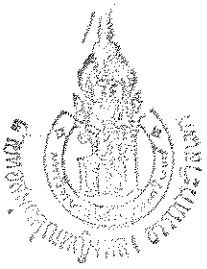
การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมและแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู (*Lansium domesticum* Correa) โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)



สุวิมล กลศึก

Suvimon Konlasuk

เลขหมู่ QK926 ศ95 2544 ฉ.2
Bib Key 208555
3 มิ.ย. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2544

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมและแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู (*Lansium domesticum* Correa) โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

ผู้เขียน นางสาวสุวิมล กลศึก

สาขาวิชา พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการสอบ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุมิตรา วิสุทธารมณ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอสนอง คุณหญิงหลง ยรรยงกระวีนนท์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วันที่ได้รับรา
บัณฑิตวิทยาลัย มอ.
วันที่ 1 เมษ. 2544

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมและแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาดและดูกู (*Lansium domesticum* Correa) โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
ผู้เขียน	นางสาวสุวิมล กลศึก
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของพืชสกุล *Lansium* คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู และตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมโดยการหาความหนาแน่นและวัดขนาดของปากใบ และการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่า ลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากที่สุดอยู่ในช่วง 137-144 แท่ง ส่วนโครโมโซมของลองกองและดูกูอยู่ในช่วง 121-129 แท่ง เมื่อหาความหนาแน่นและขนาดปากใบ พบว่า จำนวนและขนาดปากใบของลองกองมีค่าสูงสุดเท่ากับ 27.83 ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และ 167.8 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับลางสาดและดูกู ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์นั้นลางสาดมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุดแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับพืชอีกสองชนิด

การแยกความแตกต่างของลองกอง ลางสาด และดูกูด้วยเทคนิค RAPD โดยการเก็บตัวอย่างใบชนิดละ 12 ต้น จากแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และสวนเกษตรกรจังหวัดปัตตานีและจังหวัดนราธิวาส นำมาศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการทำ RAPD โดยเริ่มจากการทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ จาก 4 วิธีที่ศึกษา พบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกองด้วยวิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) ให้ดีเอ็นเอที่สะอาดและมีปริมาณสูงสุดคือประมาณ 15-20 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด เมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบในระยะต่างๆกัน พบว่าใบอ่อนมีแนวโน้มให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด ในขณะที่ใบเพสลาดและใบแก่ให้ปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน จากการทดลองเก็บรักษาใบลองกองในสภาพและระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่า การเก็บรักษาใบที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียสให้ผลดีที่สุด เมื่อทำการเก็บรักษาใบที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 30 วัน ยังคงให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพเพียงพอสำหรับทำพีซีอาร์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร คือ ใช้จีโนมิคดีเอ็นเอเข้มข้น 40 นาโนกรัม, นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้นชนิดละ

100 ไมโคโมลาร์, ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์, แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต สำหรับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 39 รอบ และรอบสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นจึงทำการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างพืชทั้งสามชนิด จากไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 100 ชนิดที่ทำการศึกษา พบว่ามีไพรเมอร์ 47 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และในจำนวนนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิดซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกูได้อย่างชัดเจน คือ OPA-10, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 และ OPT-08 จากการทดสอบกับไพรเมอร์ทั้ง 10 ชนิด กับตัวอย่างต้นลองกอง ลางสาด และดูกูที่สุ่มมาชนิดละ 12 ต้น พบว่าลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกต้นและทุกไพรเมอร์ แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรลองกอง ในขณะที่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรลางสาดและดูกู แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรทั้งสอง นอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอของลองกองทั้งหมดแตกต่างจากแถบดีเอ็นเอของลางสาดและดูกู ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างลองกองและพืชอีกสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Thesis Title	Studies on Ploidy Level and Identification of Longkong, Langsat and Duku (*Lansium domesticum* Correa) by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique.
Author	Miss Suvimon Konlasuk
Major Program	Plant Science
Academic Year	2000

Abstract

The chromosome number from root cell of *Lansium domesticum* Correa ; longkong, langsat and duku was investigated and the ploidy level was determined by comparison of stomatal density and size and chlorophyll content measurement. The chromosome number of langsat is approximately 137-144 while chromosome number of longkong and duku vary from 121-129. The stomata density and size of longkong leaves were 27.83 /mm^2 and 167.8 µm respectively, which are significantly larger than those of langsat and duku. Eventhough, no significantly different in chlorophyll content was found, but langsat tended to have the highest chlorophyll content.

Identification of *Lansium domesticum* Correa was examined using the RAPD technique. Leaves from 12 plants each of longkong, langsat and duku were collected from field grown plants at the Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla and longkong orchards at Pattani and Narathivat provinces. Methods for DNA extraction were investigated. From 4 different methods, the CTAB method modified from Doyle and Doyle (1990) showed the best result, with 15-20 µg/200 mg fresh leaves obtained. Then DNA extracted from leaves in three different stages of development was compared. Young leaves tended to produce a higher yield while young fully expanded leaves and old leaves gave almost the same amounts of DNA. Quantity and quality of extracted DNA from leaves that were kept for various times under different conditions was determined. The results indicated that storage of leaves under -30°C gave the best preservation. After 30 days at -30°C, the DNA was still good enough for PCR. Conditions for PCR reaction were optimized to obtain a clear banding pattern. It was found that the

following conditions are suitable for RAPD-PCR of *L. domesticum* ; 40 ng of genomic DNA, 100 µM each of dNTP, 0.3 µM of primers , 2.5 mM of $MgCl_2$ and 1.5 units of Taq DNA polymerase for a total volume of 25 µl/reaction. The thermal profile for RAPD-PCR was 39 cycles of 95°C for 1 min, 37°C for 1 min, 72°C for 2 min, then followed by 1 cycle of 95°C for 1 min 37°C 1 min and 72°C for 10 min. One hundred decamer oligonucleotide primers were screened for amplification products from each of longkong, langsat and duku DNA. From 100 primers tested, 47 generated polymorphic DNA fragments but only 10 primers; OPA-10, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 and OPT-08 showed clear and intense polymorphic bands between longkong, langsat and duku. These 10 primers were then used to identify and detect genetic variation in 12 plants each of longkong, langsat and duku. No differences in RAPD patterns were found in the longkong population, indicating genetic uniformity. There were several differences in the RAPD patterns within both the langsat and duku populations indicating genetic variability. Based on RAPD markers obtained from this study, longkong can be clearly distinguished from langsat and duku.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณดังต่อไปนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษา และแนะแนวทางในการทำวิจัยตลอดจนถึงการเรียบเรียงวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต กรรมการที่ปรึกษาและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุมิตรา วิสุทธารมณ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาให้การสนับสนุนในการทำวิจัย

ศูนย์วิจัยการควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้) ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือสำหรับทำวิจัย

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ วัสดุ และอุปกรณ์สำหรับทำวิจัย

อาจารย์อภินันท์ กำนันรัตน์ และคุณลุงแวแด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างพืชสำหรับทำวิจัย

พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโทภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนสำเร็จด้วยดี

ครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจเสมอมา

สุวิมล กลศึก

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(11)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	12
2. วิธีการวิจัย	13
3. ผล	22
การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด	22
การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง	25
ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง	25
ศึกษาอายุของใบลองกองที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ	26
ศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากใบที่เก็บรักษาด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน	27
ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการทำพีซีอาร์	32
การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู	36
4. วิจารณ์	54
5. สรุป	65
เอกสารอ้างอิง	67

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	77
ประวัติผู้เขียน	84

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แหล่งที่มาของตัวอย่างใบลองกอง ลางสาด และดูกูที่ใช้ในการศึกษา	21
2.	จำนวนปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกู	24
3.	ขนาดปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกู	24
4.	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีที่สกัดได้จากลองกอง ลางสาด และดูกู	24
5.	สีใบ เส้นสายดีเอ็น และตะกอนดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกองที่เก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน	29
6.	ลำดับเบสของไพรเมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD ในกลุ่มของลองกอง ลางสาด และดูกู	36
7.	ลำดับเบสของไพรเมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD ในกลุ่มลางสาด	37
8.	ลำดับเบสของไพรเมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD ในกลุ่มดูกู	37

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ระยะพัฒนาการของใบที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	19
2.	โครโมโซมของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์กำลังขยาย 1000 เท่า	23
3.	ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธีการ คือ วิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ (lane 3) วิธีการใช้แอมโมเนียมอะซีเตต (lane 4) วิธีการใช้ ROSE บัฟเฟอร์ (lane 5) และวิธีการของ McDonald และคณะ (lane 6) lane 1, 2 และ 7 เป็น λDNA ขนาด 100, 200 และ 50 นาโนกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร ตามลำดับ	26
4.	ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบที่มีระยะพัฒนาการต่างกัน 3 ระยะ คือ ใบอ่อน (lane 2 และ 3) ใบเพสลาด (lane 4 และ 5) ใบแก่ (lane 6 และ 7)) lane 1 และ 8 เป็น λDNA ขนาด 200 และ 100 นาโนกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร ตามลำดับ	27
5.	ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (RT) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (4) และอุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส (-30) เป็นเวลาแตกต่างกันคือ 1, 3, 5, 7, 14 และ 30 วัน, M คือ λDNA ขนาด 80 นาโนกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร	30
6.	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	30
7.	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	31
8.	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	31
9.	ความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	33
10.	ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	33

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11.	ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตต่อการเกิดผลผลิต พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	34
12.	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	34
13.	ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase ต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	35
14.	ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับส่วนของจีโนมิคดีเอ็นเอต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด 100 คู่เบส	35
15.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	44
16.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPB-04 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	45
17.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPB-07 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	46
18.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-04 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	47
19.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-05 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M คือ Ladder DNA ขนาด 500 คู่เบส	48

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
20.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-08 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	49
21.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPD-01 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M คือ Ladder DNA ขนาด 500 คู่เบส	50
22.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPD-03 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	51
23.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPT-01 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	52
24.	แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPT-08 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ	53

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ลองกอง ลางสาด และดูกู (*Lansium domesticum* Correa) เป็นไม้ผลเขตร้อน ปลูกมากทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะลองกองถือเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคใต้ และปัจจุบันมีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังภาคอื่นของประเทศ พื้นที่ปลูกรวมทั่วประเทศในปี 2538 ประมาณ 160,783 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) อย่างไรก็ตามในการผลิตลองกองยังคงประสบปัญหามากมาย เช่น ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ คุณภาพผลไม่แน่นอน ปัญหาการเก็บเกี่ยวรวมไปถึงโรคและแมลง ซึ่งปัญหาเหล่านี้ส่วนใหญ่เกิดจากปัจจัยสภาพแวดล้อมและการจัดการที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ความไม่แน่นอนของพันธุ์ที่ใช้ปลูกเป็นปัญหาสำคัญอีกปัญหาหนึ่งที่ชาวสวนลองกองประสบอยู่ เนื่องจากสวนลองกองของเกษตรกรในหลายพื้นที่ปลูกมักมีลางสาดและดูกูขึ้นปะปนอยู่แทบทุกสวนโดยเฉพาะสวนเก่า สาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจากการใช้พันธุ์ปลูกไม่ถูกต้อง ทั้งนี้เนื่องจากความตั้งใจของผู้ขายในการปลอมปนเพราะความต้องการต้นกล้าพันธุ์มีจำนวนมาก หรือเกิดจากความผิดพลาดในการผลิตต้นกล้าพันธุ์เนื่องจากการแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกูทำได้ยากโดยเฉพาะในระยะต้นกล้า ซึ่งความผิดพลาดในเรื่องของต้นกล้าพันธุ์ก่อให้เกิดความสูญเสียต่อเกษตรกรเป็นอย่างมากเพราะลองกองใช้เวลา 7-8 ปีกว่าจะให้ผลผลิต ดังนั้นในการแยกความแตกต่างของพืชในกลุ่มนี้ด้วยวิธีการที่ถูกต้องและเหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะช่วยลดความสูญเสียให้กับเกษตรกร ในเบื้องต้นมีการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลองกอง ลางสาด และดูกูโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา (มงคล แซ่หลิม, 2538; ประพันธ์ อรรจนกุล, 2534) แต่พบว่าการใช้ลักษณะสัณฐานทำได้ยากเนื่องจากพืชในกลุ่มนี้มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะต้นกล้า ส่วนการแยกความแตกต่างโดยการตรวจสอบไอโซไซม์ (Te-chato *et al.*, 1995) ยังให้ผลไม่แน่นอน การใช้เทคนิคระดับดีเอ็นเอได้รับการพัฒนาให้สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต จึงน่าจะเป็นวิธีที่ใช้ได้ผลสำหรับการศึกษาความแตกต่างของพืชทั้ง 3 ชนิด ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้แล้วการศึกษาในระดับพื้นฐาน เช่น การใช้วิธีการทางเซลล์พันธุศาสตร์ คือ การศึกษาในระดับโครโมโซมจะเป็นแหล่งข้อมูลสำคัญเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด

และดูกู ด้วยการเปรียบเทียบชุดโครโมโซมโดยการนับจำนวนของโครโมโซมจากปลายราก การตรวจสอบความหนาแน่นและขนาดของปากใบหรือปริมาณคลอโรฟิลล์ และการใช้เทคนิคทางซีวโมเลกุล คือ เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

ตรวจเอกสาร

1. การจำแนกพันธุ์ลองกอง ลางสาด และดูกู

ลองกอง ลางสาด และดูกูจัดอยู่ในวงศ์ Maliaceae สกุล *Lansium* ซึ่งประกอบด้วย *Lansium domesticum, L. domesticum var. pubescens, L. pedicellatum* และ *L. cinereum* โดย *L. domesticum* จำแนกตามลักษณะผลมี 2 ฟอร์ม คือ ลางสาด และดูกู (Ridley, 1967) อย่างไรก็ตาม เต็ม สมิตินันท์ (2523) ได้จัดกลุ่มพืชเหล่านี้อยู่ในสกุล *Aglaia* และใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ของลองกองและดูกูว่า *Aglaia dookkoo* Griff. ส่วนลางสาดมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aglaia domestica* Pelleg.

มงคล แซ่หลิม (2538) เรียกพืชกลุ่มนี้เป็นภาษาไทยว่าพืชสกุลลางสาด โดยจำแนกออกเป็น 3 ชนิดตามลักษณะผลดังนี้

1. ลางสาด (*Lansium domesticum* cv. Langsat) มีลักษณะรูปร่างผลยาว ขนาดผล 2.4-2.8 เซ็นติเมตร เปลือกบางเรียบ สีผิวเปลือกมีสีเหลืองอ่อนคล้ายสีฟางข้าว เปลือกมียางมาก พันธุ์ลางสาดที่พบในภาคใต้ ได้แก่ ลางสาดปาดี ลางสาดซาวอร์ และลางสาดละแม

2. ดูกู (*Lansium domesticum* cv. Duku) รูปร่างผลกลม ขนาดผลใหญ่ และเปลือกหนากว่าลางสาด ไม่มียาง พันธุ์ดูกูที่พบในภาคใต้ ได้แก่ ดูกู (พื้นเมือง) ดูกูแปรแมร์ ดูกูปาเล็มบัง ดูกูมะละกะ (มะละกู่) และดูกูน้ำ

3. ลองกอง (*Lansium domesticum* cv. Longkong) มีคุณภาพผลดีที่สุดในพืชสกุลลางสาดด้วยกัน เนื้อผลมีกลิ่นหอม ผลสุกมีรสชาติหวาน ขนาดผลโดยเฉลี่ยอยู่กึ่งกลางระหว่างดูกูและลางสาด ลักษณะรูปร่างสีผิวคล้ายดูกู สำหรับลองกองเท่าที่พบมีการแยกความแตกต่างตามคุณภาพผลได้เป็น ลองกองกะละแม และลองกองน้ำ

ประพันธ์ อรรจนกุล (2534) ทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบใบของลองกอง ลางสาด และดูกูในระยะต้นกล้า พบว่าต้นกล้าลางสาดมีใบรูปไข่ : ใบรูปรี ประมาณ 1:3 แต่ลองกองและดูกูมีใบรูปไข่ :ใบรูปรี ประมาณ 1:1 การแยกความแตกต่างระหว่างลองกองและดูกูอาจทำได้โดยโดยการสังเกตผิวใบ คือผิวใบของดูกูค่อนข้างเรียบเป็นคลื่นน้อยกว่าผิวใบของลองกอง และผิวใบของลองกองเป็นมันมีสีเข้มและค่อนข้างหนากว่า อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะใบในการแยกความแตกต่างระหว่างพืชในกลุ่มนี้ยังไม่ชัดเจน

Te-chato และคณะ (1995) ได้นำเทคนิคทางซีวโมเลกุล คือ การตรวจสอบไอโซไซม์มาใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด เอนไซม์เอสเตอเรสให้ผลดีรองลงมา ส่วนเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทสแยกความแตกต่างได้

ไม่ชัดเจน ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรสไม่สามารถแยกความแตกต่างของลองกอง และลางสาดได้ นอกจากนี้การใช้ไอโซไซม์ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ต้องมีการแสดงออกของจีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ เนื่องจากสภาพแวดล้อมภายนอกบางอย่างมีผลต่อการแสดงออกของจีน ดังนั้นเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดในการนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกพันธุ์พืชสกุลนี้

2. การตรวจสอบความแตกต่างของพืชโดยการศึกษาจำนวนโครโมโซม

จีโนม (genome) หมายถึง จำนวนโครโมโซมหรือปริมาณดีเอ็นเอในหนึ่งชุดถ่ายทอดมาจากพ่อหรือแม่ให้กับลูก ซึ่งก็คือโครโมโซมหรือจีนที่มีในแกมีทของพ่อหรือแม่ (อมรา คัมภิรานนท์, 2540) สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมีจำนวนชุดของโครโมโซมสองชุดเรียกว่า ดิพลอยด์ (diploid) แต่พบว่าพืชหลายชนิดมีโครโมโซมมากกว่าสองชุดซึ่งเรียกว่า โพลีพลอยด์ (polyploid) โดยพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะที่มีการแบ่งเซลล์สามารถบ่งชี้ระดับพลอยดี (ploidy level) หรือจำนวนชุดของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตได้ การเกิดโพลีพลอยด์นับว่าเป็นกระบวนการสำคัญที่มีผลต่อการเกิดวิวัฒนาการของพืช พืชเศรษฐกิจสำคัญหลายชนิดที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันมีจำนวนชุดโครโมโซมมากกว่าสองชุด เช่น กล้วยหอมมีโครโมโซม 3 ชุด (Vandenhout *et al.*, 1995) หรือมันฝรั่งมีโครโมโซม 4 ชุด (Yamada *et al.*, 1998) ส่วนลางสาดนั้น Bernado และ Ramirez (1959) รายงานว่ามีจำนวนโครโมโซมถึง 8 ชุด (octaploid) สำหรับลองกองและดูกูยังไม่มีรายงาน อย่างไรก็ตามพืชทั้งสามชนิดนี้อาจมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันเนื่องจากความมีชีวิตของละอองเกสรแตกต่างกัน ซึ่งอุไรวรรณ นามศรี และคณะ (2543) รายงานว่า ดูกูมีการสร้างละอองเกสรเป็นจำนวนมาก และละอองเกสรเหล่านี้สามารถงอกได้เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ละอองเกสรของลองกองและลางสาดมีจำนวนน้อยมากและเกือบทั้งหมดเป็นหมัน การตรวจสอบจำนวนชุดของโครโมโซมพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การนับจำนวนโครโมโซม ซึ่งส่วนของพืชที่นำมาศึกษาเป็นบริเวณที่เนื้อเยื่อมีเซลล์รวมกันไม่หนาแน่นและเซลล์มีการแบ่งตัวสูง ที่นิยมใช้ คือ บริเวณปลายรากเป็นตัวอย่างในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส และส่วนของอับละอองเกสรในดอกตูมเป็นตัวอย่างในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสเพื่อสร้างละอองเกสร นอกจากนี้การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมอาจใช้ส่วนของปลายยอดหรือเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ในเมล็ดที่กำลังเจริญก็ได้ ในกรณีที่พืชชนิดนั้นมีโครโมโซมขนาดเล็กและมีจำนวนมาก การนับจำนวนโครโมโซมทำได้ยาก ดังนั้นการตรวจสอบระดับพลอยดีอาจต้องใช้วิธีการอื่นควบคู่กันไปด้วย เช่น การวัดขนาดและความหนาแน่นของปากใบ โดยพืชที่มีพลอยดีสูงจะมีปากใบขนาดใหญ่แต่ความหนาแน่นของปากใบน้อย ส่วนพืชที่มีระดับพลอยดีต่ำจะมีขนาดปากใบเล็กแต่มีความหนาแน่น

ของปากใบมาก (Vandenhout *et al.*, 1995) และการเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยราตรี สุจารีย์ (2540) พบว่ามังคุดที่ได้รับการทรีตโคลชิซินมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าต้นที่ไม่ได้ทรีต นอกจากนี้ยังสามารถหาระดับพลอยดีได้จากการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโทเมทรี (flowcytometry) (Awoleye *et al*, 1994; Zonneveld and van-Iren, 2000) เป็นต้น

3. การแยกความแตกต่างของพืชโดยใช้เทคนิคระดับดีเอ็นเอ

ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมามีการนำเอาเครื่องหมายทางโมเลกุลมาใช้ในสาขาการเกษตรโดยเฉพาะในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม การกลายพันธุ์ในเบญจมาศ (Wolff, 1996) การจำแนกพันธุ์และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในข้าว (สมศักดิ์ อภิสิทธิวานิช และคณะ, 2538) ความหลากหลายทางพันธุกรรมใน *Cymbidium* และแตงโม (Obara-Okeyo and Kako, 1998; Lashermes *et al.*, 1996) และการทำแผนที่ยีนในแตงโม (Hashizume *et al.*, 1996) เป็นต้น เครื่องหมายทางโมเลกุลที่นำมาใช้มีหลายชนิด เช่น การตรวจสอบไอโซไซม์หรือโปรตีนสะสม การวิเคราะห์ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) และการวิเคราะห์ RAPD หรือ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นต้น การตรวจสอบไอโซไซม์ยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากพบว่าสภาพแวดล้อมภายนอกบางอย่างมีผลต่อการแสดงออกของยีน การใช้เทคนิค RFLP, AFLP และ RAPD นั้นสามารถวิเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอโดยตรง แต่การใช้เทคนิค RFLP มีขั้นตอนยุ่งยากต้องผ่านการทำ Sounthern hybridization ต้องมีตัวตรวจสอบ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ผ่านการโคลนหรือทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งมาแล้วและติดฉลากตัวตรวจสอบด้วยสารกัมมันตภาพรังสีซึ่งมีอันตราย ต้องทำด้วยความระมัดระวังในพื้นที่ควบคุม และใช้ระยะเวลานาน ส่วนเทคนิค AFLP นั้นต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง ในขณะที่การใช้เทคนิค RAPD ทำได้สะดวก ให้ผลรวดเร็ว และง่ายกว่า

