ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะเดื่อ

Genetics variation of *Ficus* sp.

ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

RCH
GK
496
.M73
0199A
A.1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 116838
วัน,เดือน,ปี 16 มิ.ย. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบรายได้ คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.12329840
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย)	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะเดื่อ
(อังกฤษ)	Genetics variation of *Ficus* sp.
แหล่งเงิน	เงินงบรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2553
จำนวนเงิน	50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี	ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 - 30 กันยายน 2553
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ	ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail: poeaim@hotmail.com

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ของพืชสกุล *Ficus* โดยใช้ตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการหาความสัมพันธ์ระหว่างมะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) สายพันธุ์ต่างๆ จากพระตำหนักสวนปทุมที่เก็บรวบรวมมาจากสถานที่ต่างๆ และมะเดื่ออุทุมพร *(Ficus racemosa)* จำนวน 1 สายพันธุ์ จากการใช้คู่ไพร์เมอร์ c และ d พบว่าทุกตัวอย่างของ *F. carica* มีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส อย่างไรก็ตาม *F. racemosa* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยคู่ไพรเมอร์นี้ได้ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมด 32 ตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ โดยใช้โปรแกรม ClustalX กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. carica* จำนวน 6 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank เพื่อหา phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining ในโปรแกรม Phylip ผลจากการศึกษาสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยในกลุ่มแรกแสดงลักษณะ monophyletic คือ สายพันธุ์ Khalt (EU191024) สำหรับสายพันธุ์ที่เหลือจะอยู่ในกลุ่มที่สองซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับสปีชีส์ต่ำ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron มีความหลากหลายไม่เพียงพอกับการนำมาใช้หาความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม, *TrnL* (UAA) Intron, *Ficus carica*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Ficus sp. was analyzed for DNA sequence diversity in the non-coding region of chloroplast DNA. The *trnL* (UAA) intron sequences was used as genetic markers and establishing refined genetic relationships for differentiating *Ficus carica* collected from Phratamnak Suan Pathum originating from diverse geographical areas as well as only one *Ficus racemosa*. Using the c and d primers, a single DNA band of approximately 550 bp was amplified from each fig cultivars. However, those primers failed to amplify reproducible products from *F. racemosa*. Thirty-two sequences were aligned using the ClustalX program and compared with 6 public sequences of *F. carica* available in the GenBank database. Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-joining algorithm in the Phylip package. Phylogram from 38 sequences were revealed the presence of 2 main groups. The first group is monophyletic branch composed by Khalt (EU191024). All the remaining cultivars are ranged in the second cluster that comprises two sub-groups. Most of them were revealed a very low genetic diversity. The result was suggest that direct sequencing of the *trnL* (UAA) intron regions do not evolve rapidly enough to resolve relationships at these lower taxonomic levels.

Keywords: Genetic Diversity, *TrnL* (UAA) Intron, *Ficus carica*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินรายได้ ประจำปี 2553 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณทัศนารถ กระจ่างวุฒิ ที่ให้ความรู้ และคำปรึกษาแนะนำในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะเดื่อฝรั่ง ตลอดจนโครงการส่วนพระองค์ในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ณ วังสวนประทุม จังหวัดปทุมธานี ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญรูป.....VII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ทฤษฎี.....3

1.4.1 ลักษณะทั่วไปของมะเดื่อ.....3

1.4.2 คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ.....4

1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....6

บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....10

2.1 วัสดุ อุปกรณ์.....10

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....10

2.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....10

2.1.3 วัสดุ และสารเคมี.....11

2.2 วิธีการทดลอง.....11

2.2.1 การเก็บตัวอย่าง.....11

2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....11

2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....12

2.2.4 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 ผล และอภิปรายผลการทดลอง.....15
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง 15
3.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....17
3.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....17
3.2.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ.....19

บทที่ 4 สรุป และเสนอแนะ.....23

บรรณานุกรม.....24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ.....5

2.1 รายละเอียดตัวอย่าง *F. carica* จากฐานข้อมูล GenBank ที่นำใช้ในเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....14

3.1. แสดงรหัส และสายพันธุ์ของมะเดื่อฝรั่งที่ใช้ในการวิจัย.....15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานของมะเดื่อฝรั่ง.....4

1.2 แสดงตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ c และ d ในยีนบริเวณ *trnL* intron.....5

