื่อ และนามสกุล (ภาษาไทย) รศ. ดร. เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ

(ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. DR.BENCHAPORN SRISUVORAMAS

ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

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

มหาวิทยาลัย UP LOSBANOS ปีที่จบ พ.ศ.2542

สถานที่ติดต่อ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์

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

งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่แล้ว

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และจินตนา สนามชัยสกุล.2552. ศึกษาช่วงเวลาการติดเชื้อราและผลของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สารสกัดสมุนไพร สารสกัดสะเดา และน้ำส้มควันไม้ ที่มีต่อเชื้อราจากมะขามหวานพันธุ์ประกายทองในห้องปฏิบัติการ. เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทูลอดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปีการศึกษา 2552.

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

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาตุลย์ จงรักษ์ ประยูร ลิ้มสุข และ กฤษณ์พนธ์ พรรณรัตน์ชัย. 2551.

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

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ.2551.การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรพญาวานรโดยการมีส่วนร่วมของผู้ใช้สมุนไพร เพชรบูรณ์:คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทูลสถาบันวิจัยและพัฒนาประจำปี 2551 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

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

ศึกษาการผลิตผักโขมที่ปราศจากสารก่อเนื้องอก(แคลเซียมออกซาเลต) โดยวิธีไฮโดร โพนิกส์

เพื่อเป็นต้นแบบไปสู่ภาคธุรกิจ เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนงบประมาณแผ่นดินโดยผ่านการพิจารณาจาก วช.
2550

เบญจพร ศรีสุวรรณมาส.2549. **การศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของสบูดำโดยเทคนิคการ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฝังตัวอย่างในพาร์ฟฟิน.** เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและ
พัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปี 2549

เบญจพร ศรีสุวรรณมาส.2548.**คุณค่าทางอาหารและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแคลลัสผักโขมหนามที่
ปราศจากสารก่อเนื้องอก.** เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย
ราชภัฏเพชรบูรณ์

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

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

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

เบญจพร ศรีสุวรรณมาส และคณะ. 2545. **ศึกษาการเพาะเมล็ดแก้วมังกรด้วยเทคนิค Embryo
Rescue.** เพชรบูรณ์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์

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

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

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

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

7. ตำรา/เอกสารประกอบการสอน

รายวิชา: พันธุศาสตร์ ISBN 974-7479-45-1

ชีววิทยาของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ไมโครเทคนิค

จุลชีววิทยา

วิทยาศาสตร์เพื่อคุณภาพชีวิต

วิทยาศาสตร์ในชีวิตประจำวัน

8. ประวัติการศึกษา และประวัติการทำงาน

ประวัติการศึกษา

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

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

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

ประวัติผู้วิจัยร่วม 2

ชื่อ-ชื่อสกุล : (ภาษาไทย) นายกาญจน์ คุ่มทรัพย์
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Kan Khoomsab

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

หลักสูตรสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ e mail:
topkarn13@hotmail.com โทร 08 – 4113 - 2456

ประวัติการศึกษา ปริญญาโท สาขาสัตววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้
ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

กาญจน์ คุ่มทรัพย์, มารยาท โยทองยศ และปิยกัน เทียนทอง. 2549. โครงการวิจัย

ประเมินผลการพัฒนาคุณภาพกลุ่มแม่น้ำท่าจีนให้เอื้อต่อการดำรงชีวิตอย่างเป็นสุขและ
เอื้อต่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ. วารสารมหาวิทยาลัยคริสเตียน ปีที่12 ฉบับที่ 2 หน้า
155-161, นครปฐม.

กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2549. การประเมินผลโครงการเพิ่มศักยภาพการผลิตอาหารโตะจีน
นครปฐมสะอาด-ปลอดภัย. วารสารมหาวิทยาลัยคริสเตียน ปีที่12 ฉบับที่ 3 หน้า 216-
221, นครปฐม.

วีระศักดิ์ ฟุ่งเฟื่อง, วัชรภรณ์ รวมธรรม, กฤติยา เลิศขุนหะเกียรติ, กาญจน์ คุ่มทรัพย์ และสากล
กาญจนรจิต. 2549. การติดเชื้อ Anaplasma ในเนื้อทรายจาก สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์
ป่าห้วยทรายในจังหวัดเพชรบุรี. การประชุมทางวิชาการ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44, หน้า 557-560, กรุงเทพฯ.

วีระศักดิ์ ฟุ่งเฟื่อง, วัชรภรณ์ รวมธรรม, กฤติยา เลิศขุนหะเกียรติ, กาญจน์ คุ่มทรัพย์,
สากล กาญจนรจิต และอาคม สังข์วรานนท์. 2549. การศึกษาเบื้องต้นการปรากฏ
ของปรสิตในทางเดินอาหารของเนื้อทรายจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยทรายใน
จังหวัดเพชรบุรี. วารสารสัตว์ป่า เมืองไทย ปีที่ 13 ฉบับที่ 1 หน้า 222-228,
กรุงเทพฯ.

Panas Tumkiratiwong, Kan Khoomsab and Veerapol Boonchudoung. 2008.
Seasonal Profiles of Sex Steroid Hormones and Corticosterone of

Silver Pheasant *Lophura nycthemera jonesi* Maintained in Captivity,
2008, Ornitho Sci 7:67-73.