RAPD เป็นวิธีการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวน โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเฉพาะบริเวณที่สนใจให้มีปริมาณสูงขึ้นเป็นล้านเท่าด้วยการจำลองดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่เกิดขึ้นซ้ำๆ กันหลายๆ รอบ

3.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1.1 การแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) เป็นขั้นตอนที่ให้ความร้อนแก่ดีเอ็นเอสายคู่ ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 94 - 95 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ถ้าสูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์แยกสายไม่สมบูรณ์

3.1.2 การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับส่วนของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing) อุณหภูมิในช่วงนี้ถือว่าสำคัญมาก เพราะเป็นขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับบริเวณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน เกิดขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 30 - 60 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและสัดส่วนของเบสกัวนีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) ความยาวของไพรเมอร์ที่ใช้ซึ่งมีผลต่อ melting temperature (Tm) เช่น ในพืชสกุล *Passiflora* ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นจึงใช้อุณหภูมิในช่วงนี้ 36 องศาเซลเซียส (Fajardo *et al.*, 1998) ในขณะที่ในข้าวสาลีใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดยาวกว่าจึงใช้อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส (Gill and Gill, 1996)

3.1.3 การเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอ (extension) เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการต่อนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้าที่ปลายด้าน 3'OH ของไพรเมอร์โดยใช้เอนไซม์เชื่อมต่อดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ทนต่อความร้อน ปกติแล้วมักใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งสามขั้นตอนนี้ใช้เวลาสั้นๆ และหมุนเวียนเป็นรอบๆ ประมาณ 24 – 45 รอบ แต่ละรอบจะได้ดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากเดิมในลักษณะทวีคูณ ทั้งนี้เวลาที่ใช้เปลี่ยนจากอุณหภูมิหนึ่งไปยังอุณหภูมิหนึ่งต้องไม่สั้นเกินไปหรือนานเกินไป โดยเฉพาะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนที่ 2 เปลี่ยนไปเป็นขั้นตอนที่ 3 ถ้านานเกินไปจะทำให้ไพรเมอร์ที่จับอยู่กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ถูกแยกสายออกมาเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอีกครั้ง (Weising *et al.*, 1995)

การใช้เทคนิค RAPD ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอ ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียว เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล แล้วย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากการที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอสองบริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ในสองสายห่างไกลกันมาก แม้ทิศทางจะเข้าหากันก็ไม่สามารถเกิดผลผลิตได้

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความเที่ยงตรงของเทคนิค RAPD

3.2.1 จีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างพืช ในกรณีของ RAPD-PCR ต้องการดีเอ็นเอในปริมาณน้อยแต่เป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูง การสกัดดีเอ็นเอจากพืชมีหลายวิธีการ แต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดและงานที่ต้องนำไปใช้ คือ ต้องการปริมาณดีเอ็นเอมากหรือน้อยและมีความบริสุทธิ์เพียงใด ซึ่งวิธีการโดยทั่วไปคือสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีเกลือ CTAB (Barrett *et al.*, 1997; Doyle and Doyle, 1990; Gunter *et al.*, 1996; Mudge *et al.*, 1996) ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมคลอโรฟอร์มหรือฟีนอล และกำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอส (RNase) อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอสำหรับการใช้เทคนิค RAPD บางวิธีไม่มีการใช้เอ็นไซม์กำจัดอาร์เอ็นเอ (Boiteux *et al.*, 1999)

ตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดควรเป็นตัวอย่างสด แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานานควรเก็บให้ถูกต้องเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีที่สุด ตัวอย่างเช่น การสกัดดีเอ็นเอจากใบท้อ (peach) ที่ผ่านการอบแห้งด้วยวิธีการต่างๆ คือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง, อบที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส, อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้ไมโครเวฟ จากการประเมินคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่า ใบท้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องให้ปริมาณดีเอ็นเอได้สูงสุดและมีคุณภาพดีพอสำหรับการทำพีซีอาร์แม้จะเก็บไว้นาน 4 เดือน (Thomson and Henry, 1993)

3.2.2 บัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์ที่ใช้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของบัฟเฟอร์ที่ใช้จริง ซึ่งจะใส่ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา บัฟเฟอร์มักประกอบด้วย Tris - HCl (pH 8.3-8.4), เจลาติน, โปแทสเซียมคลอไรด์ และ Triton X-100 โดยเจลาติน ช่วยรักษาสภาพความคงตัวของเอนไซม์ Triton X-100 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ให้มีความจำเพาะมากขึ้น ส่วนโปแทสเซียมคลอไรด์ ช่วยให้ปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์และจีโนมิคดีเอ็นเอเกิดได้ดีขึ้น ถ้าความเข้มข้นของโปแทสเซียมคลอไรด์มากเกินไปจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส จากการทดลองในสาคูโดย Boonsermsuk และคณะ (1996) พบว่าความเข้มข้นของโปแทสเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ คือ 80 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้น 85, 90, 95, 100 และ 110 มิลลิโมลาร์ไม่สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้

3.2.3 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส หากความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนไม่เพียงพอจะมีผลให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสไม่ทำงานหรือทำงานไม่สมบูรณ์ ในทางตรงกันข้ามถ้าความ

เข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมากเกินไป ทำให้ความเที่ยงตรงของเอนไซม์ลดลง หรืออาจทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไม่มีความจำเพาะเจาะจง ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ใช้อยู่ทั่วไปอยู่ในช่วงกว้าง จากการทดลองใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในพืชหลายชนิด เช่น ในสาคู (Boonsermsuk *et al.*, 1996) *Cymbidium* (Obara-Okeyo and Kako, 1998) และ *Alstroemeria* (Anastassopoulos and Keil, 1996) พบว่าแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด ในขณะที่การทำพีซีอาร์ในอ้อยต้องใช้แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้นถึง 4 มิลลิโมลาร์ (Huckett and Botha, 1995)

3.2.4 นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ใช้ในการเติมสายดีเอ็นเอเพื่อให้เกิดดีเอ็นเอสายใหม่ หากความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตตัวใดตัวหนึ่งในจำนวนสี่ตัวลดลงจะมีผลทำให้ความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยาพีซีอาร์ลดลง ดังนั้นในการทดลองจึงควรใช้ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตทั้งสี่เท่ากัน

3.2.5 เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เดิมในการทำพีซีอาร์ใช้เอ็นไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Saiki *et al.*, 1988) คือ DNA polymerase I klenow fragment แต่เนื่องจากเอ็นไซม์ชนิดนี้ทนความร้อนสูงไม่ได้ ดังนั้นต่อมาจึงเปลี่ยนมาใช้เอ็นไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ชื่อ *Thermus aquaticus* โดยมีข้อได้เปรียบคือสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 95 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้สำหรับทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เปลี่ยนเป็นสายเดี่ยวในกระบวนการทำพีซีอาร์ ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่นิยมใช้ในการทำพีซีอาร์ ได้แก่ Taq DNA polymerase ซึ่งผลิตโดยบริษัท Promega (Degani *et al.*,1998) และ Ampli Taq ซึ่งผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer (Huckett and Botha, 1995 ; Mackill, 1995 ; Jiang and Sink, 1997) เอนไซม์เหล่านี้ช่วยให้มีการเชื่อมต่อไพรเมอร์กับนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต เพื่อให้เกิดดีเอ็นเอสายใหม่ตลอดแนวของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสมักอยู่ในสารละลายที่ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร ความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0-7.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส (Brown, 1991)

3.2.6 ไพรเมอร์ คือ ดีเอ็นเอสายสั้นๆ สายเดี่ยวที่สังเคราะห์ขึ้น มีความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ (Harvey and Botha, 1996 ; Wolff, 1996) ไพรเมอร์เป็นส่วนสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นตัวสุ่มจับกับจีโนมิคดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ไพรเมอร์ที่ดีควรมีความจำเพาะกับลำดับเบสคู่สมในจีโนมิคดีเอ็นเอ สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้อย่างคงตัว และไม่เกิดการจับกับตัวเองในลักษณะ hairpin loop หรือ self dimer

การนำเอาเทคนิค RAPD มาใช้ในการแยกความแตกต่างของพันธุ์พืชประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช และคณะ (2538) นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าในสกุล *Oryza* 5 สปีชีส์ จำนวน 16 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 18 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม พบว่ามีไพรเมอร์ 7 ชนิดที่ใช้ได้ผลดี และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 68 แถบ มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 300-1,700 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ สามารถแบ่งข้าวที่ใช้ตรวจสอบออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะสอดคล้องกับองค์ประกอบของจีโนมในแต่ละสปีชีส์นั้น และเป็นไปตามที่ได้ศึกษามาก่อน ยกเว้น *O. officinalis* 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างกันมากจึงจัดอยู่คนละกลุ่ม

Tatineni และคณะ (1996) ใช้เทคนิค RAPD และลักษณะทางสัณฐานจำแนกพันธุ์ฝ้ายที่ได้จากการผสมระหว่าง *Gossypium hirsutum* L. และ *G. barbadense* L. พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ 58 ชนิด มีเพียง 18 ชนิดที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ 138 แถบ และในจำนวนนี้มี 19 แถบสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของฝ้ายทั้ง 16 จีโนมได้ โดยผลที่ได้จากการจำแนกพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD และการใช้ลักษณะทางสัณฐานให้ผลสอดคล้องกัน

จากการจำแนกพันธุ์ท้อสายพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอจำนวน 18 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า จากไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ 20 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ 40 แถบ เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้มาวิเคราะห์ผล พบว่า สามารถจำแนกท้อได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกโดยอาศัยลักษณะการต้านทานและอ่อนแอต่อโรครากปม (Lu *et al.*, 1996)

Liu (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ *Lablab purpereus* 40 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงและพันธุ์ป่า และตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของทั้ง 40 สายพันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 58 ชนิด มี 48 ชนิด สามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ 273 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 118 แถบ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างที่ได้ พบว่า สายพันธุ์ที่เก็บมาจากเอเชีย มีความใกล้ชิดกันน้อยกว่าสายพันธุ์ที่เก็บมาจากแอฟริกา สายพันธุ์ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ คือ Rongai ซึ่งเก็บจากเคนย่า และ Highworth เก็บจากอินเดียนั้นไม่มีความแตกต่างกันมากนัก ส่วนสายพันธุ์ป่า 5 สายพันธุ์ คือ สองสายพันธุ์ที่ได้จากซิมบับเวและสองสายพันธุ์ที่ได้จากแซมเบีย มีความใกล้ชิดกัน แต่อีกสายพันธุ์ คือ CPI 31113 ซึ่งได้จากอูกานดามีแถบดีเอ็นเอแตกต่างออกไป

Sedra และคณะ (1998) ใช้เทคนิค RAPD จำแนกพันธุ์อินทผาลัม (*Phoenix dactylifera* L.) 43 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากโมรอกโค 37 สายพันธุ์ และเก็บตัวอย่างมาจากอียิปต์และทูนิเซียอีก 6 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 123 ชนิด พบว่า มีไพรเมอร์ 19 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน และมีจำนวนเฉลี่ย 1.9 แถบต่อไพรเมอร์ จากการวิเคราะห์พบว่าอินทผาลัมที่เก็บตัวอย่างจากโมรอกโคให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักต่างกันน้อยเนื่องจากมีความจำกัดของพื้นฐานทางพันธุกรรม นอกจากนี้แล้วยังมีผู้ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาการจำแนกพันธุ์ในพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น หน่อไม้ฝรั่ง (Khandka *et al.*, 1996) สตรอเบอรี่ (Degani *et al.*, 1998) และมันเทศ (Sagredo *et al.*, 1998) เป็นต้น นอกจากการจำแนกพันธุ์พืชแล้ว RAPD ยังสามารถใช้ศึกษาในด้านอื่นๆ อีกรวมไปถึงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและการตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และการตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในพืช เช่น Fiedler และคณะ (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของอะโวกาโดซึ่งเก็บตัวอย่างจากเม็กซิโก อินเดีย และกัวเตมาลาโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า อะโวกาโดที่เก็บมาจากเม็กซิโกมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม 75 เปอร์เซ็นต์ อะโวกาโดที่เก็บมาจากอินเดียมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม 71 เปอร์เซ็นต์ และอะโวกาโดที่เก็บมาจากกัวเตมาลามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม 73 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำอะโวกาโดจากเม็กซิโก อินเดีย และกัวเตมาลามาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ พบว่าอะโวกาโดที่เก็บจาก 3 สถานที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม 53-58 เปอร์เซ็นต์ จากการใช้เทคนิค RAPD หาความสัมพันธ์ขององุ่น (*Vitis vinifera*) 32 สายพันธุ์ซึ่งเก็บได้จากฝรั่งเศสและสเปน พบว่า สามารถแบ่งองุ่นได้เป็น 3 กลุ่ม โดยใน 3 กลุ่มนี้องุ่นสายพันธุ์ที่เก็บจากสเปน คือ Albarino, Caino Blanco และ Loureiro Blanco และองุ่นสายพันธุ์ที่เก็บจากฝรั่งเศส คือ Melon, Chardonnay และ Aligote มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าองุ่นสายพันธุ์อื่นๆ (Vidal *et al.*, 1999) จากการวิเคราะห์พันธุกรรมพืชกลุ่มกระเจียวในระดับชนิดและระดับโคลนโดยอาศัยเทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกระเจียวจำนวน 10 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 48 ไพรเมอร์ พบว่ามี 3 ไพรเมอร์ คือ PA 20, PD 11 และ PAB 04 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันทั้งหมด 37 แถบ โดยมีความยาวประมาณ 200 - 1,700 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแถบดีเอ็นเอสามารถแบ่งกระเจียวที่ใช้ตรวจสอบออกเป็น 2 กลุ่ม โดยมีลักษณะสอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มตามพฤติกรรมการออกดอกเร็วหรือช้า (อุไรวรรณ อรัญวาสน์, 2540) และสอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยเทคนิคไอโซไซม์ที่มีรายงานมาแล้ว Lashermes และคณะ (1996) ประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกาแฟ (*Coffea*

arabica) โดยใช้เทคนิค RAPD จากการใช้ไพรเมอร์ 40 ชนิด มีไพรเมอร์ 12 ชนิดสามารถแยกความแตกต่างของกาแฟที่เก็บตัวอย่างจากเอธิโอเปียและเคนยาออกจากกันได้อย่างชัดเจน และยังพบว่ากาแฟสายพันธุ์การค้ามีพื้นฐานทางพันธุกรรมแคบ นอกจากนี้ Wolff (1996) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของเบญจมาศที่เรียกว่า sporting ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเพียงบางส่วนของเนื้อเยื่อและยากต่อการแยกความแตกต่างด้วยลักษณะสัณฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันในต้นเดียวกันให้แถบดีเอ็นเอต่างกันและเหมือนกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเบญจมาศคนละสายพันธุ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาดที่สำคัญ คือ ลองกอง ลางสาด และดูกู โดยวิธีการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก เปรียบเทียบความหนาแน่นและขนาดของปากใบ และหาปริมาณคลอโรฟิลล์
2. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชสกุลลางสาดรวมถึงสภาพที่เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอย่างใบเพื่อการสกัดดีเอ็นเอ
3. เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ RAPD

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. วัสดุพืช

ตัวอย่างใบลองกอง ลางสาด และดูกู โดยเก็บจากสถานที่ต่างๆ กันดังนี้

- แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- สวนเกษตรกร อ. ตันหยงมัส จ.นราธิวาส
- สวนเกษตรกร อ. ยะรัง จ.ปัตตานี

2. สารเคมี

- PVPP (Polyvinyl-polypyrrolidone)
- PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone) - NaCl
- Na_2EDTA (Disodiumethelenediaminetetraacetate)
- N-Laurylsarcosine
- Tris-HCl pH 8.0
- CTAB (Hexadecyltrimethyammonium bromid)
- β-mercaptoethanol
- SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- Isopropanol
- Ethanol
- Liqiud nitrogen
- dNTP (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP) (Promega, U.S.A.)
- Primer จำนวน 100 ชนิด (OPA-01-20, OPB-01-20, OPC-01-20 OPD-01-20, และ OPT-01-20) (Operon, U.S.A.)
- $MgCl_2$
- Taq Polymerase B (Promega, U.S.A.)
- 10 X Taq buffer

- Nusieve 3 : 1 agarose (FMC Bioproduct : U.S.A.)
- SeaKem agarose (FMC Bioproduct : U.S.A.)
- Tris base
- Boric acid
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- DNA ladder (100 bp และ 500 bp : Operon, U.S.A.)
- Glacial acetic acid
- λDNA
- Carmine
- HCl
- Ethanol
- 8-hydroxyquinoline
- Chloroform
- Ammonium acetate

อุปกรณ์

- เครื่องพีซีอาร์
- อุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซีส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงอุณหภูมิต่ำ
- เครื่องเขย่า (vortex)
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- ยูวีทรานสลูมิเนเตอร์
- โกร่งบดตัวอย่าง
- ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- ตู้แช่เยือกแข็ง -30 อาศาเซลเซียส
- ปิเปตปรับปริมาตรเป็นไมโครลิตร

- หลอดแอพเพนดอร์ฟ
- Pipette tips
- ตู้ไมโครเวฟ
- กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์
- Ocular micrometer
- Stage micrometer

วิธีการ

1. การศึกษาจำนวนชุดของโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด

1.1 การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก

นำต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู ที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาชนิดละ 3 ต้น เลี้ยงในสารละลายที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เพื่อกระตุ้นการสร้างรากใหม่ที่สมบูรณ์และสะอาด ตัดปลายรากลองกอง ลางสาด และดูกูที่เลี้ยงในสารละลายยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตรใส่ในหลอดแก้วซึ่งบรรจุสารละลายพรีทรีตเมนต์ คือ ไฮดรอกซีควิโนลีนเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำปลายรากออกจากสารละลายพรีทรีตเมนต์ใส่ลงในอะซีติกอัลกอฮอล์ (เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ กรดอะซีติก 100 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 3:1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำรากใส่ในหลอดแก้วที่มีกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เอาออกจากกรดไฮโดรคลอริคมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ใส่ลงในหลอดแก้วซึ่งมีอะซิโตคาร์มีน เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ที่เย็น 30 นาที เพื่อให้รากติดสีดีขึ้น ตัดปลายรากส่วนที่ติดสีแดงเข้มมาวางบนสไลด์ หยดกรดอะซิติก เข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด ใช้ปากคีบขยี้เนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปิด coverglass ลงบนแผ่นสไลด์บริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้ปลายดินสอด้านที่มียางลบเคาะเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว ใช้นิ้วหัวแม่มือกดให้เซลล์อยู่บนระนาบเดียวกัน นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ โดยใช้กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อตรวจหาเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟส ตรวจนับจำนวนโครโมโซม ในกรณีที่ต้องการเก็บรักษารากในระยะเวลานาน หลังจากแช่รากในอะซีติกอัลกอฮอล์แล้วเก็บรักษารากไว้ในเอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดซึ่งสามารถเก็บได้นาน 6-12 เดือน ทำการทดลองโดยนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากในแต่ละชนิดพืชอย่างน้อย 30 เซลล์ แล้วเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมที่ได้ในแต่ละชนิด

1.2. การศึกษาเปรียบเทียบความหนาแน่น และวัดขนาดของปากใบ

ตรวจสอบความหนาแน่นและวัดขนาดปากใบโดยการนำใบลองกอง ลางสาด และดูกู มาลอกเอาเนื้อเยื่อบางๆ ชั้นผิวนอกของหลังใบ วางเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ พร้อมกับหยดอะซิโตคาร์มีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ 1-2 หยด ปิดด้วย coverglass หาความหนาแน่นของปากใบด้วย heamacytometer โดยนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และวัดขนาดปากใบโดยใช้ stage micrometer และ ocular micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์กำลังขยาย 400 เท่า วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) ทำการทดลองโดยใช้ตัวอย่างละ 3 ต้นๆ ละ 3 ใบๆ ละ 4 จุด เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้ระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู ด้วยวิธี DMRT (Duncan' s multiple range test)

1.3 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี

เก็บใบลองกอง ลางสาด และดูกูที่มีอายุและสีใบใกล้เคียงกันมาตัวอย่างละ 5 ต้นๆ ละ 3 ใบ ตัดให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำมาบดให้ละเอียดในโกร่งร่วมกับแมกนีเซียมคาร์บอเนต ปริมาณ 0.5 กรัม และอะซิโตน เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมอะซิโตนที่ความเข้มข้นเดียวกันเพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมาปั่นที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนเก็บไว้ เพื่อนำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 647 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์เอ และ 664 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์บี นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรของ Inskeep และ Bloom (1985) อ้างโดย Jeff และคณะ (1996) ดังนี้

$$E = 17.90E_{647} + 8.08E_{664}$$

โดย E คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบี

E_{647} และ E_{664} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอและบีตามลำดับ

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกูเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 1.2

2. การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง

2.1 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง

นำใบลองกองที่มีอายุใกล้เคียงกันมาบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธี คือ

วิธีที่ 1 การใช้ CTAB บัฟเฟอร์ เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) โดยนำตัวอย่างที่บดละเอียดปริมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟขนาด 2 มิลลิลิตร เติม CTAB บัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8.0) เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์, NaCl เข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, PVP-40 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, CTAB เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในระหว่างบ่มกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุก 10 นาที นำหลอดมาวางที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน หากตะกอนที่ได้มีจำนวนน้อยนำหลอดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอลแช่เย็น เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย TE บัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 7.5) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ก่อนจะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ใหม่

วิธีที่ 2 การใช้แอมโมเนียมอะซีเตต นำตัวอย่างพืชบดละเอียดประมาณ 200 มิลลิกรัม ถ่ายใส่หลอดทดลองซึ่งมีสารละลายประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8.0) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมแอมโมเนียมอะซีเตต เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย

เอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนบนทิ้งไป เติม TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