3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *F. carica* A: โคนใบเป็นรูปติ่งหู ขอบใบมีรอยหยักลึก, B: โคนใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบมีรอยหยักลึกน้อย, C: โคนใบเป็นรูปเงี่ยงใบหอก ขอบใบมีรอยหยักลึกมาก และ D: โคนใบรูปหัวใจ ขอบใบมีรอยหยักเพียงเล็กน้อย.....6

3.2 ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง *trn L* โดย เลนที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, เลนที่ 2 คือ FC 001 Fracazzano, เลนที่ 3 คือ FC 002 Kadoto หรือ Dotlato, เลนที่ 4 คือ FC 003 Horai, เลนที่ 5 คือ FC 004 Black genoa, เลนที่ 6 คือ FC 005 Brown turkey และเลนที่ 7 คือ negative (ชุดที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ).....18

3.3 โครงสร้างของบริเวณ *trnT* (UGU) – *trnF* (GAA) ที่ประกอบด้วยตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ระหว่าง *trnL* (UAA) 5' exon และ *trnL* (UAA) 3'exon และ *trnL–trnF* intergenic spacer ระหว่าง 3' exon ของ *trnL* (UAA) และ *trnF* (GAA) ตำแหน่งของไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product.....18

3.4 พีคตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ FC 013 Paradiso nero (black).....19

3.5 Phylogenetic tree ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่ง *trn L* ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรมแกรม PHYLIP เปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานวิทยาที่ได้จำแนกกลุ่ม.....21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม และมีพื้นที่ป่าไม้และพืชพรรณเป็นจำนวนมาก จึงมีการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาว โดยใช้หลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญ ส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ

พืชสกุลหนึ่งที่ควรได้รับการศึกษาวิจัย และอนุรักษ์ไว้ คือพืชสกุลไทร-มะเดื่อ (*Ficus*) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Moraceae มีพืชที่อยู่ในสกุลนี้ทั่วโลกประมาณ 900 ชนิด กระจายพันธุ์ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น พืชในสกุลนี้มีความหลากหลายมากแต่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่สำคัญ คือ มียางสีขาว มีหูใบที่ชัดเจน และมีดอกขนาดเล็กจำนวนมากเรียงแน่นอยู่ภายในฐานรองดอก เป็นช่อดอกที่มีลักษณะคล้ายผล เรียกว่า syconium หรือ fig พืชสกุลไทร-มะเดื่อนี้มีทั้งผลัดใบ และไม่ผลัดใบ และที่สำคัญคือเป็นตัวชี้วัดสภาพความสมบูรณ์ของป่าได้เป็นอย่างดี นอกจากผลเป็นอาหารของสัตว์แล้ว พืชสกุลไทร-มะเดื่อ ยังเป็นพืชที่มีค่าทางเศรษฐกจหลายชนิด เช่น ผลรับประทานมีคุณค่าอาหารสูง ยางมาใช้ในอุตสาหกรรมทำยาง และนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ ในประเทศไทยพบพืชสกุลไทร-มะเดื่อ กระจายอยู่ทั่วประเทศ เช่น ไทร (*Ficus. annulata*), ก่าง (*Ficus altissima*), ไกร (*F. superb*a), ไทรย้อย (*F. microcarpa*), ไทรย้อยใบแหลม (*F. benjamina*), โพธิ์ (*F. religiosa*), มะเดื่ออุทุมพร (*F. racemosa*), ลุงขน (*F. drupacea*), เฮือด (*F. lacor*), มะเดื่อหอม (*F. hirta*), มะเดื่อปล้อง (*F. hispida*) และมะเดื่อฝรั่ง (*F. carica*) เป็นต้น