Kan Khoomsab and Pojanie Khummongkol. 2010. Monitoring of Sulfate and Nitrate Fluxes above Tropical Forest Using Aerodynamic Gradient Method, 2010, International Conference on Environment 2010, Malaysia.

Kan Khoomsab and Pojanie Khummongkol. 2010. Application of Bowen Ratio Method for Estimating Fluxes of Sulfate and Nitrate Aerosols, 2010, International Conference on Biology, Environment and Chemistry (ICBEC 2010), Hong Kong.

Kazuhide Matsuda, Hiroyuki Sase, Naoto Murao, Tatsuya Fukazawa, **Kan Khoomsab**, Phuvasa Chanonmuang, Thiti Visaratana, Pojanie Khummongkol. 2012. Dry and Wet Deposition of Elemental Carbon on a Tropical Forest in Thailand. Atmospheric Environment. (54) 2012, 282 – 287.

ประวัติผู้วิจัยร่วม 3

ชื่อ และนามสกุล (ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. สมพงษ์ แสนเสนยา
(ภาษาอังกฤษ) Sompong Sansenya (Ph.D)

ตำแหน่งวิชาการ อาจารย์

การศึกษาสูงสุด Ph.D สาขาวิชา ชีวเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีที่จบ พ.ศ.2556

สถานที่ติดต่อ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ (056) 717122 ต่อ 2713 โทรสาร (056) 717123 40 ซ. พระพุทธบาท 2 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ รหัสไปรษณีย์ 67000 โทรศัพท์ (056) 711186
โทรศัพท์มือถือ 09-0564-8177 E – mail : sompong_biochem@yahoo.co.th

ประวัติการศึกษา และประวัติการทำงาน

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี : วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เชียงใหม่ เมื่อ พ.ศ. 2548

ปริญญาโท : วท.ม. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นครราชสีมา เมื่อ พ.ศ. 2552

ปริญญาเอก : ประ.ด. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นครราชสีมา เมื่อ พ.ศ. 2556

งานวิจัยที่สำคัญและพิมพ์เผยแพร่

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

- Sansenya, S.,** Maneesan, J, and Ketudat Cairns, J.R. (2012). Exchanging a single amino acid residue generates or weakens a +2 cellobiosaccharide binding subsite in rice β -glucosidase. *Carbohydrate Research*. 351,130-133.
- Sansenya, S.,** Opassiri, R., Kuaprasert, B., Chen. C.J. and Ketudat Cairns, J.R. (2011). The crystal structure of rice (*Oryza sativa* L.) Os4BGlu12, an oligosaccharide and tuberonic acid glucoside-hydrolyzing β -glucosidase with significant thioglucosylhydrolase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 510, 62-72.
- Sansenya, S.,** Ketudat Cairns, J.R, and Opassiri, R. (2010). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of rice (*Oryza sativa* L.) Os4BGlu12 β -glucosidase. *Acta. Cryst F66*. 320-323-801.
- Kutadat Cairns, J.R., Pengthaisong S., Luang S., **Sansenya S.,** Tankrathok, A. and Svasti J. (2012). Protein-carbohydrate interactions leading to hydrolysis and transglycosylation in plant glycoside hydrolase family 1 enzyme. *J. Appl. Glycosci.* 59, 51-62.
- Himeno, N., Saburi, W., Wakuta, S., Takeda, R., Matsuura, H., Nabeta, K., **Sansenya, S.,** Ketudat Cairns, J.R., Mori, H., Imai, Ryojo., and Matsui, H. (2013). Identification of rice β -glucosidase with high hydrolytic activity towards salicylic acid β -D-glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77 (5), 120889-1-6.
- Hua, Y., **Sansenya, S.,** Saetang, C., Wakuta, S., and Ketudat Cairns, J.R. (2013). Structural and enzymatic characterization of Os3BGlu6 and its mutants hydrolyzing gibberellin glucosyl ester to release free Gibberellin GA₄. *Arch. Biochem. Biophys.* 537, 39-48.
- Sansenya, S.,** Wakuta, S., Matsui, H. and Ketudat Cairns, J.R. (2013). The structure

basis of natural substrate binding in rice Os4BGlu12 β -glucosidase.
(Manuscript in preparation).

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ

Sansenya, S., Janjira Maneesan and Ketudat Cairns, J.R. The effect of a single residue On +2 subsite binding of oligosaccharides by rice Os3BGlu6, Os3BGlu7 and Os4BGlu12 β -glucosidase. 6th Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, 30 August-2 September, 2011.

Sansenya, S., Opassiri, R., and Ketudat Cairns, J.R. The crystal structure of Os4BGlu12, A rice β -glucosidase with significant thioglucosidase activity. 5th Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010.

Sansenya, S., Ketudat Cairns, J.R., and Opassiri, R. Structure determination of rice Os4BGlu12 β -glucosidase with and without G2F inhibitor. 4th Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, September 26-28, 2009.

Sansenya, S., Ketudat Cairns, J.R., and Opassiri, R. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of β -glucosidase from rice (*Oryza sativa* L.). 3rd Annual Symposium of Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, August 28-29, 2008.