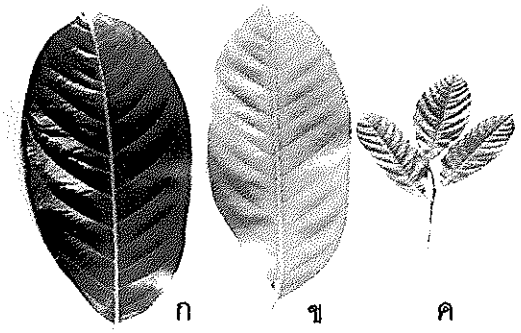
วิธีที่ 3 การใช้ ROSE บัฟเฟอร์ (rapid one step extraction) (Steiner *et al.*, 1995) นำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มี ROSE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8.0) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ Na_2EDTA (pH 8.0) เข้มข้น 312.5 มิลลิโมลาร์ PVPP เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ N-laurylsarcosine เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และดูดสารละลายส่วนบนซึ่งมีดีเอ็นเอผสมอยู่ ประมาณ 80-100 ไมโครลิตร เก็บเอาไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 4 พัฒนาโดย McDonald และคณะ (1994) นำตัวอย่างใบที่บดละเอียดประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Tris -- HCl (pH 7.5) เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์, NaCl เข้มข้น 288 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และ SDS เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยประมาณด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บน SeaKem LE agarose (FMC Bioproduct, U.S.A.) เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE (Tris acetic buffer ; Tris base, glacial acetic acid, Na_2EDTA pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอบนยูวีทรานสอิลูมิเนเตอร์ โดยเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ λDNA ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน เลือกวิธีการที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด เพื่อนำมาศึกษาในหัวข้อที่ 2.2 ต่อไป

2.2 ศึกษาอายุของใบลองกองที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบลองกองที่มีอายุต่างๆกัน คือ ใบอ่อน (อายุประมาณ 2 สัปดาห์หลังแตกใบอ่อน) ใบเพสลาด (อายุประมาณ 4 สัปดาห์หลังแตกใบอ่อน) และใบแก่ (อายุประมาณ 8 สัปดาห์หลังแตกใบอ่อน) (รูปที่ 1) มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.1 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีการในข้อ 2.1 เปรียบเทียบผลที่ได้ และเลือกอายุใบที่ให้ผลดีที่สุดมาศึกษาในหัวข้อ 2.3 ต่อไป



รูปที่ 1 ระยะพัฒนาการของใบที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
(ก) ใบแก่ (ข) ใบเพสลาด และ (ค) ใบอ่อน

2.3 ศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากใบที่เก็บรักษาด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน

สกัดดีเอ็นเอจากใบที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ กัน คือ ใบสด โดยสกัดดีเอ็นเอภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังเก็บมาจากต้น และใบที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, -30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 30 วัน ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น หลังจากนั้นจึงตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการทำพีซีอาร์ตามสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้ในหัวข้อที่ 3 โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03 (5' AGTCAGCCAC 3')

3. ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการทำพีซีอาร์

ทดสอบความเข้มข้นของสารที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม และให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน โดยใช้ดีเอ็นเอจากใบลองกอง ทำปฏิกิริยาด้วยปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร และใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งแนะนำโดย Drenth (1998) คือ ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่าปริมาตร 2 ไมโครลิตร จีโนมิคดีเอ็นเอ 40 นาโนกรัม

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส คือ Taq DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิตต่อปฏิกิริยา หลังจากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของแต่ละองค์ประกอบที่ระดับแตกต่างกัน คือ จีโนมิคดีเอ็นเอเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, และ 200 นาโนกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1, 2, 2.5, 3, 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้นชนิดละ 25, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase เข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2, และ 3 ยูนิตต่อปฏิกิริยา นำหลอดบรรจุสารดังกล่าวข้างต้นมาทำพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้ คือ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิเริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับส่วนของจีโนมิคดีเอ็นเอ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และ อุณหภูมิในขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 39 รอบ ขั้นที่ 2 ทำซ้ำตามอุณหภูมิ และเวลาในขั้นตอนแรกอีก 1 รอบ แต่เพิ่มเวลาในช่วงอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็น10 นาที (Drenth, 1998) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ คือ OPT-07 (5' TTGGCACGGG 3') เมื่อทดสอบความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆ ที่เหมาะสมแล้วจึงทำการทดสอบอุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับส่วนจีโนมิคดีเอ็นเอ 3 ระดับ คือ 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ Nusieve 3:1 agarose (FMC Bioproduct, U.S.A.) เข้มข้น 1.75 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE (Tris borate buffer ; Tris base, boric acid, Na_2EDTA pH 8.0). ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยมี Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล เลือกใช้สภาพและความเข้มข้นของสารที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ชัดเจนมาทดสอบในหัวข้อที่ 4. ต่อไป

4. การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู

นำตัวอย่างใบลองกอง ลางสาด และดูกู ชนิดละ 1 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอและทำพีซีอาร์ ตามสภาพเหมาะสมซึ่งได้จากหัวข้อที่ 3 เพื่อทดสอบไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 100 ชนิด (OPA-01-20, OPB-01-20, OPC-01-20, OPD-01-20, และ OPT-01-20 ; Operon, U.S.A.) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตของพีซีอาร์แตกต่างกันชัดเจนระหว่างพืชทั้ง 3 ชนิด จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างใบของพืชแต่ละชนิดจากสถานที่ต่างกัน คือ แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สวนเกษตรกรจังหวัด

นราธิวาสและปัตตานี ชนิดละ 12 ต้น (ตารางที่ 1) เพื่อใช้ทดสอบความแตกต่างระหว่างต้น และระหว่างกลุ่มของพืชดังกล่าว

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของตัวอย่างใบลองกอง ลางสาด และดูกูที่ใช้ในการศึกษา

ชนิด	สถานที่
ลองกอง	
ต้นที่ 1, 2, 3, 4	แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์
ต้นที่ 5, 6, 7, 8	สวนเกษตรกร จ. ปัตตานี
ต้นที่ 9, 10, 11, 12	สวนเกษตรกร จ. นราธิวาส
ลางสาด	
ต้นที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์
ต้นที่ 8, 9, 10, 11	สวนเกษตรกร จ. ปัตตานี
ต้นที่ 12	สวนเกษตรกร จ. นราธิวาส
ดูกู	
ต้นที่ 1, 2, 3, 4	แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์
ต้นที่ 5, 6, 7, 8	สวนเกษตรกร จ. ปัตตานี
ต้นที่ 9, 10, 11, 12	สวนเกษตรกร จ. นราธิวาส

หมายเหตุ - ในการคัดเลือกตัวอย่างใบลองกอง ลางสาด และดูกู คำนึงถึงลักษณะสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ดังนั้นจำนวนตัวอย่างในแต่ละสถานที่จึงไม่จำเป็นต้องเท่ากัน

- สำหรับการศึกษาในหัวข้อที่ 2, 3, และ 4 ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาจำนวนชุดของโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด

1.1 การตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก

จากการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า โครโมโซมของพืชสกุลนี้มีจำนวนมากและขนาดเล็ก ทำให้ได้เซลล์ที่โครโมโซมมีการกระจายตัวดีพอที่จะนับได้ในแต่ละชนิดมีค่อนข้างน้อย (ชนิดละ 5 เซลล์) ทำให้ยากที่จะระบุชัดเจนว่าแต่ละชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่าได จากจำนวน 5 เซลล์ที่ทำการตรวจนับ พบว่า ลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าลองกองและดูกู คือ ลางสาดมีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 137-144 แท่ง ส่วนลองกองและดูกู มีจำนวนโครโมโซมใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 121-129 แท่ง (รูปที่ 2)

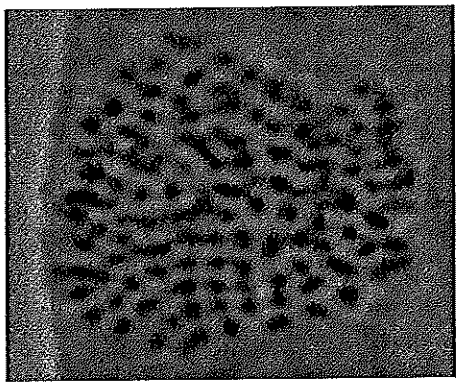
1.2 การเปรียบเทียบความหนาแน่นและวัดขนาดของปากใบ

จากการหาความหนาแน่นปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่าความหนาแน่นของจำนวนปากใบลองกอง ลางสาด และดูกูมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยลองกองมีความหนาแน่นปากใบมากที่สุด 27.83 ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร รองลงมา คือ ลางสาด 22.84 ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และดูกูมีความหนาแน่นปากใบน้อยที่สุด 22.12 ปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร (ตารางที่ 2) สำหรับขนาดของปากใบก็เช่นเดียวกัน พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยลองกองมีขนาดปากใบใหญ่ที่สุด 167.80 ไมโครเมตร รองลงมา คือ ลางสาด 158.14 ไมโครเมตร และดูกูมีขนาดปากใบเล็กที่สุด 137.54 ไมโครเมตร (ตารางที่ 3)

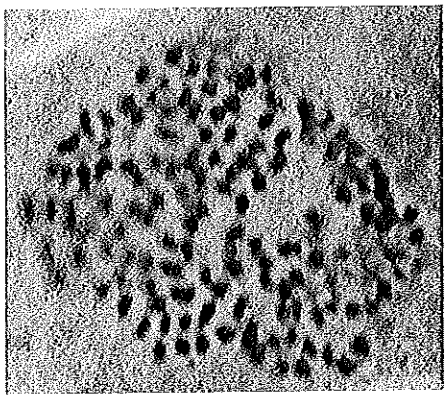
1.3 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี

เมื่อทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า ลางสาดมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงที่สุด 12.58 ไมโครกรัมต่อ 1 ตารางเซนติเมตร ส่วนลองกองและดูกูมีปริมาณคลอโรฟิลล์ใกล้เคียงกัน 10.42 ไมโครกรัมต่อ 1 ตารางเซนติเมตร และ 10.08 ไมโครกรัมต่อ 1 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามปริมาณคลอโรฟิลล์ของพืชทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

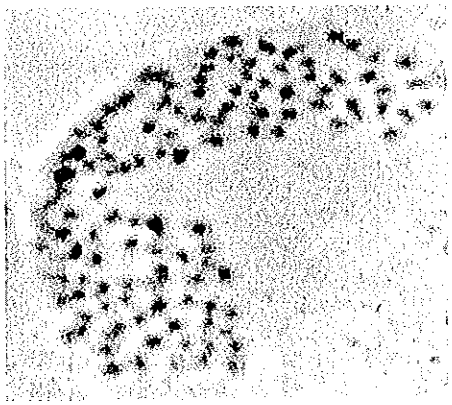
ก



ข



ค



รูปที่ 2 โครโมโซมของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ กำลังขยาย 1000 เท่า

ตารางที่ 2 ความหนาแน่นปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกู

ชนิด	ความหนาแน่นของปากใบ (จำนวนปากใบต่อพื้นที่1 ตารางมิลลิเมตร)
ลองกอง	27.83[a]
ลางสาด	22.84[b]
ดูกู	22.12[b]
F-test	*
C.V. (%)	11.20

*: มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.05)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 ขนาดปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกู

ชนิด	ขนาดปากใบ (ไมโครเมตร)
ลองกอง	167.80[a]
ลางสาด	158.14[ab]
ดูกู	137.54[b]
F-test	**
C.V. (%)	7.84

** : มีความแตกต่างกันทางวงสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P=0.01)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีที่สกัดได้จากลองกอง ลางสาด และดูกู

ชนิด	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร)
ลองกอง	10.42
ลางสาด	12.58
ดูกู	10.08
F-test	ns
C.V. (%)	11.43

ns : ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2. การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง

2.1 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง

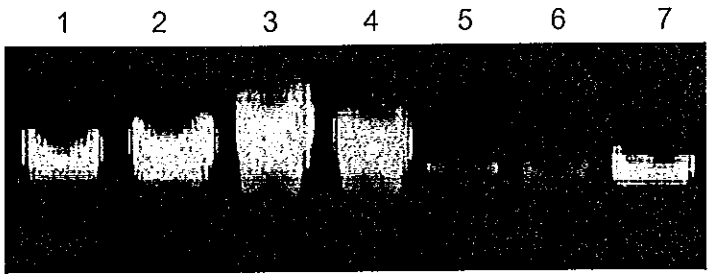
จากการนำใบลองกองมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดและสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธีการ แต่ละวิธีให้ผลดังนี้ คือ การสกัดดีเอ็นด้วย CTAB บัฟเฟอร์ พบว่าในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล สังเกตเห็นเส้นสายดีเอ็นเอได้ชัดเจน และเมื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ได้ตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่น ละลายใน TE บัฟเฟอร์ได้ง่าย จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อประมาณค่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่ามีดีเอ็นเอประมาณ 15-20 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด

การสกัดดีเอ็นเอด้วยแอมโมเนียมอะซีเตต พบว่าในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล นั้นสังเกตเห็นเส้นสายดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มีสีน้ำตาลและละลายใน TE บัฟเฟอร์ ได้ยาก จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด

การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ROSE บัฟเฟอร์ พบว่าเมื่อวางส่วนผสมของใบที่บดละเอียดกับบัฟเฟอร์ทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบน (ประมาณ 80-100 ไมโครลิตร) สีเขียวซึ่งมีดีเอ็นเอผสมอยู่ และมักมีการปนเปื้อนของเศษใบ จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีดีเอ็นเอประมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการดัดแปลงของ McDonald และคณะ (1994) จากการสังเกตพบว่าในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอลไม่มีเส้นสายดีเอ็นเอ แต่เมื่อทำการปั่นตกตะกอนได้ตะกอนสีน้ำตาลเข้มและปริมาณดีเอ็นเอมีน้อยมาก คือ น้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด

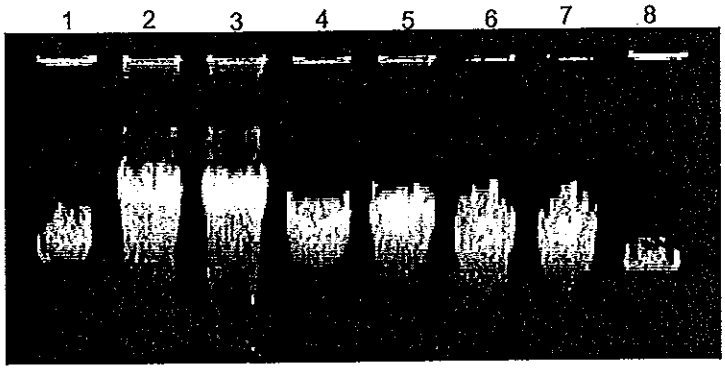
จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า การสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกองด้วยวิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ เป็นวิธีการที่ให้ดีเอ็นเอสะอาดและมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ การใช้แอมโมเนียมอะซีเตต ส่วนวิธีการใช้ ROSE บัฟเฟอร์และวิธีการของ McDonald และคณะ (1994) นั้นให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ (รูปที่ 3) ดังนั้นในการศึกษาถึงอายุของใบลองกองที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ การศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากใบที่เก็บรักษา และการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการทำพีซีอาร์ จึงเลือกใช้วิธีการดังกล่าวนี้ในการสกัดดีเอ็นเอ



รูปที่ 3 ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 4 วิธีการ คือ วิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ (lane 3) วิธีการใช้แอมโมเนียมอะซีเตต (lane 4) วิธีการใช้ ROSE บัฟเฟอร์ (lane 5) และวิธีการของ McDonald และคณะ (lane 6) lane 1, 2 และ 7 เป็น λDNA ขนาด 100, 200 และ 50 นาโนกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร ตามลำดับ

2.2 ศึกษาอายุของใบลองกองที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกองที่มีอายุแตกต่างกัน คือ ใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ใบอ่อนให้ปริมาณดีเอ็นเอได้สูงสุด คือ ประมาณ 30 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบเพสลาด และใบแก่ มีปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด (รูปที่ 4) แต่เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จากใบอ่อนในบางครั้งตะกอนมักมีสีน้ำตาลปะปนเล็กน้อยโดยเฉพาะเมื่อเก็บมาแล้วยังไม่สามารถทำการสกัดดีเอ็นเอได้ทันที ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอของใบลองกองควรใช้ใบเพสลาดหรือใบแก่เพราะให้ตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่น สะอาด และมีปริมาณดีเอ็นเอมากพอต่อการทำพีซีอาร์หลายครั้ง



รูปที่ 4 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบที่มีระยะพัฒนาการต่างกัน 3 ระยะ คือ ใบอ่อน (lane 2 และ 3) ใบเพสลาด (lane 4 และ 5) ใบแก่ (lane 6 และ 7)) lane 1 และ 8 เป็น λDNA ขนาด 200 และ 100 นาโนกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร ตามลำดับ

2.3 ศึกษาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอจากใบที่เก็บรักษาด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน

นำใบเพสลาดของลองกองมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ กัน พบว่า การเก็บรักษาใบที่อุณหภูมิห้องมีปริมาณดีเอ็นเอลดลงตามจำนวนวันที่เก็บรักษา กล่าวคือ ใบที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 และ 3 วัน ยังคงสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ โดยใบที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน มีปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกับใบสดและมีสีขาวขุ่น แต่เมื่อเก็บรักษาไป 3 วัน พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัด จนกระทั่งการเก็บรักษาที่ 5-30 วัน พบว่า ได้ตะกอนสีน้ำตาลแทนที่จะได้ตะกอนสีขาวขุ่นและสีน้ำตาลของตะกอนจะมากขึ้นตามจำนวนวันที่เก็บรักษา (ตารางที่ 5) เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากตะกอนเหล่านี้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่า มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยลงเป็นลำดับ (รูปที่ 5) โดยเฉพาะหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วันไปแล้วจะไม่สามารถสกัดดีเอ็นได้เลย และจากการทำพีซีอาร์เพื่อทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ พบว่า ใบที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 วันเท่านั้นที่สามารถให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพเพียงพอสำหรับการทำพีซีอาร์ (รูปที่ 6)

การเก็บรักษาใบลองกองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณดีเอ็นเอลดลงตามจำนวนวันที่เก็บรักษาเช่นกัน แต่ยังคงสามารถสกัดดีเอ็นเอได้แม้เก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน (รูปที่ 5) แต่อย่างไรก็ตามจากทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำพีซีอาร์ พบว่า ใบที่เก็บรักษา 1 และ 3 วัน เท่านั้นที่สามารถให้ดีอ็นเอที่มีคุณภาพเพียงพอสำหรับการทำพีซีอาร์ (รูปที่ 7) เนื่องจากตะกอนดีเอ็นเอเริ่มมีสีน้ำตาลเมื่อเก็บรักษาใบที่ 5 วัน (ตารางที่ 5)

การเก็บรักษาใบลองกองที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส พบว่ายังคงให้ตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่นแม้เก็บรักษาไปแล้ว 30 วัน เมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษาไม่แตกต่างกับปริมาณดีเอ็นเอเมื่อเก็บรักษา 1 วัน และใบสด (รูปที่ 5) และจากการทำพีซีอาร์เพื่อทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากใบซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลาตั้งแต่ 1-30 วัน ยังคงมีคุณภาพเพียงพอสำหรับการทำพีซีอาร์ (รูปที่ 8)

ตารางที่ 5 สีใบ เส้นสายดีเอ็น และตะกอนดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นจากใบลองกองที่เก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

วันที่เก็บ	สีใบ			เส้นสายดีเอ็นเอ[x]			การเกิดตะกอนสีน้ำตาล		
รักษา	RT	4^0C	-30^0C	RT	4^0C	-30^0C	RT	4^0C	-30^0C
1	เขียว	เขียว	เขียว	P	P	P	-	-	-
3	น้ำตาล	เขียว	เขียว	B	P	P	+	-	-
5	น้ำตาล	น้ำตาล	เขียว	A	B	P	++	+	-
7	น้ำตาล	น้ำตาล	เขียว	A	B	P	++	++	-
14	น้ำตาล	น้ำตาล	เขียว	A	B	P	+++	++	-
30	น้ำตาล	น้ำตาล	เขียว	A	A	P	++++	++	-

RT หมายถึง อุณหภูมิห้อง

x หมายถึง ลักษณะของเส้นสายดีเอ็นเอที่ได้ในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล

P หมายถึง สังเกตเห็นเส้นสายดีเอ็นเอเป็นสายต่อเนื่องในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ไอโซโพรพานอล

B หมายถึง สังเกตเห็นเส้นสายดีเอ็นเอเป็นสายสั้นๆ ในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล

A หมายถึง ไม่พบเส้นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ไอโซโพรพานอล

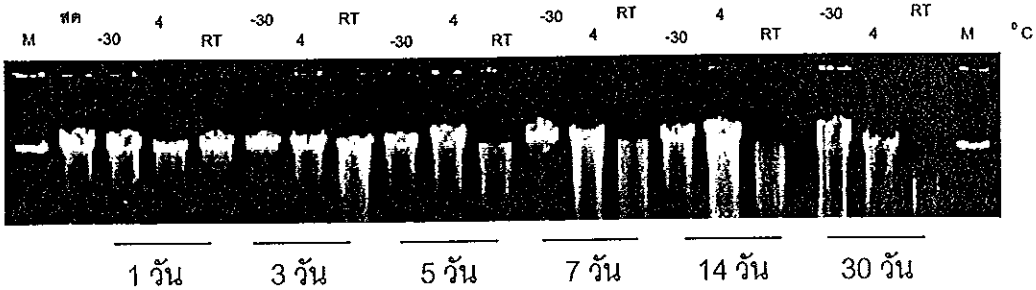
\- หมายถึง ตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่น

\+ หมายถึง ตะกอนดีเอ็นเอมีสีน้ำตาลปะปนเล็กน้อย

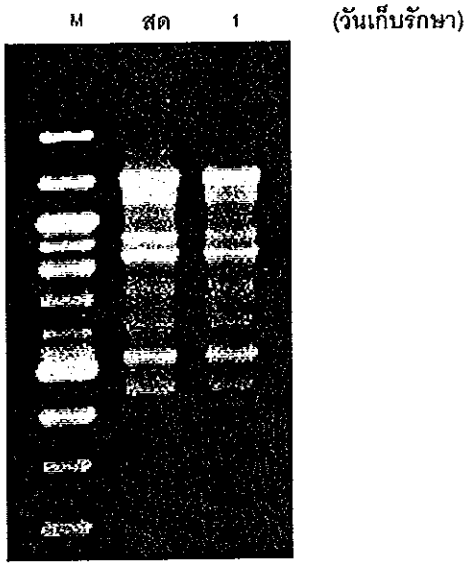
++ หมายถึง ตะกอนดีเอ็นเอสีน้ำตาลจาง

+++ หมายถึง ตะกอนดีเอ็นเอสีน้ำตาลเข้ม

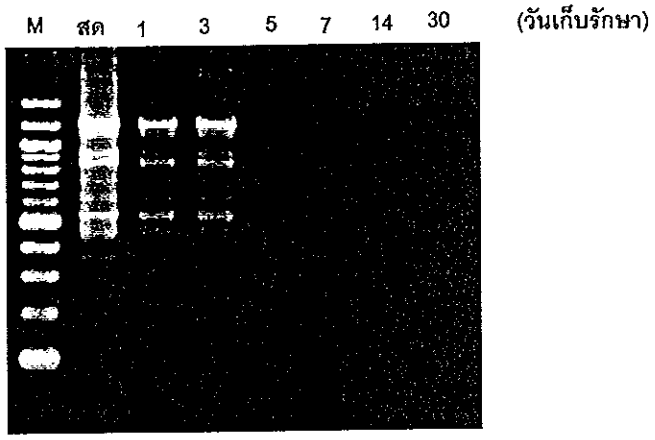
++++ หมายถึง ตะกอนดีเอ็นเอสีน้ำตาลเข้มมาก