การศึกษาพืชสกุลนี้ในประเทศไทยมีเพียงการศึกษาวิจัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และระบบนิเวศเท่านั้น เช่น Chantarasuwan และ Kumtong (2005) รายงานการพบพืชสกุล *Ficus* ในสปีชีส์ *F. hispida* หรือมะเดื่อปล้อง 2 สายพันธ์ ในประเทศไทย คือ *F. hispida var. hispida* และ *F. hispida var. badiostrigosa* ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันมาก แต่มีลักษณะต่างกัน เช่น กิ่ง และผล รวมทั้ง วัฒนา และประนอม (2009) ศึกษาความหลากหลายของพืชสกุล *Ficus* ทางด้านสัณฐานวิทยา เพื่อระบุชนิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าพืชสกุลนี้มีการแพร่กระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง เช่น มะเดื่ออุทุมพร *(F. racemosa)* และมะเดื่อหอม (*F. hirta*) เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการส่งเสริมเพาะปลูกมะเดื่อฝรั่งเพื่อการค้าในประเทศไทย โดยมะเดื่อ หรือมะเดื่อฝรั่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ficus carica* เป็นพืชไม้ยืนต้นขนาดกลางที่มีการปลูกกันมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางตะวันตกของทวีปเอเชีย ส่วนการปลูกที่เป็นการค้าของโลกจะอยู่ในแถบลุ่มแม่น้ำเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอิตาลี โปรตุเกส สเปน ตุรกี และกรีซ บางพันธุ์สามารถปลูกได้ในแคลิฟอร์เนียทางใต้และพื้นที่แห้งแล้งของประเทศสหรัฐอเมริกา โดยทั่วไปมะเดื่อจะมีลำต้นจะเป็นเนื้อไม้สีอ่อนที่แยกหลุดออกได้ง่าย ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ส่วนใหญ่ขอบใบหยักลึก 3-5 หยัก ภายในต้นเดียวกันสามารถมีรูปร่างใบได้หลายแบบ มีความหนาและค่อนข้างแข็ง ปัจจุบันมีการปลูกเพื่อการค้า และมีราคาแพง เนื่องจากผลมีคุณค่าทางอาหารสูง โดยมีสารป้องกันอนุมูลอิสระ และวิตามินสูง

จากมะเดื่อฝรั่งมีความสำคัญทั้งในแง่คุณค่าทางอาหาร และพืชเศรษฐกิจ จึงมีการนำเข้าสายพันธุ์ของมะเดื่อฝรั่งเข้ามาปลูกในประเทศไทย โดยเฉพาะการนำมาเพื่อศึกษาก่อนการนำไปส่งเสริมการปลูกที่รวบรวม ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ในโครงการหลวงส่วนพระองค์ของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ซึ่งการศึกษาในระดับโมเลกุลนี้อาจจะช่วยให้การจัดจำแนกพืชในสกุลมะเดื่อให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น และการศึกษาความหลากหลายของพืชจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ของพืชสกุลมะเดื่อ รวมทั้งเป็นแนวทางในการอนุกรมวิธาน และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชต่อไป ซึ่งการศึกษาระดับสัญฐานวิทยายากในการที่จะจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ โดยเฉพาะมะเดื่อฝรั่งเนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันสูง ในปัจจุบันมีการศึกษาหาความหลากหลายของพืชด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR), เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP), เทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) เป็นต้น ทั้งในส่วนจีโนมในนิวเคลียส โดยเฉพาะตำแหน่งของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (Weiblen, 2000; Baraket และคณะ, 2009) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยเฉพาะบริเวณยีน *trn*T (UGU) และ *trn*F (GAA) (Taberlet และคณะ, 1991)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของพืชสกุลมะเดื่อ ในประเทศไทย และสายพันธุ์มะเดื่อฝรั่งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศโดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชเฉพาะสายพันธุ์มะเดื่ออุทุมพร (*F. racemosa*) ที่พบในประเทศไทย และสายพันธุ์มะเดื่อฝรั่ง (*F. carica*) ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศที่รวบรวม ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ในโครงการหลวงส่วนพระองค์ของสมเด็จ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction (PCR) และ DNA sequencing ตำแหน่งยีนบนคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA: cp DNA)

1.4 ทฤษฎี

1.4.1 ลักษณะทั่วไปของมะเดื่อ

Ficus หมายถึงพืชสกุลไทร-มะเดื่อ เป็นพืชสกุลใหญ่อีกสกุลหนึ่งในวงศ์ขนุน (Moraceae) ปัจจุบันมีรายงานว่าทั่วโลกมีพืชสกุลนี้อยู่ประมาณ 750-1,000 ชนิด โดยกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนทุกภูมิภาคทั่วโลก และมีความหลากหลายมากที่สุดในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยมีประมาณ 80-100 ชนิด พืชสกุลนี้มีความสาคัญ คือเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่า และแหล่งอาหารหลักของสัตว์ป่าหลายชนิด เช่น ลิง กระรอก ค้างคาว และนกนานาชนิด