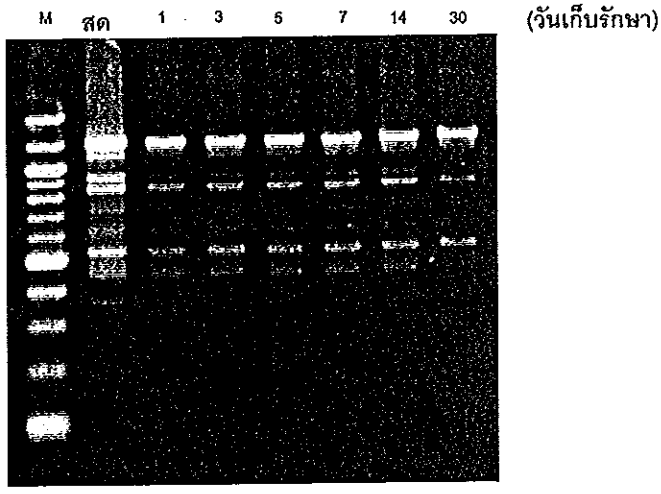
รูปที่ 5 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (RT) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (4) และอุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส (-30) เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 30 วัน, M คือ λDNA ขนาด 80 นาโนกรัมต่อ 2 ไมโครลิตร



รูปที่ 6 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, M คือ Ladder DNA (100 คู่เบส)



รูปที่ 7 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, M คือ Ladder DNA (100 คู่เบส)



รูปที่ 8 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, M คือ Ladder DNA (100 คู่เบส)

3. ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการทำพีซีอาร์

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารต่างๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการทำพีซีอาร์ ทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07 และใช้ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร พบว่า ความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอ 20, 40, 60 และ 80 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนและไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนที่ความเข้มข้นสูง (100-200 นาโนกรัม) หรือต่ำกว่านี้ (5-10 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา) ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไม่มีความชัดเจน ดังนั้นในการทำพีซีอาร์จึงเลือกใช้จีโนมิคดีเอ็นเอความเข้มข้น 40 นาโนกรัม (รูปที่ 9)

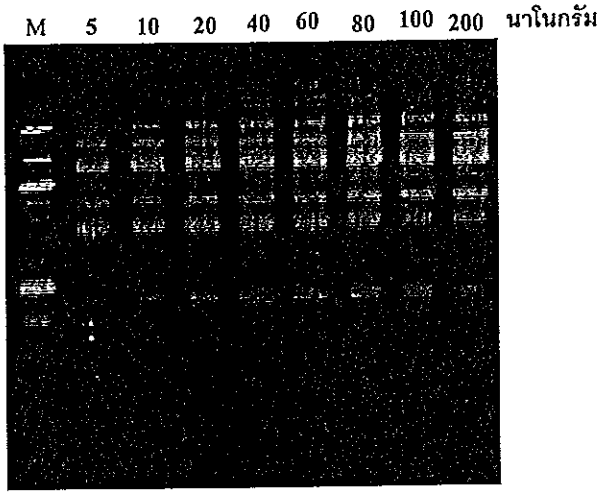
ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.3 และ 0.4 ไมโครโมลาร์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้สมบูรณ์และชัดเจนโดยที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครโมลาร์ มีแถบดีเอ็นเอบางแถบหายไป นอกจากนี้แล้วที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 ไมโครโมลาร์ มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้นมา 1 แถบ ส่วนที่ความเข้มข้นสูง 0.5 และ 0.6 ไมโครโมลาร์ พบว่า แถบดีเอ็นเอบางแถบจะเห็นไม่ชัดเจนหรือหายไปเช่นกัน (รูปที่ 10)

ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตชนิดละ 100, 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด ดังนั้นในการทำพีซีอาร์จึงเลือกใช้นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นต่ำ (25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์) และสูงกว่านี้ (250 และ 300 ไมโครโมลาร์) ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนและขาดหายไปบางแถบ (รูปที่ 11)

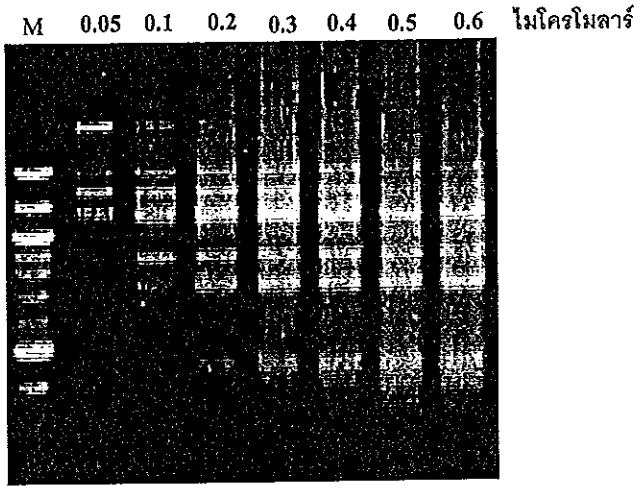
ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด โดยที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ และสูง 4.0 มิลลิโมลาร์ ให้ในแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนและขาดหายไปโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีดีเอ็นเอเพียง 2 แถบเท่านั้น (รูปที่ 12)

ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase 1.5, 2.0 และ 3 ยูนิต ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจน และที่ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase ต่ำ คือ 1 ยูนิตต่อปฏิกิริยา ส่งผลให้ดีเอ็นเอ 2 แถบสุดท้ายหายไป (รูปที่ 13)

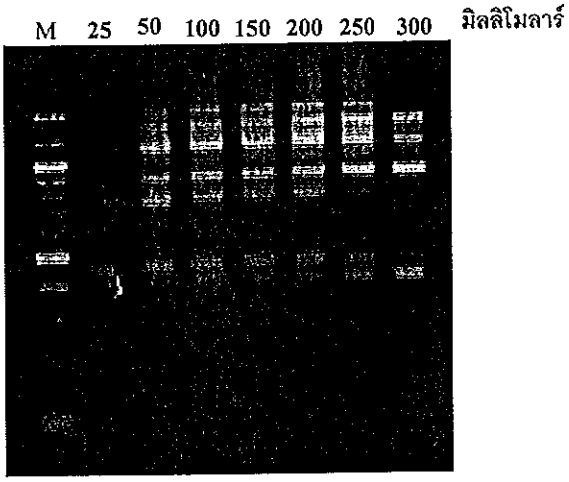
อุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับจีโนมิคดีเอ็นเอที่ 37 องศาเซลเซียส ในการทำพีซีอาร์ให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนที่สุด โดยที่อุณหภูมิสูง 45 และ 55 องศาเซลเซียส ทำให้ดีเอ็นเอบางแถบหายไปและมีความชัดเจนน้อยกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 14)



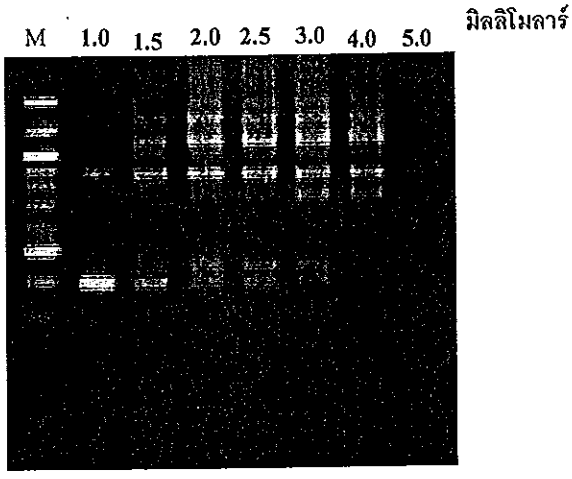
รูปที่ 9 ความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด100 คู่เบส



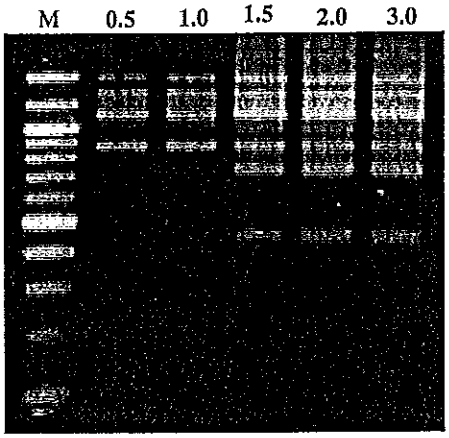
รูปที่ 10 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด100 คู่เบส



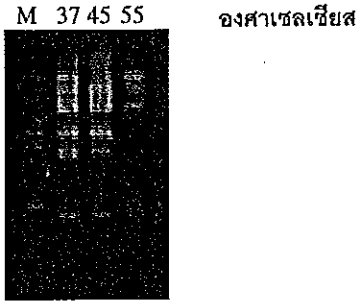
รูปที่ 11 ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด100 คู่เบส



รูปที่ 12 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด100 คู่เบส



รูปที่ 13 ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase ต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด100 คู่เบส



รูปที่ 14 ผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกันในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับส่วนของจีโนมิคดีเอ็นเอต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ OPT-07, M คือ Ladder DNA ขนาด100 คู่เบส

4. การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู

ในการใช้ไพรเมอร์ 100 ชนิด เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 11 ชนิดไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และ 89 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยในจำนวนนี้มีไพรเมอร์ 25 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน (monomorphism) ระหว่างพืชทั้งสามชนิด 17 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน และพบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน (polymorphism) ระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกูจำนวน 47 ชนิด อย่างไรก็ตามมีไพรเมอร์เพียง 10 ชนิดเท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มของลองกอง ลางสาด และดูกูได้อย่างชัดเจน คือ OPA-10, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 และ OPT-08 (ตารางที่ 6) โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จากลองกอง ลางสาด และดูกูมีทั้งหมด 146 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 255 - 2,800 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 74 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่ต่างกัน 72 แถบ โดยไพรเมอร์ OPC-05 ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 12 แถบ ในขณะที่ OPC-04 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด คือ 19 แถบ โดยเฉลี่ยแต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอ 14.6 แถบ

ตารางที่ 6 ลำดับเบสของไพรเมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD ในกลุ่มของลองกอง ลางสาด และดูกู

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' → 3'	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง
OPA-10	CAGGCCCTTC	14	5
OPB-04	GGACTGGAGT	13	5
OPB-07	GGTGACGCAG	16	12
OPC-04	CCGCATCTAC	19	15
OPC-05	GATGACCGCC	12	3
OPC-08	TGGACCGGTG	14	8
OPD-01	ACCGCGAAGG	14	8
OPD-03	GTCGCCGTCA	14	9
OPT-01	GGGCCACTCA	12	3
OPT-08	AACGGCGACA	18	6

ตารางที่ 7 ลำดับเบสของไพรเมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD ในกลุ่มลางสาด

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' ⟶ 3'	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง
OPA-10	CAGGCCCTTC	13	11
OPB-04	GGACTGGAGT	11	7
OPB-07	GGTGACGCAG	13	11
OPC-04	CCGCATCTAC	10	7
OPC-05	GATGACCGCC	12	7
OPC-08	TGGACCGGTG	13	11
OPD-01	ACCGCGAAGG	12	10
OPD-03	GTCGCCGTCA	12	10
OPT-01	GGGCCACTCA	10	8
OPT-08	AACGGCGACA	15	12

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของไพรเมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD ในกลุ่มดูกู

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' ⟶ 3'	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง
OPA-10	CAGGCCCTTC	12	10
OPB-04	GGACTGGAGT	12	8
OPB-07	GGTGACGCAG	13	11
OPC-04	CCGCATCTAC	15	11
OPC-05	GATGACCGCC	11	6
OPC-08	TGGACCGGTG	12	11
OPD-01	ACCGCGAAGG	12	11
OPD-03	GTCGCCGTCA	10	5
OPT-01	GGGCCACTCA	11	8
OPT-08	AACGGCGACA	18	10

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPA-10 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 14 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 325 - 1,700 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 5 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 9 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 7) โดยลางสาดต้นที่ 10 และ 11 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันและลางสาดต้นที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 3 (รูปที่ 15) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 10 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 8) โดยดูกูต้นที่ 6 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 8 และดูกูต้นที่ 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 (รูปที่ 15)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPB-04 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 400 - 2,800 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 5 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 8 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 7 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 4 แถบ (ตารางที่ 7) ลางสาดต้นที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 3 ส่วนลางสาดต้นที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 10 และ 11 โดยลางสาดต้นที่ 2 และ 3 มีแถบดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 600 คู่เบส ทำให้ต่างจากลางสาดต้นที่ 4, 10 และ 11 ซึ่งไม่มีแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (รูปที่ 16) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 8 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 4 แถบ (ตารางที่ 8) โดยดูกูต้นที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 4 ดูกูต้นที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 6, 7 และ 8 และดูกูต้นที่ 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 (รูปที่ 16)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPB-07 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 16 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 350 - 1,650 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 12 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 4 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 7) ลางสาดต้นที่ 1 เป็นต้นเดียวที่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 600 คู่เบส ลางสาดต้นที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 3 และลางสาดต้นที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 10 และ 11 (รูปที่ 17) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 8) โดยพบว่า ดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,400 และ 1,225 คู่เบส พบเฉพาะในดูกูต้นที่ 10 เช่นเดียวกับดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,650 และ 600 คู่เบส พบเฉพาะในดูกูต้นที่ 12 และต้นที่ 3 ตามลำดับ ส่วนดูกูต้นที่ 5, 6, 7 และ 8 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (รูปที่ 17)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPC-04 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 490 - 1,400 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 15 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 4 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 7 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 3 แถบ (ตารางที่ 7) โดยลางสาดต้นที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 3 ลางสาดต้นที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 10 และ 11 และลางสาดต้นที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 6 (รูปที่ 18) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 4 แถบ (ตารางที่ 8) ดูกูต้นที่ 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 และ ดูกูต้นที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 6, 7 และ 8 (รูปที่ 18)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPC-05 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 550 - 1,850 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 3 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 9 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 7 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 5 แถบ (ตารางที่ 7) ลางสาดต้นที่ 1 และ 12 มีแถบดีเอ็นเอต่างจากลางสาดต้นอื่นๆ คือ ลางสาดต้นที่ 1 มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 660 คู่เบส ส่วนลางสาดต้นที่ 12 มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,550 และ 1,450 คู่เบส และลางสาดต้นที่ 2 และ 3 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน นอกจากนี้ พบว่าลางสาดต้นที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 8, 9, 10 และ 11 (รูปที่ 19) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 6 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 5 แถบ (ตารางที่ 8) โดยดูกูต้นที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 6, 7 และ 8 และต่างจากต้นอื่นๆ เนื่องจากมีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,550 คู่เบส และดูกูต้นที่ 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 (รูปที่ 19)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPC-08 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 450 - 2,000 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 3 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 9 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 7) ลางสาดต้นที่ 1 เป็นลางสาดต้นเดียวที่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,700 คู่เบส แต่ไม่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 530 คู่เบส ในขณะที่ลางสาดต้นที่ 6 และ 8 มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,400 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนลางสาดต้นอื่นๆ พบว่าลางสาดต้นที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 10 และ 11 (รูปที่ 20) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มี

น้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 1 แถบ (ตารางที่ 8) โดยพบว่า สามารถแยกดูกูต้นที่ 3 ต่างจากดูกูต้นอื่นๆ ด้วยดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 900 คู่เบส ซึ่งมีเฉพาะในดูกูต้นที่ 3 ส่วนดูกูต้นอื่นๆ พบว่า ดูกูต้นที่ 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 และดูกูต้นที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 6, 7 และ 8 (รูปที่ 20)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPD-01 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 14 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 600 - 2,250 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 8 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 6 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 8 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 7) ลางสาดต้นที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 11 และลางสาดต้นที่ 8 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 10 (รูปที่ 21) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 11 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 1 แถบ (ตารางที่ 8) ดูกูต้นที่ 4 ต่างจากดูกูต้นอื่นๆ ในกลุ่มเนื่องจากไม่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,350 คู่เบส เช่นเดียวกับดูกูต้นที่ 9 และ 11 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันและต่างจากดูกูต้นอื่นๆ เนื่องจากไม่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 650 คู่เบส ดูกูต้นที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 7 และดูกูต้นที่ 6 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 8 (รูปที่ 21)

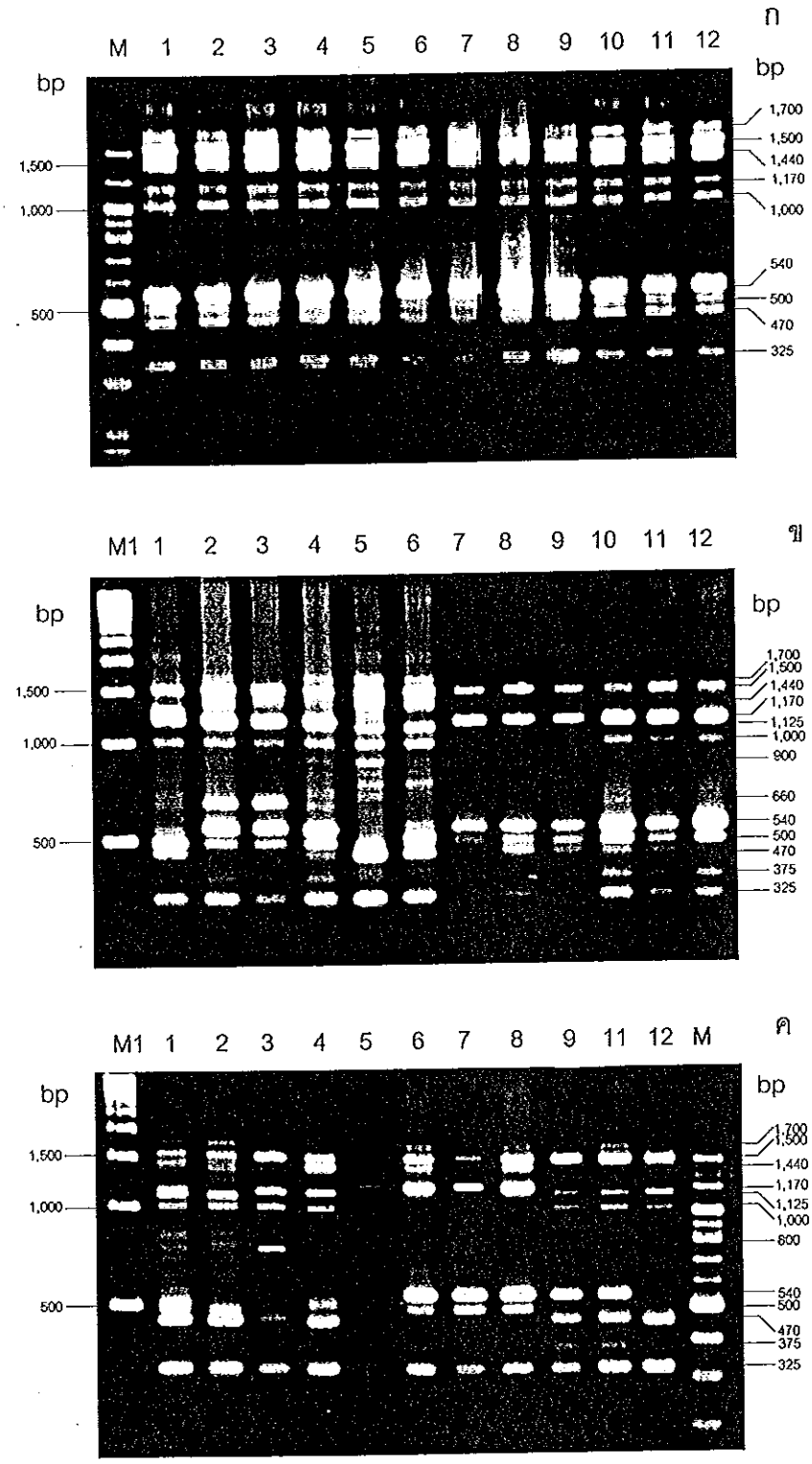
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPD-03 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 14 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 580 - 1,800 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 9 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 5 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 10 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 7) โดยพบว่าลางสาดต้นที่ 4, 10 และ 11 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (รูปที่ 22) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 5

แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 5 แถบ (ตารางที่ 8) ดูกูต้นที่ 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 ดูกูต้นที่ 5, 6, 7 และ 8 ทั้ง 4 ต้นนี้มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกตำแหน่ง คือ ดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 1,800, 1,500, 1,000, 900, 750, 650 และ 600 คู่เบส นอกจากนี้พบว่าดูกูต้นที่ 1 เป็นดูกูต้นเดียวที่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 580 คู่เบส ทำให้ต่างจากดูกูต้นอื่นๆ รวมทั้งต่างจากกลุ่มของลองกองและลางสาดด้วย (รูปที่ 22)