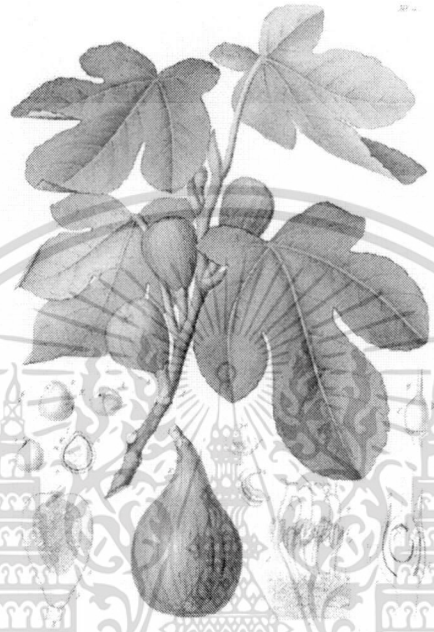
ไทรและมะเดื่อจัดเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศ (Unisexual) อยู่ร่วมกันเป็นช่อดอกแบบปิด เรียกว่า syconium หรือ fig ซึ่งพืชสกุลนี้จำแนกได้เป็นสองกลุ่มชัดเจน โดยอาศัยการเกิดเพศของดอก โดยกลุ่มที่มีดอกแยกเพศอยู่ร่วมต้นเดียวกันเรียกว่า monoecious fig และดอกแยกเพศอยู่คนละต้นกันเรียกว่า dioecious fig คือต้นเพศผู้ (male tree) และต้นเพศเมีย (female tree) อยู่แยกกัน ในประเทศไทยพืชสกุลไทร - มะเดื่อ มีความหลากหลาย เช่น ไทร, กร่าง, ไกร, ไทรย้อย, ไทรย้อยใบแหลม, โพธิ์, มะเดื่ออุทุมพร, มะเดื่อหอม, มะเดื่อปล้อง และมะเดื่อฝรั่ง นั้น การเรียกชื่อแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ มะเดื่อ และไทร โดยในกลุ่มมะเดื่อส่วนใหญ่จะเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่คนละต้น หรือ dioecious fig ยกเว้นมะเดื่ออุทุมพร (*F. racemosa*) และในกลุ่มไทรจะเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่ร่วมต้นเดียวกัน

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคนไทยนิยมใช้พืชสมุนไพรเป็นอาหารและรักษาโรคต่างๆอย่างกว้างขวาง พืชสกุลไทร – มะเดื่อนำมาใช้ประโยชน์เช่นกัน เช่น ยอดอ่อนของมะเดื่ออุทุมพร มีสรรพคุณในการรักษาโรค เปลือกใช้แก้ท้องร่วง สมานแผล รากใช้แก้ไข้ ขับเสมหะ ใบนำไปผสมกับน้ำผึ้งรับประทานสามารถรักษาโรคตับ ใบมะเดื่อฝรั่งมีสารประเภท phenolics ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Lansky และคณะ, 2008) และที่สำคัญคือผลของมะเดื่อฝรั่งมีคุณค่าทางอาหารสูง ทั้งมีสารป้องกันอนุมูลอิสระ มีแร่ธาตุและวิตามินสูง จึงมีการนำเข้า และส่งเสริมการปลูกเพื่อให้เป็นพืชเศรษฐกิจ

มะเดื่อ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ficus carica* L. อยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นพืชประเภทไม้ยืนต้นขนาดกลางที่มีการปลูกกันมาก ทางตะวันตกของทวีปเอเชีย ส่วนการปลูกที่เป็นการค้าของโลกจะอยู่ในแถบลุ่มแม่น้ำเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอิตาลี โปรตุเกส สเปน ตุรกี และกรีซ บางพันธุ์สามารถปลูกได้ในแคลิฟอร์เนียทางใต้ และพื้นที่แห้งแล้งของประเทศสหรัฐอเมริกา โดยทั่วไปมะเดื่อจะมีลำต้นจะเป็นเนื้อไม้สีอ่อนที่แยกหลุดออกได้ง่าย ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ส่วนใหญ่ขอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบหยักลึก 3-5 หยัก ภายในต้นเดียวกันสามารถมีรูปร่างใบได้หลายแบบ มีความหนา และค่อนข้างแข็ง ก้านใบที่อยู่ในพื้นที่ร่มจะมีความยาวกว่าส่วนที่อยู่ในพื้นที่กลางแจ้ง (ดังรูปที่ 1.1) (http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04-plant/Narongchai/plant_00.html)



รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานของมะเดื่อฝรั่ง

ที่มา :http://www.meemelink.com/prints%20pages/21942.Moraceae%20-20Ficus%20carica.htm

1.4.2 คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

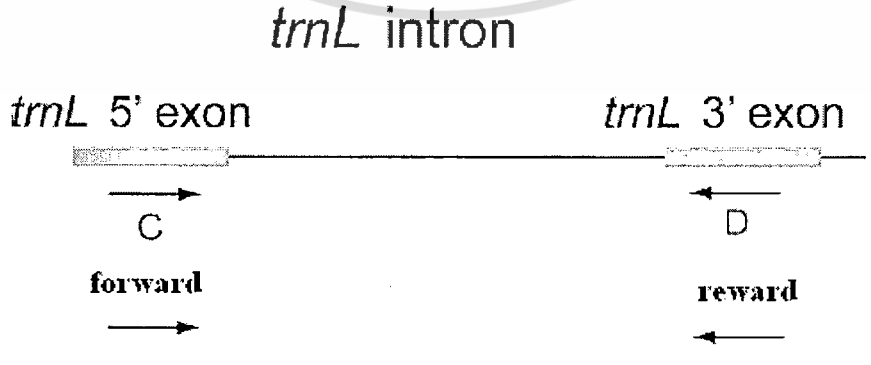
ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA; cpDNA) ประกอบด้วยดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่ในพืชชั้นสูงมีดีเอ็นเอยาวประมาณ 120 - 160 กิโลเบส ในเซลล์แต่ละชนิดมีจำนวนโมเลกุลของดีเอ็นเอและจำนวนโมเลกุลของคลอโรพลาสต์แตกต่างกันไป ในปัจจุบันนิยมหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของพืชดอก Taberlet และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาไพรเมอร์ขึ้นมาใหม่ (universal primer) เพื่อใช้ในการจำแนกพืช โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอของ tobacco, marchantia และ rice บริเวณยีน *trn*T (UGU) และ *trn*F (GAA) ซึ่งเป็น single-copy region ขนาดใหญ่ที่มีความจำเพาะ และพบว่ายีน *trn* เป็นยีนอนุรักษ์ เมื่อออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน tRNA 6 ชนิด คือ a, b, c, d, e, และ f ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ แสดงดังตารางที่ 1 โดยไพรเมอร์ a และ b ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(UGU) และ *trn*L (UAA) 5'exon ไพรเมอร์ c และ d ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon และไพรเมอร์ e และ f ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*L (UAA) 3'exon และ *trn*F (GAA) โดยขนาดของ PCR product ในพืชชนิด tobacco, marchantia และ rice ที่พบมีขนาด 773, 833 และ 251 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ a และ b มีขนาด 577, 614 และ 389 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ c และ d และมีขนาด 438, 324 และ 158 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ e และ f และเมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน algae, bryophytes, pteridophytes, gymnosperms และ angiosperm จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ c และ d สามารถจำแนกพืชดังกล่าวได้มากชนิดที่สุด คือจำแนกได้ถึง 15 ใน 19 สายพันธุ์ จึงนิยมนำไพรเมอร์ c และ d มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของพืช ดังแสดงตำแหน่งของการจับของไพร์เมอร์ c และ d ดังรูปที่ 1.2

ตารางที่ 1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

Name	sequence 5' – 3'
a	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
f	ATTTGAACTGGTGACACGAG



รูปที่ 1.2 แสดงตำแหน่งการจับของไพร์เมอร์ c และ d ในยีนบริเวณ *trnL* intron
ที่มา : http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/chlDNA.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หลักการพื้นฐานของการจำลองดีเอ็นเอ (DNA Replication) เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่จากสายดีเอ็นเอต้นแบบให้ได้จำนวนมากด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ในหลอดทดลอง โดยนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของการศึกษาหาความหลากหลาย และเครื่องหมายทางโมเลกุลของพืชในสกุล *Ficus* นั้นมีผู้ทำการศึกษาไว้หลายเทคนิค ดังนี้

Cabrita และคณะ (2001) ใช้ isozymes, RAPD และ AFLP เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *F. carica* ในประเทศตุรกี โดยทำการคัดเลือกตัวอย่างจากสายพันธุ์ Sarilop จำนวน 11 ตัวอย่าง และจากสายพันธุ์ Sarizeybek จำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่า เครื่องหมายทางโมเลกุลชนิด isozymes สามารถแบ่ง *F. carica* ออกเป็น 2 กลุ่มตามชนิดของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา คือ Sarilop และ Sarizeybek สำหรับเทคนิค RAPD ที่ใช้ไพร์เมอร์จำนวน 31 ไพรเมอร์ สามารถแยกสายพันธุ์ Sarilop จำนวน 11 ตัวอย่าง ออกเป็น 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน แต่ไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างได้ทั้งหมด รวมทั้งเทคนิค AFLP ชนิดเอนไซม์ EcoRI/MseI จำนวน 8 ชุดไพรเมอร์ สามารถแยกสายพันธุ์ Sarilop แต่ละตัวอย่างได้