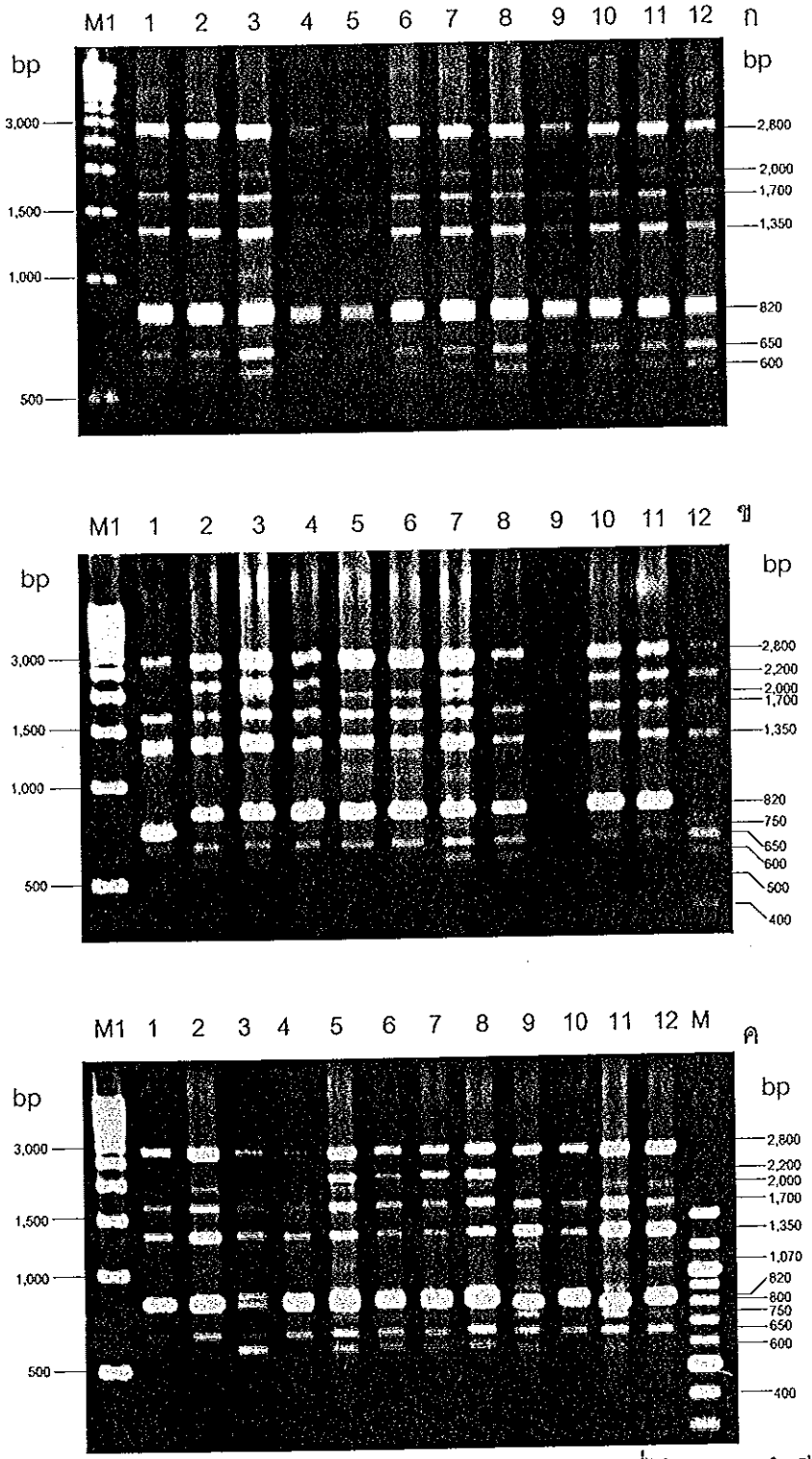
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPT-01 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 380 - 1,800 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 3 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 9 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 8 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 2 แถบ (ตารางที่ 7) ลางสาดต้นที่ 2 และ 3 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน และลางสาดต้นที่ 4 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 10 และ 11 (รูปที่ 23) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 5 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 5 แถบ (ตารางที่ 8) โดยดูกูต้นที่ 2 ต่างจากดูกูต้นอื่นๆ เนื่องจากเป็นต้นเดียวที่ไม่มีดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 700 คู่เบส ดูกูต้นที่ 5, 6, 7 และ 8 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน ส่วนดูกูต้นที 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 (รูปที่ 23)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPT-08 พบว่า มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 18 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 255 - 1,700 คู่เบส จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 6 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 12 แถบ (ตารางที่ 6) โดยกลุ่มของลองกองให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่ได้ภายในกลุ่มของลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้น ในกลุ่มของลางสาด พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 12 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 3 แถบ (ตารางที่ 7) ลางสาดต้นที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 3 และลางสาดต้นที่ 4 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 10 (รูปที่ 24) ส่วนในกลุ่มของดูกู พบว่า มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 18

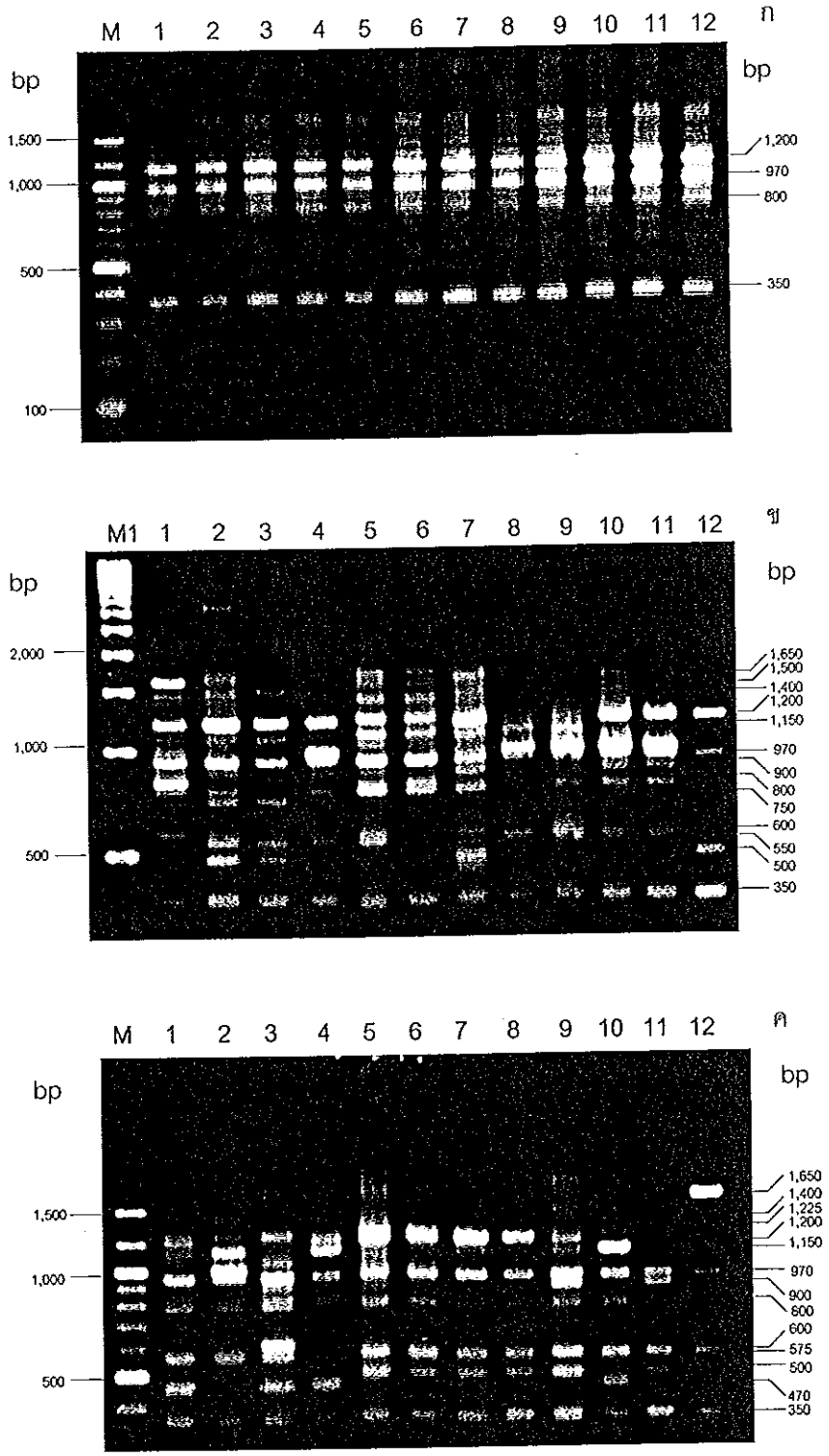
แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 10 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 8 แถบ (ตารางที่ 8) ดูกูต้นที่ 9 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 11 และดูกูต้นที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับดูกูต้นที่ 6, 7 และ 8 (รูปที่ 24)



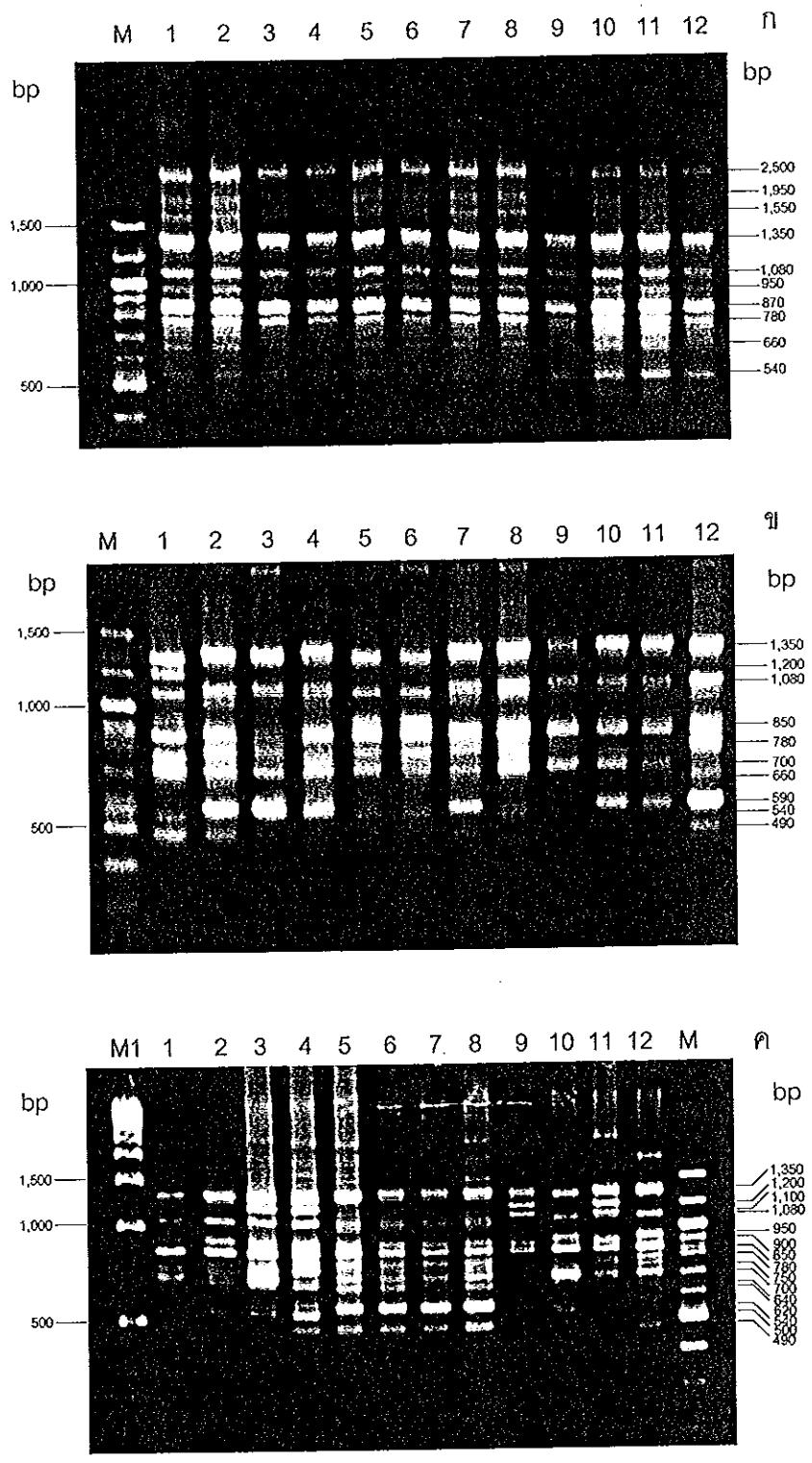
รูปที่ 15 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ



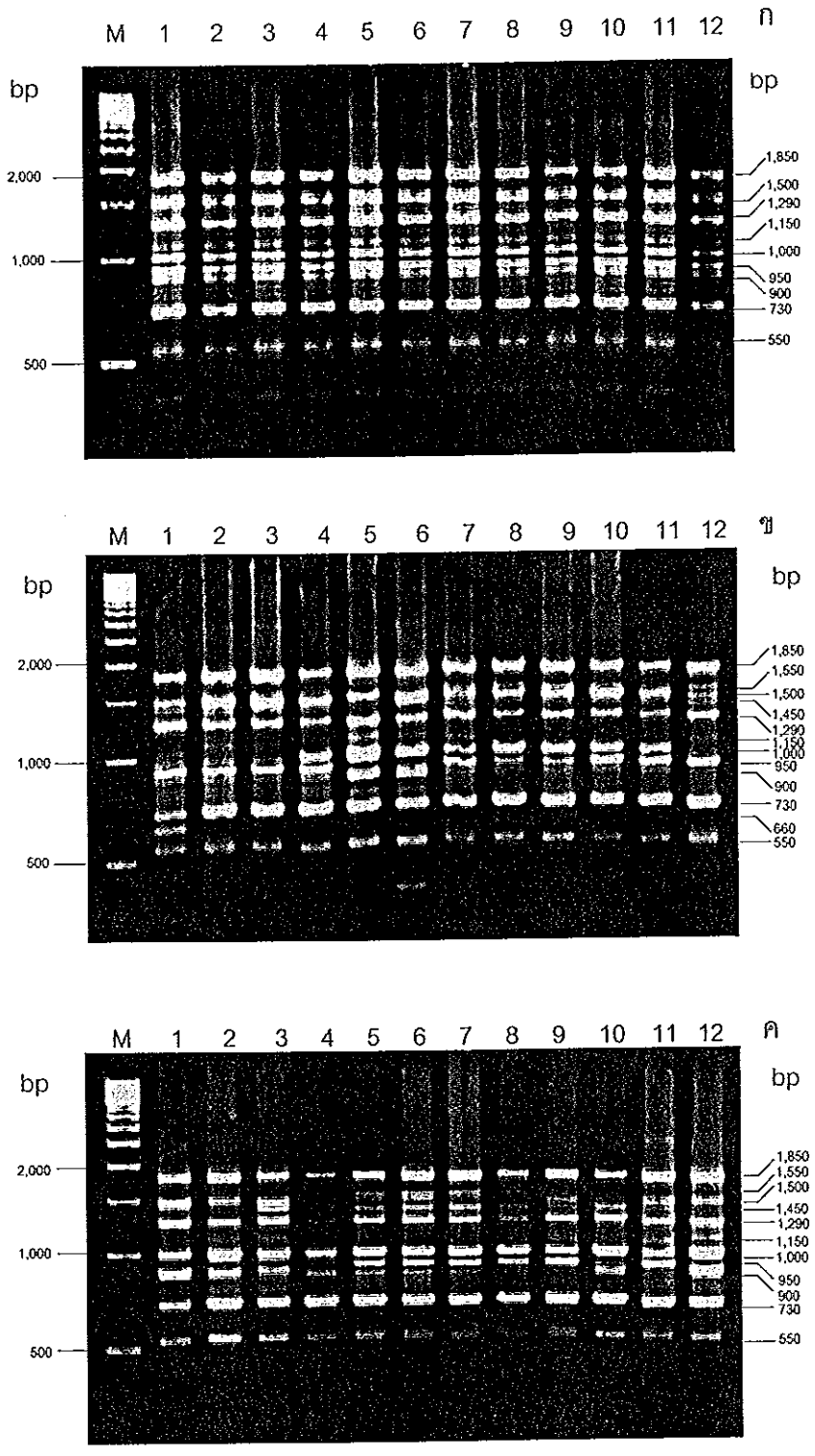
รูปที่ 16 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPB-04 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ



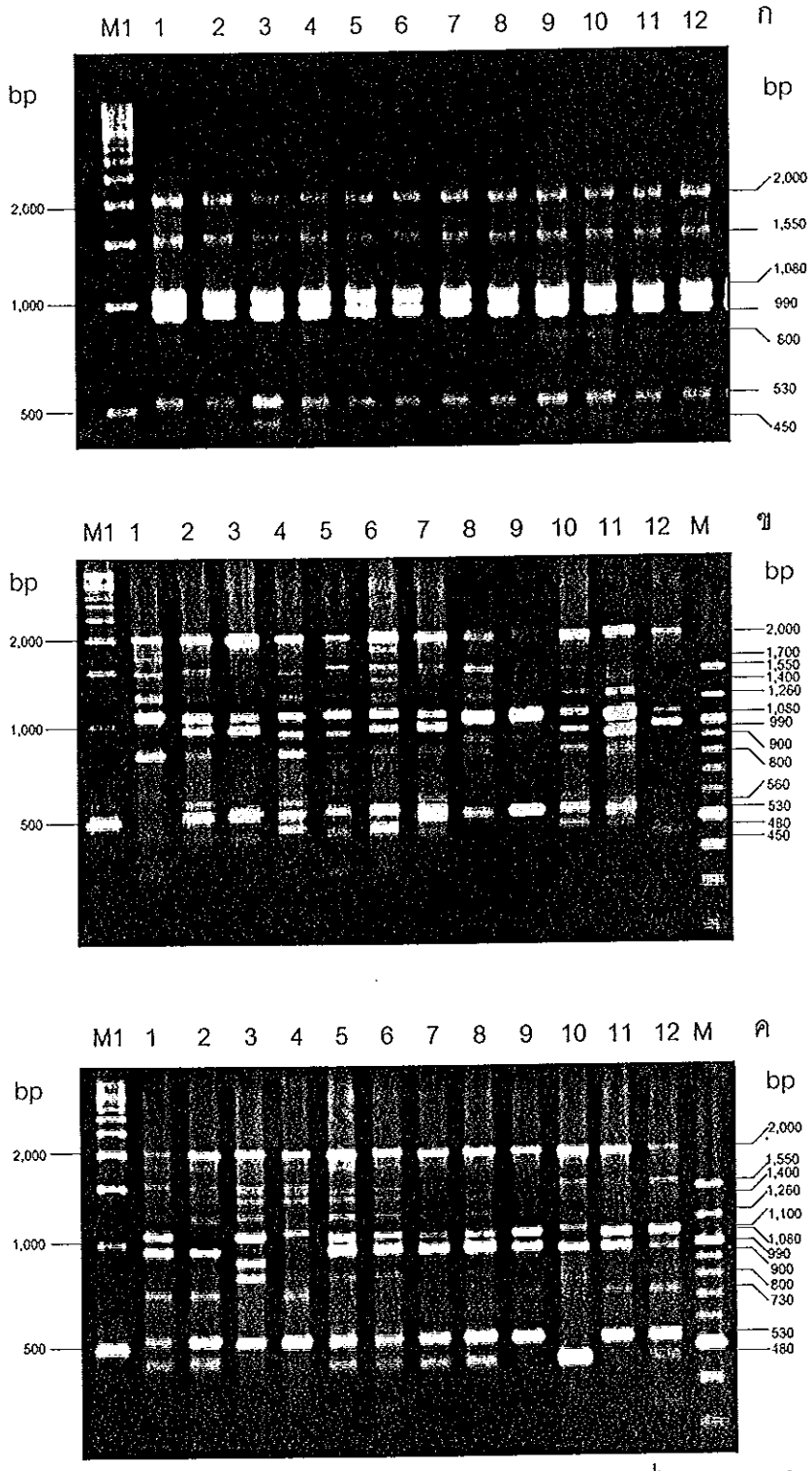
รูปที่ 17 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPB-07 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ



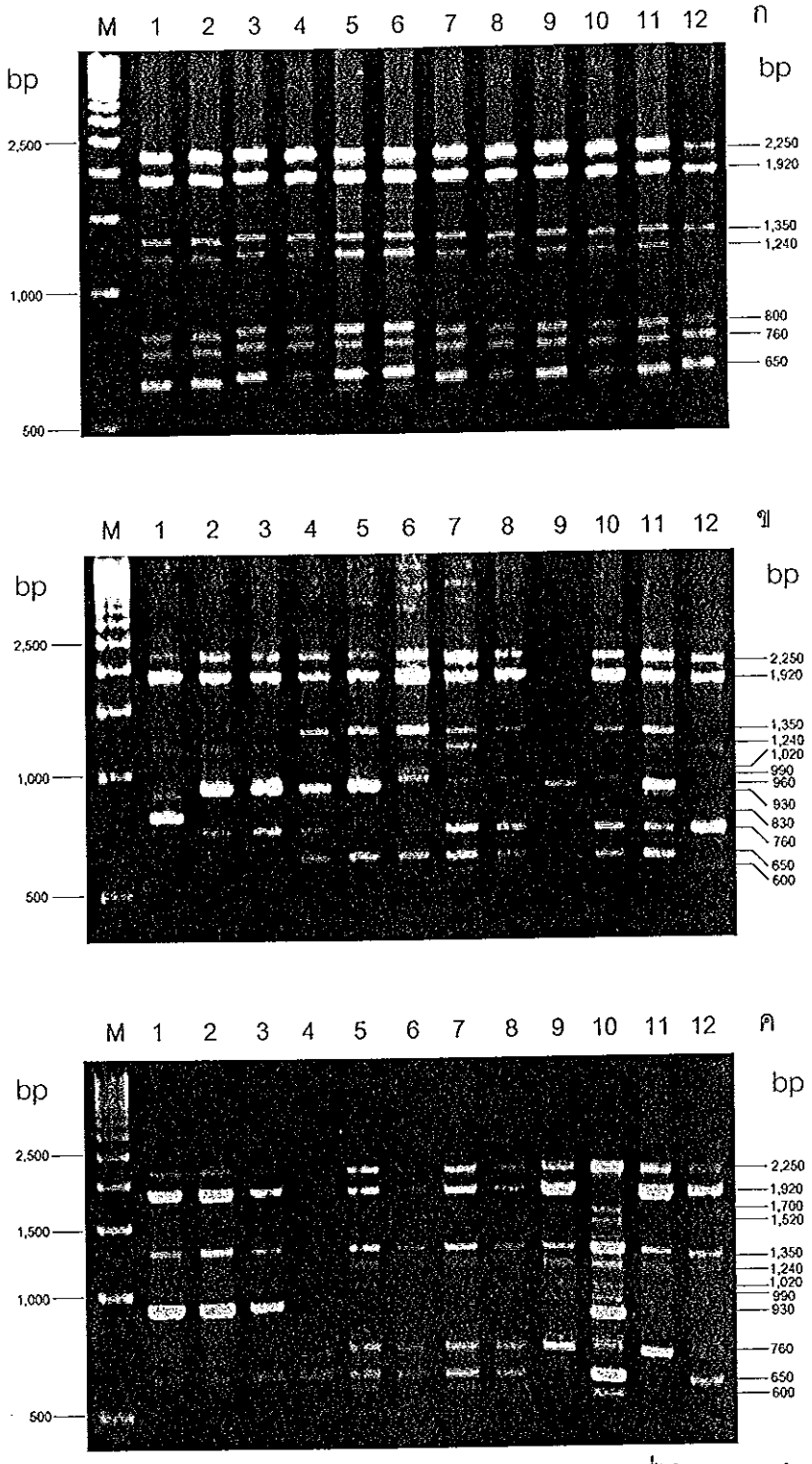
รูปที่ 18 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-04 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ



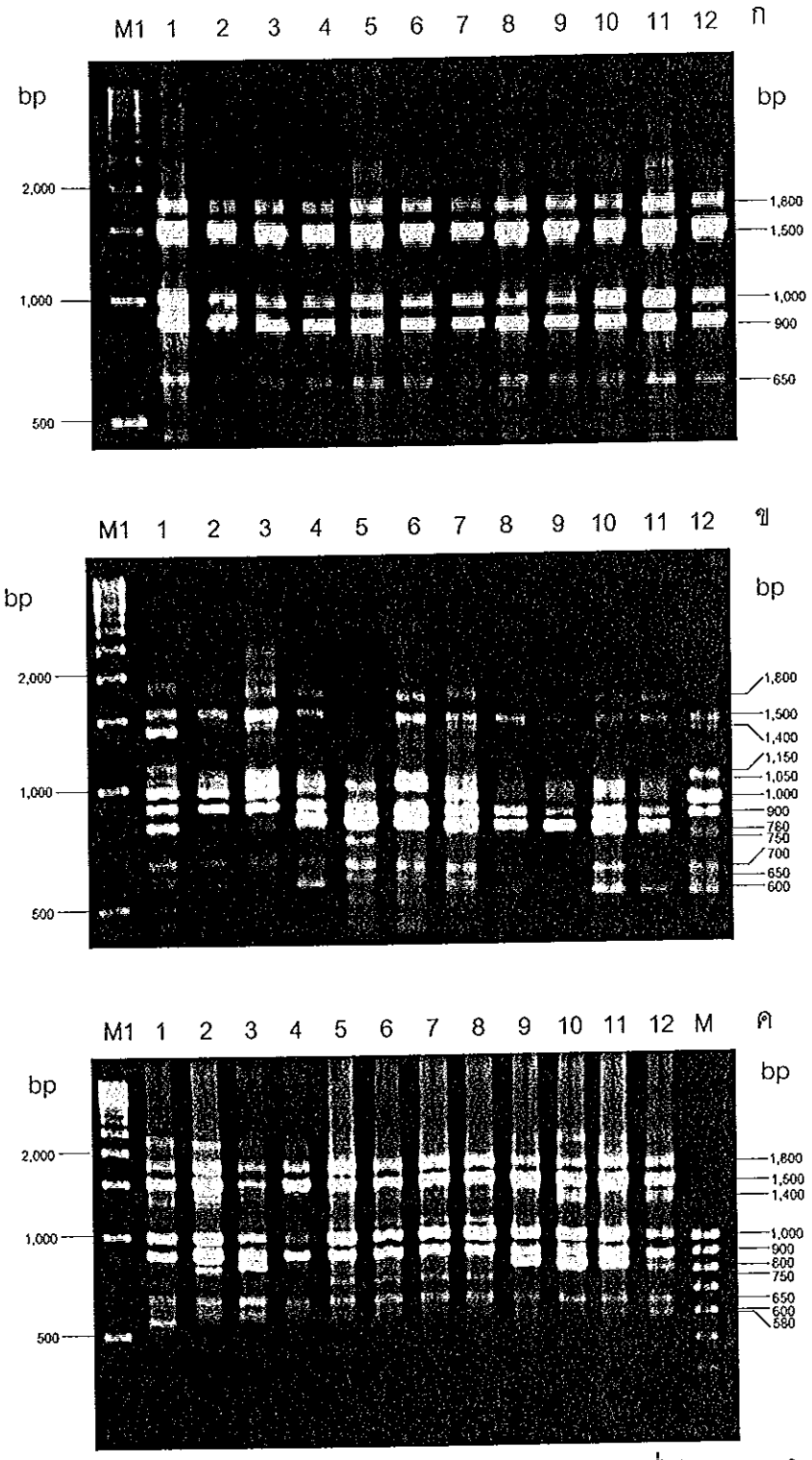
รูปที่ 19 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-05 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M คือ Ladder DNA ขนาด 500 คู่เบส



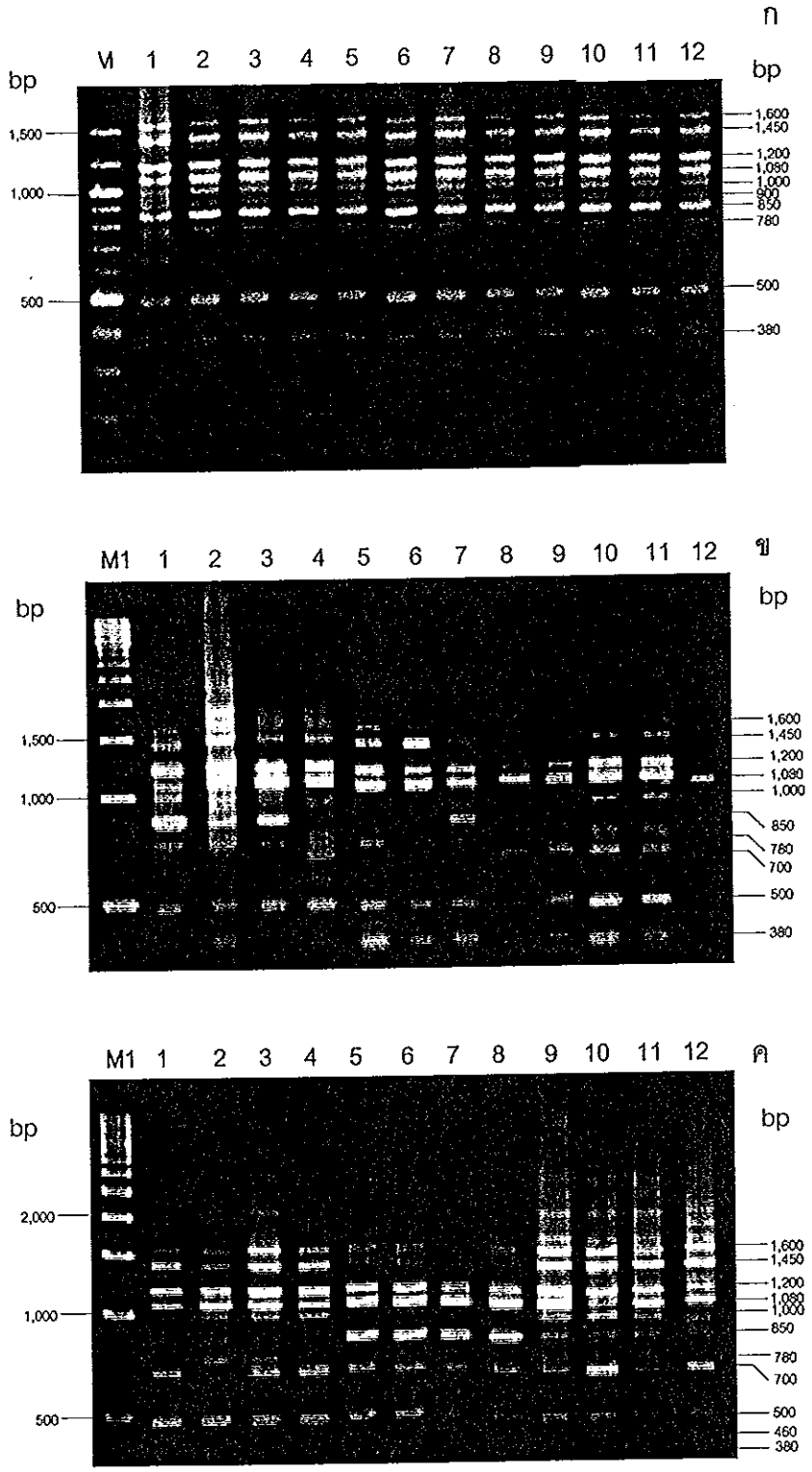
รูปที่ 20 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPC-08 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ



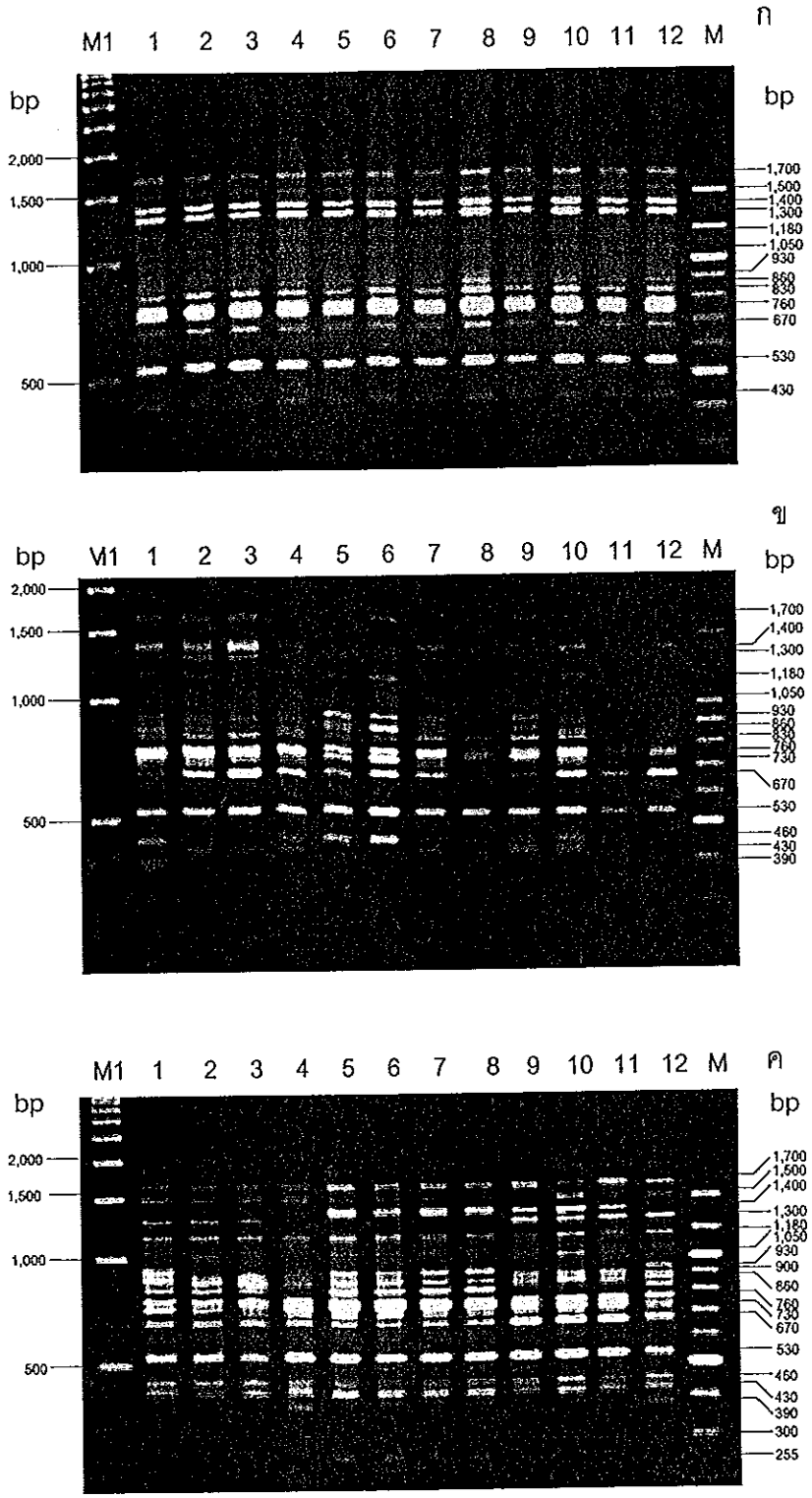
รูปที่ 21 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPD-01 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M คือ Ladder DNA ขนาด 500 คู่เบส



รูปที่ 22 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPD-03 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ



รูปที่ 23 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPT-01 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ



รูปที่ 24 แถบดีเอ็นเอของลองกอง (ก) ลางสาด (ข) และดูกู (ค) ที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยการใช้ไพรเมอร์ OPT-08 ตัวเลขแสดงจำนวนคู่เบส, M และ M1 คือ Ladder DNA ขนาด 100 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด

การตรวจนับจำนวนเหมาะสำหรับพืชที่มีโครโมโซมขนาดใหญ่และมีจำนวนไม่มาก เช่น หอม มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 16 (Song *et al.*, 1997) หรือแตงโมมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 22 (Sari *et al.*, 1999) จากการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า พืชในกลุ่มนี้มีโครโมโซมจำนวนมากและมีขนาดเล็กจึงทำให้เกิดความไม่แน่นอนในการนับ จากการประมาณจำนวนโครโมโซม พบว่า จำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่มนี้น่าจะแตกต่างกัน โดยลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากที่สุด คือ อยู่ในช่วง 137-144 แท่ง เมื่อเปรียบเทียบกับลองกองและดูกู (121-129 แท่ง) และใกล้เคียงกับรายงานของ Bernado และ Ramirez (1959) ซึ่งรายงานว่า ลางสาดมีจำนวนโครโมโซม 72 คู่ เป็น octaploid และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 18 เนื่องจากวิธีการนับจำนวนโครโมโซมอย่างเดียวอาจไม่เหมาะกับพืชที่มีโครโมโซมขนาดเล็กและมีจำนวนมาก ดังนั้นในหลายการทดลองจึงเลือกใช้วิธีการอื่นควบคู่กันไปด้วย ได้แก่ การตรวจสอบความแน่นอนของระดับพลอยดีด้วยการทำโฟลไซโทเมทรี ซึ่งวิธีการนี้มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น ใน buffalograss (Johnson *et al.*, 1998) มันสำปะหลัง (Awoleye *et al.*, 1994) และ Hosta (Zonneveld and van-Iren, 2000) เป็นต้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาเนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตเมทรีแม้ให้ผลแม่นยำแต่ต้องมีค่าใช้จ่ายและความชำนาญสูง การวัดขนาดปากใบและนับจำนวนปากใบเป็นวิธีการที่สามารถเปรียบเทียบจำนวนชุดของโครโมโซมพืชได้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การวัดขนาดปากใบในพริกไทยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงละอองเกสร (Qin and Rotino, 1995) และการนับจำนวนปากใบในกล้วย (Vandenhout *et al.*, 1995) พบว่าขนาดและความหนาแน่นของปากใบมีความสัมพันธ์กับระดับพลอยดี คือ ที่ระดับพลอยดีต่ำจะมีความหนาแน่นของปากใบมากแต่ขนาดปากใบเล็ก ในทางตรงข้ามที่ระดับพลอยดีสูงขนาดปากใบใหญ่แต่ความหนาแน่นของปากใบมีน้อย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Cohen และ Yao (1996) พบว่า *Zantedeschia* ที่ได้รับการทรีตด้วยโคลชิซีนเพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมนั้น ปากใบมีความยาวมากกว่าต้นที่ไม่ได้ทรีต นอกจากนี้ยังสามารถหาระดับพลอยดีได้โดยการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เช่น การศึกษาในมังคุด (ราตรี สุจารีย์, 2540) จากการหาความหนาแน่นและวัดขนาดปากใบรวมทั้งหาปริมาณคลอโรฟิลล์ของลองกอง ลางสาด และดูกูในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ความหนาแน่นและขนาดปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกูมีความแตกต่างทางสถิติ โดยลองกองมีความ

หนาแน่นของปากใบต่อพื้นที่มากที่สุดและขณะเดียวกันขนาดปากใบก็มีขนาดใหญ่ด้วยเช่นกัน รองลงมาคือ ลางสาดและดูกู ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์แม้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่พบว่าลางสาดมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด รองลงมาคือลองกองและดูกู จากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์และวัดขนาดคลอโรพลาสต์ในแคลลัสของเฟิร์นในระยะ sporophytic (2n) และระยะ gametophytic (n) พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์และขนาดคลอโรพลาสต์ของแคลลัสในระยะ sporophytic มีค่าต่ำกว่าแคลลัสในระยะ gametophytic (Kwa *et al.*, 1997) ต่างกับราตรี สุจารีย์ (2540) ที่รายงานว่า ต้นมังคุดที่ได้รับการทรีตด้วยโคลชิซิน มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ทรีต จากการพิจารณาจำนวนโครโมโซมที่นับจากปลายรากในการทดลองนี้ พบว่า ลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าลองกองและดูกู ซึ่งไม่สอดคล้องกับความหนาแน่นและขนาดของปากใบ Vandenhout และคณะ (1995) รายงานว่า ทั้งความหนาแน่นและขนาดปากใบยังขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์พืชด้วย อย่างไรก็ตามแม้จำนวนโครโมโซมของลางสาดมีมากกว่าลองกองและดูกูแต่ความแตกต่างมีไม่มากนัก ซึ่งอาจไม่มากพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของจำนวนและขนาดชองปากใบรวมทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์ วิธีการเหล่านี้จึงไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะชี้ชัดถึงความแตกต่างที่เกิดขึ้น ดังนั้นอีกวิธีที่น่าจะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลที่ชัดเจน คือ การใช้โฟลไซโตเมทรีเพื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอในพืชแต่ละชนิด

2. การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง

2.1 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง

เนื่องจากปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อคุณภาพผลผลิตพีซีอาร์ในการใช้เทคนิค RAPD ดังนั้นเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพเพียงพอต่อการใช้เทคนิคดังกล่าว รวมทั้งเพื่อลดขั้นตอนความยุ่งยากและต้องใช้สารเคมีที่มีอันตรายในบางขั้นตอนออกไป เป็นการประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย ทำให้สามารถสกัดดีเอ็นเอได้หลายตัวอย่างโดยใช้เวลาสั้น รวมทั้งพืชบางชนิดมีขนาดเล็กและหายาก การสกัดดีเอ็นเอที่ต้องใช้ตัวอย่างใบในปริมาณมากอาจมีผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช จึงต้องทำการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนพืชซึ่งพืชแต่ละชนิดอาจมีวิธีการแตกต่างกันออกไป ในการทดลองนี้ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 4 วิธีการ พบว่า วิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ ให้ผลดีที่สุด วิธีการนี้ดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ซึ่งประสบความสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชหลายชนิด เช่น ใน *Cymbidium* (Obara-Okeyo and Kako, 1998) แตงโม (Hashizume *et al.*, 1996)) และสตรอเบอรี่ (Degani *et al.*, 1998) เป็นต้น วิธีการนี้เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB บัฟเฟอร์ สลายเยื่อหุ้มเซลล์และจับตัวกับดีเอ็นเอ กำจัดโปรตีนและสาร

โพลีแซคคาไรด์ด้วยคลอโรฟอร์ม และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล วิธีการใช้แอมโมเนียมอะซีเตตเป็นวิธีการที่สมปอง เตชะโต (ติดต่อส่วนตัว) รายงานว่าประสบความสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง แต่เมื่อนำวิธีนี้มาใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบซึ่งเก็บจากแปลงพบว่าได้ผลไม่ดีนัก คือ ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มีสีน้ำตาลเนื่องจากมีการปนเปื้อนของสารโพลีฟีนอลทำให้ไม่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชชนิดนี้มีผลต่อการสร้างและสะสมสารโพลีฟีนอล ส่วนวิธีการใช้ ROSE บัฟเฟอร์ ซึ่งพัฒนาโดย Steiner และคณะ (1995) เป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วเสร็จได้ในขั้นตอนเดียว อีกทั้งไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติ และจากการทดลองของ Steiner และคณะ (1995) ใน birdsfoot trefoil พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพเพียงพอสำหรับการทำพีซีอาร์ สำหรับวิธีการของ McDonald และคณะ (1994) เป็นวิธีการที่มีรายงานว่าประสบความสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดถั่วเหลือง แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธีนี้ให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า 2 วิธีแรก ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของชนิดพืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ เนื่องจากทั้ง 2 วิธีนี้เป็นรายงานที่ศึกษาในพืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะวิธีการของ McDonald และคณะ (1994) เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดถั่วเหลืองแต่ในการทดลองนี้ศึกษาในพืชยืนต้นและใช้ชิ้นส่วนใบ นอกจากนี้แล้วสารละลายที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการของ Steiner และคณะ (1995) ปนเปื้อนด้วยเศษใบ ส่วนวิธีการของ McDonald และคณะ (1994) ได้ตะกอนสีน้ำตาลของสารโพลีฟีนอลปนเปื้อนมาก จึงอาจมีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในกระบวนการพีซีอาร์ทำให้ไม่เหมาะที่จะใช้สกัดดีเอ็นเอของพืชสกุลลางสาด

การหาปริมาณดีเอ็นเอทำได้ 2 วิธีการ คือ การวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมีเตอร์ และการทำอิเลกโตรโฟรีซีส การหาปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้สเปกโตรโฟโตมีเตอร์นั้นให้ผลแม่นยำก็ต่อเมื่อดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและสารโพลีฟีนอล (Sambrook *et al.*, 1989) หรือการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ (Sauer *et al.*, 1998) แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ไม่มีการกำจัดอาร์เอ็นเอและการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการใช้ ROSE บัฟเฟอร์ และวิธีของ McDonald และคณะ (1994) ได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรโฟโตมีเตอร์ ดังนั้นจึงประมาณค่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว ซึ่งค่า fluoresence ที่ได้เป็นค่าของดีเอ็นเอทั้งหมด และเป็นวิธีที่สามารถทำได้แม้มีปริมาณดีเอ็นเอน้อย (1-5 นาโนกรัม) (Sambrook *et al.*, 1989) อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้สัมพันธ์กับขนาดตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ ดังนั้นจึงอาจ

ประมาณปริมาณดีเอ็นเอจากตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ (Weeden *et al.*, 1992) แล้วจึงเติม TE บัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการก็ได้

เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีการสร้างสารชีวเคมีแตกต่างกัน จึงประสบปัญหาในการสกัดดีเอ็นเออยู่เสมอ กล่าวคือ ดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนของสารโพลีแซคคาไรด์ หรือสารโพลีฟีนอล ซึ่งนอกจากทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณลดลงแล้วยังมีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะรวมทั้งเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ในกระบวนการพีซีอาร์และมีผลทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ (Weeden *et al.*, 1992) ซึ่งในกรณีของเทคนิค RAPD ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยแต่ต้องการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูง (Weising *et al.*, 1995) ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การใช้ CTAB บัฟเฟอร์ในการสกัดดีเอ็นเอให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูงสุด คือ ได้ดีเอ็นเอที่สะอาด มีสีขาวขุ่น และเป็นวิธีเดียวที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่อีก 3 วิธี แม้มีรายงานว่าประสบความสำเร็จและให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพเพียงพอเมื่อใช้เทคนิค RAPD ในพืชชนิดอื่น แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มีสีน้ำตาลจากการปนเปื้อนของสารโพลีฟีนอลซึ่งพบในปริมาณมากในพืชสกุลลางสาดและมีผลกระทบโดยตรงต่อการสร้างผลผลิตพีซีอาร์ การที่ใช้ CTAB บัฟเฟอร์ประสบความสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเออาจเนื่องจากใน CTAB บัฟเฟอร์ประกอบไปด้วย β-mercaptoethanol ซึ่งเป็นสาร antioxidant และ PVP-40 ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับสารโพลีฟีนอล ในขณะที่บัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดดีเอ็นเออีก 3 วิธีไม่มีสารสองชนิดนี้เป็นองค์ประกอบ วิธีการดั้งเดิมของ Doyle และ Doyle (1990) นั้นการสกัดดีเอ็นเอใช้ β-mercaptoethanol และ PVP-40 เข้มข้น 0.2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นนี้ให้ดีเอ็นเอไม่สะอาดเพียงพอ ดังนั้นจึงทดลองปรับความเข้มข้นของ β-mercaptoethanol เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกับการสกัดดีเอ็นเอในพืชชนิดอื่นที่จำเป็นต้องปรับความเข้มข้นของสารสองชนิดนี้เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สะอาดเพียงพอสำหรับทำพีซีอาร์ เช่น ในข้าว *Indica japonica* (Mackill, 1995) แตงโม (Hashizume *et al.*, 1996) และ *Cymbidium* (Obara-Okeyo and Kako, 1998) ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ β-mercaptoethanol 1 เปอร์เซ็นต์ หรือใน *Nelumbo* ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ (Kanazawa and Tsutsumi, 1992) ในขณะที่การสกัดดีเอ็นเอใน oak ไม่จำเป็นต้องใช้ β-mercaptoethanol แต่ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ PVP เป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ก็สามารถให้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์เพียงพอได้ (Barrett *et al.*, 1997) หรือในสตรอเบอรี่ที่ใช้ β-mercaptoethanol แต่ไม่ใช้ PVP (Degani *et al.*, 1998) เป็นต้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีการสร้างสารโพลีฟีนอลแตกต่างกัน ผลที่ได้จากการสกัดดีเอ็นครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Boiteux และคณะ (1999) ซึ่งสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของตาดอกและ

ใบด้วยวิธีการแตกต่างกัน 7 วิธี พบว่า วิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ ให้ปริมาณดีเอ็นเอได้สูงสุด และเป็นวิธีเดียวที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ ส่วน Colosi และ Schaal (1993) รายงานว่า การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบที่บดละเอียดด้วย CTAB บัฟเฟอร์ เป็นการช่วยให้ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและคุณภาพสูงขึ้น นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบวิธีการการสกัดดีเอ็นเอระหว่างวิธีการที่เรียกว่า QUICK ซึ่งทำได้รวดเร็วกับการสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB บัฟเฟอร์ โดย Sweeney และ Danneberger (1997) พบว่า วิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ ให้ปริมาณดีเอนเอได้สูงและผลผลิตพีซีอาร์มีความสม่ำเสมอกว่า อย่างไรก็ตามแม้ว่าวิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ ให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอได้สูงแต่วิธีการนี้ต้องใช้แรงงาน และค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีการใช้แอมโมเนียมอะซีเตต การใช้ ROSE บัฟเฟอร์ และวิธีการของ McDonald และคณะ (1994) อีกทั้งสารบางตัวที่ใช้อาจเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติการ (Steiner *et al.*, 1995) ดังนั้นในกรณีของพืชที่ไม่มีหรือมีการสร้างสารโพลีฟีนอลน้อยอาจเลือกใช้วิธีอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพเพียงพอและมีอันตรายน้อย เช่น วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้สาร NaOH (Wang *et al.*, 1993) หรือใช้ Tris-HCl ความเข้มข้นสูง (100 mM) ใน อัลฟัลฟา (Yu and Puals, 1992) เป็นต้น

2.2 ศึกษาอายุใบที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอมีผลต่อดีเอ็นเอที่ได้ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ในกรณีของการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ใบมักใช้ใบอ่อน (Hashizume *et al.*, 1996 ; Degani *et al.*, 1998 ; Fajardo *et al.*, 1998) เนื่องจากเซลล์ของใบมีอัตราการแบ่งเซลล์สูง ดีเอ็นเอที่ได้จึงมีปริมาณสูงตามไปด้วย นอกจากนี้ใบอ่อนยังสามารถบดได้ง่ายโดยไม่จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนเหลว จากการทดลองครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการใช้ชิ้นส่วนใบ 3 ระยะพัฒนาการซึ่งแม้พบว่าใบอ่อนให้ปริมาณดีเอ็นเอได้สูงสุด แต่เนื่องจากใบอ่อนมีโอกาสบอบช้ำได้ง่ายจึงเกิดการปลดปล่อยเอ็นไซม์โพลีฟีนอลออกซีเดสเปลี่ยนโพลีฟีนอลไปเป็นควิโนนิดทำให้ตะกอนดีเอ็นเอมีสีน้ำตาล นอกจากนี้ในทางปฏิบัติในแปลงไม่สามารถเก็บตัวอย่างซึ่งเป็นใบอ่อนได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นการใช้ใบเพสลาดหรือใบแก่เพื่อสกัดดีเอ็นเอจึงทำได้สะดวกกว่า ทั้งนี้การใช้ไนโตรเจนเหลวในการบดตัวอย่างช่วยให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงขึ้น โดยในการบดต้องใช้ตัวอย่างใบและโกร่งที่แห้ง ไม่มีน้ำ เนื่องจากน้ำจะทำให้เกิดน้ำแข็งระหว่างบดซึ่งทำให้บดยาก (Colosi and Schaal, 1993)

ชิ้นส่วนพืชที่ไม่เหมาะสมทำให้สกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณน้อยหรือดีเอ็นเอที่ได้ปนเปื้อนด้วยสารโพลีฟีนอล ทั้งนี้ปริมาณสารโพลีฟีนอล, โพลีแซคคาไรด์ และสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการในพืชมีความผันแปรตามฤดูกาลในการเก็บเกี่ยว (Parent and Page, 1992) จากการ

ทดลองของ Boiteux และคณะ (1999) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอของแครอทที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ 7 วิธี โดยใช้ชิ้นส่วนต่างๆ กัน คือ ใบสด, lyophilized ที่ได้จากใบ, แคลลัส, เมล็ด, ตาดอก และปลายราก พบว่า ตาดอกให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด รองลงมาคือ เมล็ด, ใบสด, lyophilized, แคลลัส และปลายรากให้ปริมาณดีเอ็นเอได้น้อยที่สุด แต่จากการทดสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการพีซีอาร์ พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากแคลลัสให้จำนวนแถบดีเอ็นเอได้สูงสุด ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบและตาดอกสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เมื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการใช้ CTAB บัฟเฟอร์ เท่านั้น

2.3 ศึกษาปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอจากใบที่การเก็บรักษาด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน

การทำ RAPD โดยส่วนใหญ่นิยมใช้ใบสดในการเตรียมดีเอ็นเอ แต่ในบางกรณีไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทันทีหลังจากที่เก็บเกี่ยวจากต้น เช่น ต้นพืชที่จะสุ่มเก็บตัวอย่าง ปลูกอยู่ในสถานที่ห่างไกลจากที่ตั้งของห้องปฏิบัติการหรือบางครั้งมีตัวอย่างจำนวนมากไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทันในเวลาที่กำหนด ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม การเก็บตัวอย่างในแปลงจำเป็นต้องมีวิธีการที่เหมาะสมในเบื้องต้นก่อน เช่น สภาวะที่เย็นแต่ไม่เป็นน้ำแข็ง ด้วยการวางบนน้ำแข็งหรือหุ้มด้วยกระดาษ แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บไว้เป็นเวลานานควรเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือทำให้แข็งทันทีด้วยการแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วจึงเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส (Weising *et al.*, 1995) นอกจากนี้อาจทำให้แห้งอยู่ในสภาพ lyophilized (Sedra *et al.*, 1998 ; Boiteux, 1999) ซึ่งจัดการได้ง่ายกว่า สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง และไม่ต้องใช้ไนโตรเจนเหลว ในการทดลองนี้ศึกษาคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการเก็บรักษาใบที่ระดับอุณหภูมิและเวลาต่างกัน คือ อุณหภูมิห้อง, 4 และ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 30 วัน เปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอจากใบสด ซึ่งพบว่า ใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถเก็บรักษาได้นาน และให้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพสูงกว่าใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง กล่าวคือ ใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน สามารถให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพเพียงพอต่อการทำพีซีอาร์ ในขณะที่ใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้เพียง 1 และ 3 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน เริ่มให้ตะกอนสีน้ำตาลซึ่งทำให้ดีเอ็นเอมีคุณภาพลดลง และเมื่อเก็บรักษาไปนาน5-30 วัน พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณไม่เพียงพอในการทำพีซีอาร์ ส่วนใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-30 วัน แม้จะให้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนหนึ่ง แต่ดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีคุณภาพเพียงพอต่อการทำพีซีอาร์ การทดลองครั้งนี้ให้ผลตรงข้ามกับการทดลองของ Thomson และ Henry (1993) ซึ่งศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการอบแห้งใบท้อและเวลาที่ใช้ในการ

เก็บรักษา รายงานว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบที่ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน ให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอได้สูงสุด โดยปริมาณดีเอ็นเอเริ่มลดลงเมื่อเก็บรักษาไป 122 วัน อย่างไรก็ตาม Thomson และ Henry (1993) แนะนำว่าวิธีการนี้อาจไม่เหมาะสมกับส่วนของพืชที่มีความชื้นสูง นอกจากนี้ Autio และคณะ (1998) รายงานว่า ในกรณีการเก็บรักษาใบที่อุณหภูมิต่ำควรระมัดระวังการเกิด thawing ของเนื้อเยื่อ ซึ่งทำให้เซลล์พืชมีสีน้ำตาลก่อนใส่บัฟเฟอร์และมีผลให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอลดลง

3. ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการทำพีซีอาร์

แม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และใช้ค่าใช้จ่ายต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น เทคนิค RFLP หรือ AFLP แต่ในแง่ความมีเสถียรภาพหรือความสม่ำเสมอที่ได้ของผลผลิตพีซีอาร์ยังมีน้อยกว่า ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ซึ่งมีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ในกรณีของการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-80 นาโนกรัม ซึ่งช่วงความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในพืชหลายชนิด เช่น สาคู (Boonsermsuk *et al.*, 1996) *Brassica napus* (Dulson *et al.*, 1998) *Alstroemeria* (Anastassopoulos and Keil, 1996) และสตรอเบอรี่ (Degani *et al.*, 1998) ในขณะที่การทดลองในมะเขือเทศความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอที่เหมาะสมประมาณ 400 นาโนกรัม (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991) การใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่ำเกินไปมีผลให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในระหว่างรอบที่ 1 หรือ 2 ของกระบวนการพีซีอาร์มีประสิทธิภาพต่ำ แต่หากความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงก็ทำให้เกิดความไม่จำเพาะเจาะจงสูง (Caetano-Anolles *et al.*, 1992) หรือในบางกรณีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สูงเกินไปทำให้ได้แถบดีเอ็นเอลดลง เนื่องจากอาจทำให้สารปนเปื้อนในดีเอ็นเอมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย (Rossen *et al.*, 1992 อ้างโดย Weising *et al.*, 1995) จากการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของ 40 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ซึ่งพบว่าให้ผลดีและมีความสม่ำเสมอตลอดการทดลอง ส่วนที่ความเข้มข้นสูง (100-200 นาโนกรัม) หรือความเข้มข้นต่ำ (5-10 นาโนกรัม) มีผลให้แถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความชัดเจน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอจำเป็นต้องสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไพรเมอร์ด้วย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.3-0.4 ไมโครโมลาร์ จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการทำ RAPD ของมันฝรั่ง (Ford and Taylor, 1997) โดยความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สูงเกินไป (0.5-0.6 ไมโครโมลาร์) มีผลให้รูปแบบ RAPD ที่ได้ไม่สมบูรณ์ ส่วนที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่ำ (0.05-0.2 ไมโครโมลาร์) พบว่าทำให้แถบดีเอ็นเอบางแถบหายไปและมีแถบดีเอ็นเอบางแถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้นมา ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน

ของ Weeden และคณะ (1992) กล่าวคือ การใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสูงมักทำให้ได้แถบดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 200-400 คู่เบส ส่วนการใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นต่ำทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 1,500-3,000 คู่เบส นอกจากความเข้นข้นแล้วความยาวของไพรเมอร์ที่ใช้ก็มีผลต่อความสม่ำเสมอของผลผลิตพีซีอาร์เช่นกัน โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RAPD ครั้งนี้เป็นไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ เปอร์เซ็นต์ G+C ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Williams และคณะ (1990) รายงานว่าความยาวของไพรเมอร์ต่ำสุดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้อยู่ที่ความยาว 9 นิวคลีโอไทด์ และมีเปอร์เซ็นต์ G+C อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ การใช้นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้นชนิดละ 100-200 ไมโครโมลาร์ จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลสาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการทำ RAPD ของอ้อย (Huckett and Botha, 1995) จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าที่ความเข้มข้นสูง (250 และ 300 ไมโครกรัม) หรือต่ำเกินไป (25 และ 50 ไมโครโมลาร์) มีผลให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เกิดขึ้นน้อยและมีความชัดเจนลดลง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตและบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อการเกิดรูปแบบของ RAPD อย่างมีนัยสำคัญ (Weeden *et al.*,1992) ทั้งนี้ความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตต้องสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ด้วย เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตบางส่วนจะจับกับแมกนีเซียมคลอไรด์ในกระบวนการพีซีอาร์ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม คือ เข้มข้น 2.5-3.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในพืชหลายชนิด เช่น *Actinidia* (Cipriani *et al.*, 1996) และ *Brassica napus* (Dulson *et al.*, 1998) ส่วนที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูงหรือต่ำกว่านี้มีผลให้แถบดีเอ็นเอบางแถบหายไปและบางแถบมีความชัดเจนน้อยลง ซึ่งตรงกับรายงานของ Tingey และคณะ (1992) กล่าวไว้ว่า ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อการเกิดผลผลิตพีซีอาร์ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ ในขณะที่ Erlich และคณะ (1991) รายงานว่า การใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ ส่วนความเข้มข้นของเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ที่เหมาะสมในการทำ PCR ครั้งนี้ คือ 1.5, 2.0 และ 3.0 ยูนิต เพราะให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน แต่เนื่องจากเอ็นไซม์มีราคาสูงจึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 1.5 ยูนิต เพื่อการประหยัด การใช้เอ็นไซม์ความเข้มข้นสูงนอกจากเป็นการสิ้นเปลืองแล้วยังมีผลต่อการเกิดความไม่จำเพาะเจาะจงในการทำพีซีอาร์ โดย Saiki และคณะ (1988) รายงานว่าความไม่จำเพาะเจาะจงของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เพิ่มขึ้นตามจำนวนยูนิตของเอ็นไซม์ที่ใช้ นอกจากความเข้มข้นแล้วชนิดของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ก็มีผลต่อผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเช่นกัน โดยใน

การทดลองครั้งนี้ใช้เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase จากบริษัท Promega และบริษัท Bio-Lab ซึ่งพบว่า ให้ประสิทธิภาพในการทำพีซีอาร์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Weeden และคณะ (1992) รายงานว่า การใช้เอ็นไซม์จากบริษัท Perkin-Elmer หรือ Promega หรือจากบริษัท Boehringes มีประสิทธิภาพในการให้ผลผลิตพีซีอาร์ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ Wolff และคณะ (1996) ศึกษาในเบญจมาศ พบว่า มีความแตกต่างของ RAPD ที่ได้เมื่อใช้เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase จากต่างบริษัทและแนะนำว่าควรเลือกใช้เอ็นไซม์จากบริษัทเดียวกันตลอดการทดลองนั้นๆ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับจีโนมิคดีเอ็นเอในกระบวนการทำพีซีอาร์จากการทดองครั้งนี้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด ซึ่งเป็นอุณหภูมิเดียวกับกับที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ของมะเขือเทศ (McGregor *et al.*, 2000) ส่วนที่อุณหภูมิสูง 45 และ 55 องศาเซลเซียส นั้นให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนและมีแถบดีเอ็นเอบางแถบหายไป Weising และคณะ (1995) รายงานว่า อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับจีโนมิคดีเอ็นเอมีผลต่อความมีเสถียรภาพของการจับคู่ระหว่างจีโนมิคดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ หากอุณหภูมิในขั้นตอนนี้สูงเกินไปอาจทำให้เกิดการแยกสายระหว่างไพรเมอร์กับจีโนมิคดีเอ็นเอก่อนเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมควรมีค่าต่ำกว่าค่า T_m (melting temperature) ประมาณ 5 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของดีเอ็นเอด้วย ซึ่ง Wolff และคณะ (1996) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดจากข้าวโพดต่างกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเบญจมาศ นอกจากนี้ Levi และคณะ (1993) รายงานว่าการใช้อุณหภูมิสูง 48 องศาเซลเซียสร่วมกับใช้บัฟเฟอร์ที่มี Triton-X และ gelatin เป็นองค์ประกอบสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน

4. การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู

แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์มีความจำเพาะเช่นเดียวกับรายงานของอุไรวรรณ อรัญวาสน์ (2540) ซึ่งทดสอบกับพืชในกลุ่มของกระเจียว การใช้ไพรเมอร์ที่ให้ปริมาณแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวนมากช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ จากการศึกษาของ Fanizza และคณะ (1999) พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันที่ได้จากการทำ RAPD มีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับค่า genetic distance และค่าความคลาดเคลื่อนที่ได้มีค่าลดลงตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนแถบดีเอ็นเอ ในการทดลองครั้งนี้ทำการทดสอบเบื้องต้นกับไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ 100 ชนิด พบว่า มีไพรเมอร์ 47 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และในจำนวนนี้ทำการ

คัดเลือกไพรเมอร์ 10 ชนิด คือ OPA-10, OPB-04, OPB-08, OPC-04, OPC-05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-01 และ OPT-08 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลองกอง ลางสาด และดูกูรวมทั้งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้ โดยแต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 14.6 แถบต่อไพรเมอร์ ในกลุ่มของลองกองทั้ง 12 ต้น ซึ่งสุ่มเก็บตัวอย่างใบมาจากสวนเกษตรกรในเขตสองจังหวัด คือ นราธิวาสและปัตตานี รวมทั้งลองกองจากแปลงทดลองของภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ทั้งหมดให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน คือ มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกันทั้ง 10 ไพรเมอร์ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าในกลุ่มของลางสาดและดูกู แสดงว่าลองกองมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูง จากรายงานของ Bernado และ Ramirez (1959) พบว่าลางสาดและดูกูมีลักษณะอะโพมิกซีส คือ เมล็ดไม่ได้เกิดจากการผสมระหว่างไข่และละอองเกสรแต่เกิดจากการเจริญของเนื้อเยื่อนิวเซลลัสทำให้มีโอกาสกลายพันธุ์น้อย แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอในกลุ่มลางสาดและดูกูมีความแตกต่างกันในแต่ละต้นที่ทำการศึกษา แสดงว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากระดับของลักษณะอะโพมิกซีสอาจแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และยังมีความสัมพันธ์กับระดับพลอยดีของพืชชนิดนั้นโดยตรง (Quarin, 1986) จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับงานทดลองของจรัสศรี นวลศรี และคณะ (2543) ที่ใช้เทคนิค RAPD ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าลองกองที่ได้จากการเพาะเมล็ด และพบว่าเกือบทั้งหมดมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันกับต้นแม่ ในขณะที่ต้นกล้าดูกูให้แถบดีเอ็นเอต่างจากต้นแม่ประมาณ 49 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าลองกองมีระดับของลักษณะอะโพมิกซีสสูงกว่าดูกู นอกจากนี้ อุไรวรรณ นามศรี (2541) ได้ทำการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรของพืชทั้งสามชนิดนี้ พบว่า ละอองเกสรของลองกองและลางสาดมีความเป็นหมันสูง ในขณะที่ดูกูพื้นเมืองมีการสร้างละอองเกสรที่ปกติและงอกได้เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจมีการผสมข้ามเกิดขึ้นในกลุ่มลางสาดและดูกูจึงทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้น ผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการแยกความแตกต่างของพืชสกุลลางสาดโดยใช้ลักษณะสัณฐาน (มงคล แซ่หลิม, 2538 ; ประพันธ์ อรรจนกุล, 2534) ยังให้ผลไม่แม่นยำเพียงพอไม่ว่าจะเป็นในระยะต้นกล้าหรือระยะที่ให้ผลผลิตแล้ว เนื่องจากพบว่า ลักษณะทางสัณฐานบางอย่างที่เกิดขึ้นและทำให้พืชสกุลนี้แตกต่างกันทั้งระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มเดียวกันมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อม ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจน คือ ลางสาดต้นที่ 10 ซึ่งมีลักษณะสัณฐานต่างจากลางสาดต้นที่ 4 และ 11 อย่างชัดเจน คือ มีขนาดใบ ดอก และผลเล็กกว่า แต่เมื่อแยกความแตกต่างโดยการศึกษาลึกลงไปถึงระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD พบว่าลางสาดต้นที่ 10 ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับลางสาดต้นที่ 4 และ 11 ทุกไพรเมอร์

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD มีประสิทธิภาพเพียงพอในการพิสูจน์พันธุ์ลองกอง โดยสามารถเทียบแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้เพราะแถบดีเอ็นเอของลองกองมีความแตกต่างจากลางสาดและดูกู รวมทั้งสามารถแยกความแตกต่างของพืชแต่ละต้นในกลุ่มลางสาดและดูกูได้ชัดเจน นอกจากนี้พบว่า แถบดีเอ็นเอของกลุ่มลองกองที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC-04 มีแถบดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 2,500 คู่เบส ในขณะที่กลุ่มของลางสาดและดูกูไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอดังกล่าว ดังนั้นจึงอาจใช้ดีเอ็นเอน้ำหนักโมเลกุล 2,500 คู่เบสนี้เป็นเครื่องหมายเพื่อแยกความแตกต่างของลองกองออกจากลางสาดและดูกูได้อีกด้วย ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับเกษตรกร คือ ช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอันเกิดจากความผิดพลาดในการคัดเลือกต้นพันธุ์เพื่อให้ได้ต้นกล้าที่ถูกต้องตรงตามพันธุ์

บทที่ 5

สรุป

การศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมของพืชสกุลลางสาด

1. จากการนับจำนวนโครโมโซมปลายรากของลองกอง ลางสาด และดูกู พบว่า โครโมโซมมีจำนวนมากและขนาดเล็กทำให้มีความยากในการนับ จากการประมาณจำนวนโครโมโซม พบว่า ลางสาดมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าลองกองและดูกู

2. ความหนาแน่นของปากใบของลองกอง ลางสาด และดูกูมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ คือ ลองกองมีความหนาแน่นของปากใบต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร มากที่สุด เท่ากับ 27.83 รองลงมา คือ ลางสาด เท่ากับ 22.84 และดูกูมีความหนาแน่นของปากใบน้อยที่สุด เท่ากับ 22.12

3. ลองกองมีขนาดปากใบมากที่สุด เท่ากับ 167.80 ไมโครเมตร รองลงมา คือ ลางสาด เท่ากับ 158.14 ไมโครเมตร และดูกูมีจำนวนปากใบเล็กที่สุด เท่ากับ 137.80 ไมโครเมตร

4. ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีของลองกอง ลางสาด และดูกูไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบลองกอง

1. การสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB บัฟเฟอร์ ให้ปริมาณดีเอ็นเอได้สูงสุด เท่ากับ 15-20 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด รองลงมาคือ การสกัดดีเอ็นเอด้วยแอมโมเนียมอะซีเตต เท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด ส่วนวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย ROSE บัฟเฟอร์ และวิธีการของ McDonald และคณะ (1994) ให้ปริมาณดีเอ็นเอได้น้อยมาก

2. การสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB บัฟเฟอร์ เท่านั้นที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอมีคุณภาพเพียงพอต่อการทำพีซีอาร์

3. ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบเพสลาดและใบแก่มีปริมาณ และคุณภาพเพียงพอต่อการทำพีซีอาร์ ในขณะที่ใบอ่อนให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงแต่หากทิ้งไว้โดยไม่สกัดดีเอ็นเอทันที ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนมักมีสีน้ำตาลเนื่องจากการปนเปื้นของสารโพลีฟีนอล

4. ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน มีปริมาณและคุณภาพไม่ต่างกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบสด

ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการทำพีซีอาร์

สภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร คือ ใช้จีโนมิคดีเอ็นเอเข้มข้น 40 นาโนกรัม นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้นชนิดละ 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และเอ็นไซม์ Taq DNA poymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต สำหรับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 39 รอบ และรอบสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

การทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างระหว่างลองกอง ลางสาด และดูกู

จากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 100 ชนิด พบว่า มีไพรเมอร์ 47 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน และในจำนวนนี้มีไพรเมอร์ 10 ชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแยกความแตกต่างของลองกอง ลางสาด และดูกูได้ คือ OPA-10, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPC-08, OPD-01, OPD-03, OPT-07 และ OPT-08 จากการทดสอบใช้ไพรเมอร์ทั้ง 10 ชนิด พบว่าลองกองให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกต้นที่ทำการทดสอบและทุกไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างจากลางสาดและดูกู แสดงว่าลองกองที่สุ่มมาไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในขณะที่ลางสาดและดูกูให้แถบดีเอ็นเอต่างกันซึ่งแสดงถึงลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกันในแต่ละต้น นอกจากนี้การทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-04 ในลองกองได้แถบดีเอ็นเอขนาด 2,500 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่พบในกลุ่มของลางสาดและดูกู จึงสามารถใช้แถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของกลุ่มลองกองออกจากกลุ่มลางสาดและดูกู

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542. อนุสารสถิติและข้อมูลการเกษตรปี 2540. กรุงเทพฯ : ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร. กองวางแผน กรมส่งเสริมการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จรัสศรี นวลศรี สมปอง เตชะโต มงคล แซ่หลิม. 2543. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นลองกอง (*Lansium domesticm* Corr.) ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยเทคนิค RAPD. (Random Amplified Polymorphic DNA) รายงานการวิจัย. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัดฟันนีพับลิชชิง.

ประพันธ์ อรรจนกุล. 2534. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของลองกอง (*Aglaia dookkoo* Griff.) ดูกู (*Aglaia dookkoo* Griff.) และลางสาด (*Aglaia domestica* Pelleg.) วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มงคล แซ่หลิม. 2538. พันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์ของพืชสกุลลางสาด. ว. แก่นเกษตร 22: 59-66.

ราตรี สุจารีย์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยใช้โคลชิซินในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช สุมน มาสุธน ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ เสาวณีย์ สุพุทธิธาดา และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2538. การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* โดยเทคนิค RAPD. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ 29: 454-461.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุไรวรรณ นามศรี. 2541. การเจริญเติบโตและการพัฒนาการของละอองเกสรของลองกอง ลางสาด และดูกู. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุไรวรรณ นามศรี มงคล แซ่หลิม และ จรัสศรี นวลศรี. 2543. ความมีชีวิตของละอองเรณูของลองกอง ลางสาด และดูกู. ว. สงขลานครินทร์ 22: 35-41.

อุไรวรรณ อรัญวาสน์. 2540. การวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชกลุ่มกระเจี๊ยวโดยเทคนิค Ramdom Amplified Polymorphic DNA. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Anastassopoulos, E. and Keil, M. 1996. Assessment of natural and induced genetic variation in *Alstroemeria* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 90: 235-244.

Autio, W.R., Schupp, J.R., Ferree, D.C., Glavin, R. and Mulcahy, D.L. 1998. Amplification of RAPDs to DNA extracted from apple rootstocks. HortSience 33: 333-335.

Awoleye, F., van Duren, M., Dolezel, J. and Novak, F.J. 1994. Nuclear DNA content and *in vitro* induce somatic polyploidization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. Euphytica 76: 195-202.

Barrett, C., Lefort, F. and Douglass, G.C. 1997. Genetic characterisation of oak seedlings, epicormic, crow and micropropagated shoots from mature trees by RAPD and microsatellite PCR. Scientia Horticulturae 70: 319-330.

Bernado, F.A. and Ramirez, D.A. 1959. Cytology of Philippine Plant III. *Lansium domesticum* Correa. The Philippine Agriculturist 43: 375-377.

Boiteux, L.S., Fonseca, M.E.N. and Simon, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on random amplified polymorphic DNA-base genetic fingerprinting analysis in carrot. J. Amer. Soc. Hort. Soc. 124: 32-38.

Boonsermsuk, S., Arai, T., Hasegawa, K. and Hisajima, S. 1996. Establishment of experimental condition on random amplified polymorphic DNA analysis of sago palm. Sago Communication 7: 66-74.

Brown, T.A. 1991. Essential Molecular Biology Volume I : A Practical Approach. New York : Oxford University Press.

Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1992. DNA amplification fingerprinting with vary short primers. *In* Proceedings of application of RAPD technology to plant breeding. 1 November 1992. Minneapolis. pp 18-23.

Cipriani, G., Bella, R.D. and Testolin, R. 1996. Screening RAPD primers for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in genus *Actinidia*. Euphytica 90: 169-174.

Cohen, D. and Yao, J.L. 1996. *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 43-49.

Colosi, J.C. and Schaal, B.A. 1993. Tissue grinding with ball bearings and vortex mixter for DNA extraction. Nucl. Acids Res. 21: 1051-1052.

Degani, C., Rawland, L.J., Levi, A., Hortynski, J.A. and Galletta , G.J. 1998. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 102: 247-253.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L.1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Drenth, A. 1998. Phytophthora Population Genetics. Workshop at Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand, 12-16. October 1998.

Dulson, J., Kott, L. and Ripley, V. 1998. Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. Euphytica 102: 65-70.

Erlich, H.A., Gelfand, D. and Sninsky, J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 252: 1643-1650.

Fajardo, D., Angel, F., Grum, M., Tohme, J., Lobo, M., Roca, W.M. and Sanchez, I. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. Euphytica 101: 341-347.

Fanizza, G., Colonna, G., Resta, P. and Ferrara, G. 1999. The effect of the number RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in *Vitis vinifera*. Euphytica 107: 45-50.

Fiedler, J., Bufler, G. and Bangerth, F. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. Euphytica 101: 249-255.

Ford, R. and Taylor, P.W.J. 1997. The application of RAPD markers for potato cultivar identification. Aust. J. Agric. Res. 48: 1213-1217.

Gill, K.S. and Gill, B.S. 1996. A PCR-based screening assay of *Ph1*, the chromosome pairing regulator gene of wheat. Crop Sci. 36: 729-722.

Gunter, L.E., Tuskan, G.A. and Wullschleger, S.D. 1996. Diversity among populations of swithgrass based on RAPD markers. Crop Sci. 36: 1017-1022.

Harvey, M. and Botha, F.C. 1996. Using of PCR-base methodologies of DNA diversity between *Saccharum* varietes. Euphytica 89: 257-265.

Hashizume, T., Shimamoto, I., Harushima, Y., Yui, M., Sato, T., Imai, T., and Hirai, M. 1996. Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus latanus* (Thunb.) Matsum & Nakai) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Euphytica 90: 265-273.

Huckett, B.I. and Botha, F.C. 1995. Stability and potential use of RAPD markers in sugarcane genealogy. Euphytica 86: 117-125.

Jeff, L.S., Eakes, D.J., Gilliam, C.H., Keever, G.T., Donizor, W.A. and Himerlrick, D.G. 1996. Foliar SPAD-502 meter values, nitrogen levels and extractable chlorophyll for red maple selection. HortScience 31: 468-470.

Jiang, C. and Sink, K.C. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in asparagus. Euphytica 94: 329-333.

Johnson, P.G., Riordan, T.P. and Arumuganathan, K. 1998. Ploidy level determinations in buffalograss clones and populations. Crop Sci. 38: 478-482.

Kanazawa, A. and Tsutsumi, N. 1992. Extraction of restrictable DNA from plant of the genus *Nelumbo*. Plant Mol. Biol. Rep. 10: 316-318.

Khandka, D.K., Nejidat, A. and Golan-Goldhirsh, A. 1996. Polymorphism and DNA markers for asparagus cultivars identified by random amplified polymorphic DNA. Euphytica 87: 39-44.

Klein-Lankhorst, R.M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. and Zabel, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor. Appl. Genet. 83: 108-114.

Kwa, S.H., Wee, Y.C., Lim, T.M. and Kumar, P.P. 1997. Morphogenetic plasticity of callus reinitiated from cell suspension cultures of the fern *Platycerium coronarium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 37-44

Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F. Combes, M.C. and Charrier, A. 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87: 59-64.

Levi, A., Rowland, L.J. and Hartung, J.S. 1993. Production of reliable random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. HortScience 28: 1188-1190.

Liu, C.J. 1996. Genetic diversity and relationships among *Lablab purpureus* genotypes evaluated using RAPD as markers. Euphytica 90: 115-119.

Lu, Z.X., Reighard, G.L., Baird, W.V., Abbott, A.G. and Rajapakse, S.1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. HortScience 31: 127-129.

Mackill, D.J. 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. Crop Sci. 35: 887-894.

McDonald, M.B., Elliot, L.J. and Sweency, P.W. 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. Seed Sci. & Technol. 22: 171-176.

McGregor, C.E., Lambert, C.A., Gleyling, M.M., Louw, J.H. and Warnich, L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting technique (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). Euphytica 113:135-144.

Mudge, J., Andersen, W.R., Kehrer, R.L. and Fairbanks, D.J. 1996. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. Crop Sci. 36: 1362-1366.

Obara-Okeyo, P. and Kako, S. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 99: 95-101.

Parent, J-G. and Page, D. 1992. Identification of rasberry cultivars by radioactive DNA fingerprinting. HortScience 27: 1108-1110.

Qin, X. and Rotino, G.L. 1995. Chloroplast number in guard cell as ploidy indicator of *in vitro* - grown androgenic pepper plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 145-149.

Quarin, C.L. 1986. Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum chomyorhizon*. Euphytica 35: 515-522.

Ridley, H.N. 1967. The Flora of the Malay Peninnsula. London : L. Reeve & Co., Ltd.

Sagredo, B., Hinrichsen, P., Lopeż, H., Cubillos, A. and Munoz, C. 1998. Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. Euphytica 101: 193-198.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Schare, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Sambrook, J., Frisch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning a Labolatory Mannual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sari, N., Abak, K. and Pitrat, M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. Scientia Horticulturae 82: 265-277.

Sauer, P., Muller, M. and Kang, J. 1998. Quatitation fo DNA. QIAGEN News 2: 23-26.

Sedra, M.H., Lashermes, P., Trouslot, P., Combes, M.C. and Hamon, S. 1998. Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. Euphytica 103: 75-82.

Song, P., Kang, W. and Peffley, E.B. 1997. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F_1 hybrids through colchicine treatment of regenerating callus. Euphytica 93: 257-262.

Steiner, J.J., Poklemba, C.J., Fjellstrom, R.G. and Elliott, L.F. 1995. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analysis. USDA/ARS, Oregon Univ. pp 1-8.

Sweeney, P.M. and Danneberger, T.K. 1997. RAPD markers from perennial ryegrass DNA extracted from seeds. HortScience 32: 1212-1215.

Tatineni, V., Cantrell, R.G. and Davis, D.D. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. Crop Sci. 36: 186-192.

Te-chato, S., Nawarangsan, W. and Lim, M. 1995. Identification of *Lansium domesticum* Correa. by isozyme technique. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17: 356-361.

Thomson, D and Henry, R. 1993. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 202-206.

Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, G.K. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. *In* Proceedings of application of RAPD technology to plant breeding. 1 November 1992. Minneapolis. pp 3-8.

Vandenhout, H., Ortiz, R., Vuylsteke, D., Swennen, R. and Bai, K.V. 1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. Euphytica 83: 117-122.

Vidal, J.R., Coarer, M. and Defontaine, A. 1999. Genetic relationships among grapevine varieties grown in different French and Spanish regions based on RAPD markers. Euphytica 109: 161-172.

Wang, H., Qi, M. and Cutler, A.J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucl. Acid Res. 21: 4153-4154.

Weeden , N.F., Timmerman, G.M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. *In* Proceedings of Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Minneapolis. 1 November 1992. pp. 12-17.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA Fingerprinting in Plant and Fungi. Florida : CRC Press, Boca Raton.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livar, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. acids Res. 18: 6531-6535.

Wolff, K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. Euphytica 89: 159-164.

Yamada, T., Hosaka, K., Nakagawa, K., Kaide, N., Misoo, S. and Kamijima, O. 1998. Nuclear genome constitution and other characteristics of somatic hybrids between dihaploid *Solanum acaule* and tetraploid *S. tuberosum*. Euphytica 102: 239-246.

Yu, K. and Puals, K.P. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nucl. Acid Res. 20: 2606.

Zonneveld, B.J.M. and van-Iren, F. 2000. Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras. Euphytica 111: 105-110.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

1. CTAB บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP-40	1.0	กรัม
NaCl	8.12	กรัม
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	62.5	มิลลิลิตร
1.0M Tris-HCl (pH 8.0)	10.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม CTAB ปริมาณ 2 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารจะละลายได้หมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเติมสาร β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำมาใช้

2. ROSE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	62.5	มิลลิลิตร
1M Tris – HCl (pH 8.0)	1	มิลลิลิตร
N-laurylsarcosine	1	กรัม
PVPP	1	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. บัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการดัดแปลงของ McDonald และคณะ (1994) 100 มิลลิลิตร

0.4M Tris-HCl (pH 7.5)	50	มิลลิลิตร
NaCl	1.68	กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	5	มิลลิลิตร
SDS	5	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. บัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการใช้แอมโมเนียมอะซีเตต

1.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	20	ไมโครลิตร

SDS	10	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.0 M Tris-HCl (pH 7.5)	500	ไมโครลิตร
0.25 M Na_2EDTA (pH 7.0)	200	ไมโครลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. TAE บัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 เท่า

Tris Base	121.1	กรัม
กรดอะซีติก	28.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	50	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

7. TBE บัฟเฟอร์ เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	216.0	กรัม
Boric Acid	110.0	กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	80	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

8. DNA sample buffer

Bromophenol blue	125	มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	125	มิลลิกรัม
Glycerol	15	มิลลิลิตร

9. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ethidium bromide 1 กรัม

10. Pretreatment solution

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 8-hydroxyquinoline 0.29 กรัม (ละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

11. Fixative

กรดอะซีติก 1 ส่วน แอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ส่วน

12. การเตรียมสีอะซีโตคาร์มีน

สีคาร์มีน	2	กรัม
กรดอะซีติก	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ต้มแกลเซียลอะซีติกแอสิดให้เดือดจากนั้นเติมสีคาร์มีน คนจนละลายหมด ใช้เหล็กหรือตะปูที่เป็นสนิมแกว่งไปมาสักครู่เพื่อให้สีเข้มขึ้น นำมาวางทิ้งไว้ให้อุ่นประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางผนวกที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทดสอบ RAPD-PCR กับดีเอ็นเอของลองกอง ลางสาด และดูกู

ไพรเมอร์	5' ⟶ 3'	รูปแบบ
OPA-01	CAGGCCCTTC	polymorphism
OPA-02	TGCCGAGCTG	polymorphism
OPA-03	AGTCAGCCAC	monomorphism
OPA-04	AATCGGGCTG	monomorphism
OPA-05	AGGGGTCTTG	non-amplified
OPA-06	GGTCCCTGAC	non-amplified
OPA-07	GAAACGGGTG	polymorphism
OPA-08	GTGACGTAGG	non-amplified
OPA-09	GGGTAACGCC	monomorphism
OPA-10	GTGATCGCAG	polymorphism
OPA-11	CAATCGCCGT	not clear
OPA-12	TCGGCGATAG	not clear
OPA-13	CAGCACCCAC	monomorphism
OPA-14	TCTCGTGCTG	monomorphism
OPA-15	TTCCGAACCC	monomorphism
OPA-16	AGCCAGCGAA	not clear
OPA-17	GACCGCTTGT	polymorphism
OPA-18	AGGTGACCGT	not clear
OPA-19	CAAACGTCGG	polymorphism
OPA-20	GTTGCGATCC	not clear
OPB-01	GTTTCGCTCC	polymorphism
OPB-02	TGATCCCTGG	monomorphism
OPB-03	CATCCCCCTG	not clear
OPB-04	GGACTGGAGT	polymorphism
OPB-05	TGCGCCCTTC	polymorphism
OPB-06	TGCTCTGCCC	polymorphism
OPB-07	GGTGACGCAG	polymorphism
OPB-08	GTCCACACGG	monomorphism

ไพรเมอร์	5' ⟶ 3'	รูปแบบ
OPB-09	TGGGGGACTC	monomorphism
OPB-10	CTGCTGGGAC	monomorphism
OPB-11	GTAGACCCGT	polymorphism
OPB-12	CCTTGACGCA	polymorphism
OPB-13	TTCCCCCGCT	polymorphism
OPB-14	TCCGCTCTGG	polymorphism
OPB-15	GGAGGGTGTT	polymorphism
OPB-16	TTTGCCCGGA	non-amplified
OPB-17	AGGGAACGAG	not clear
OPB-18	CCACAGCAGT	not clear
OPB-19	ACCCCCGAAG	monomorphism
OPB-20	GGACCCTTAC	monomorphism
OPC-01	TTCGAGCCAG	not clear
OPC-02	GTGAGGCGTC	polymorphism
OPC-03	GGGGGTCTTT	not clear
OPC-04	CCGCATCTAC	polymorphism
OPC-05	GATGACCGCC	polymorphism
OPC-06	GAACGGACTC	polymorphism
OPC-07	GTCCCGACGA	polymorphism
OPC-08	TGGACCGGTG	polymorphism
OPC-09	TGTCTGGGTG	monomorphism
OPC-10	TGTCTGGGTG	monomorphism
OPC-11	AAAGCTGCGG	polymorphism
OPC-12	TGTCATCCCC	monomorphism
OPC-13	AAGCCTCGTC	polymorphism
OPC-14	TGCGTGCTTG	polymorphism
OPC-15	GACGGATCAG	not clear
OPC-16	CACACTCCAG	polymorphism
OPC-17	TTCCCCCCAG	non-amplified
OPC-18	TGAGTGGGTG	monomorphism
OPC-19	GTTGCCAGCC	monomorphism
OPC-20	ACTTCGCCAC	monomorphism

ไพรเมอร์	5' ⟶ 3'	รูปแบบ
OPD-01	ACCGCGAAGG	polymorphism
OPD-02	GGACCCAACC	monomorphism
OPD-03	GTCGCCGTCA	polymorphism
OPD-04	TCTGGTGAGG	polymorphism
OPD-05	TGAGCGGACA	polymorphism
OPD-06	ACCTGAACGG	non-amplified
OPD-07	TTGGCACGGG	monomorphism
OPD-08	GTGTGCCCCA	non-amplified
OPD-09	CTCTGGAGAC	monomorphism
OPD-10	GGTCTACACC	monomorphism
OPD-11	AGCGCCATTG	monomorphism
OPD-12	CACCGTATCC	not clear
OPD-13	GGGGTGACGA	polymorphism
OPD-14	CTTCCCCAAG	non-amplified
OPD-15	CATCCGTGCT	polymorphism
OPD-16	AGGGCGTAAG	polymorphism
OPD-17	TTTCCCACGG	non-amplified
OPD-18	GAGAGCCAAC	not clear
OPD-19	CTGGGGACTT	not clear
OPD-20	ACCCGGTCAC	polymorphism
OPT-01	GGGCCACTCA	polymorphism
OPT-02	GGAGAGACTC	monomorphism
OPT-03	TCCACTCCTG	non-amplified
OPT-04	CACAGCGGGA	not clear
OPT-05	GGGTTTGGCA	polymorphism
OPT-06	CAAGGGCAGC	polymorphism
OPT-07	GGCAGGCTGT	polymorphism
OPT-08	AACGGCGACA	polymorphism
OPT-09	CACCCCTGAG	not clear
OPT-10	CCTTCGGAAG	non-amplified
OPT-11	TTCCCCGCGA	monomorphism
OPT-12	GGGTGTGTAG	polymorphism
OPT-13	AGGACTGCCA	not clear

ไพรเมอร์	5' ⟶ 3'	รูปแบบ
OPT-14	AATGCCGCAG	polymorphism
OPT-15	GGATGCCACT	polymorphism
OPT-16	GGTGAACGCT	polymorphism
OPT-17	CCAACGTCGT	polymorphism
OPT-18	GATGCCAGAC	polymorphism
OPT-19	GTCCGTATGG	polymorphism
OPT-20	GACCAATGCC	polymorphism

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสุวิมล กลศึก
วัน เดือน ปี เกิด	23 พฤศจิกายน 2517

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่	2540