Salhi-Hannachi และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของ *F. carica* จำนวน 35 ตัวอย่าง จากประเทศตูนิเซีย โดยเก็บตัวอย่างมาจาก 3 แหล่ง คือ Chott Mariem, Medenine และ Degache แบ่งเพศเป็น common fig จำนวน 31 ตัวอย่าง และ caprifigs (male tree) จำนวน 4 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 9 ชนิด แต่มีเพียง 6 ชนิด คือ OPA01, OPA02, OPA05, OPA11, OPA16 และ OPA18 ที่สามารถให้แถบที่ให้ความแตกต่าง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มหลัก โดยกลุ่มแรก (a) ประกอบด้วย 3 ตัวอย่าง คือ Bither Abiadh, Dchiche Assal และ Hammouri ในกลุ่มที่ 2 (b) ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ c และ d โดยส่วนใหญ่ตัวอย่างที่มาจากแหล่งเดียวกันจะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และในตัวอย่างที่มีชื่อเดียวกัน แต่มาจากคนละแหล่งจะแยกจากกัน รวมทั้งชื่อต่างกันแต่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน เช่น Soltani และ Khahli และการแบ่งกลุ่มไม่เป็นไปตามลักษณะการบ่งบอกเพศของพืช

Sadder และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *F. carica* จำนวน 23 ตัวอย่าง จากประเทศจอร์แดน ซึ่งแบ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเพาะปลูกจำนวน 5 สายพันธุ์, สายพันธุ์นำเข้ามาเพาะปลูก 1 สายพันธุ์, สายพันธุ์พื้นเมือง 15 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ wild types 2 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 19 ชนิด แต่มีเพียง 6 ชนิด ที่สามารถให้แถบที่ให้ความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chatti และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *F. carica* จำนวน 17 ตัวอย่าง จากประเทศตูนิเซีย ด้วยเทคนิค ISSR และ Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMPO) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่มหลัก โดยไม่สัมพันธ์กับเพศของพืช

Guasmi และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *F. carica* จำนวน 57 สายพันธุ์ โดยใช้ ISSR เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุล เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ซึ่งในกลุ่ม 4 มีเพียงสายพันธุ์ Sawoudi แยกออกมาเพียงสายพันธุ์เดียว (monophyletic)

Fang และคณะ (2007) ใช้เทคนิค AFLP เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลในการจำแนกพืชในสกุล *Ficus* จำนวน 56 ตัวอย่าง โดยการคัดกรองด้วยไพรเมอร์ 48 ชุด มีเพียง 6 ชุด ที่ให้ลักษณะความแตกต่างชัดเจน เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้ 12 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มเป็นไปตามสปีชีส์ของพืช คือ *F. altissima*, *F. benjamina*, *F. neriifolia*, *F. binnendykii*, *F. microcarpa*, *F. elastica*, *F. deltoidea*, *F. lyrata*, *F. subulata*, *F. carica*, *F. pumila* และ *F. sagittata*

Rout และคณะ (2009) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Ficus* จำนวน 23 สายพันธุ์ จาก 18 สปีชีส์ โดยใช้ ISSR เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุล ด้วยการคัดกรองไพรเมอร์จำนวน 21 ไพรเมอร์ กับพืชสกุล *Ficus* จำนวน 3 สปีชีส์ (*F. religiosa*, *F. elstica* "Rubra" และ *F. mollis*) มีเพียง 5 ไพรเมอร์ที่ให้แถบชัดเจน เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาหาความสัมพันธ์สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยการแบ่งกลุ่มมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Baraket และคณะ (2009a) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *F. carica* จำนวน 40 สายพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมจาก 5 ภูมิภาคในประเทศตูนิเซีย เมื่อนำมาศึกษาด้วยวิธี AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์พบว่าสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกมีเพียงสายพันธุ์ Makhbech แยกออกมาเพียงสายพันธุ์เดียว (monophyletic) และในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ Zaghoubi และ Baghli ที่มาจากต่างพื้นที่กัน และที่สายพันธุ์ที่เหลืออยู่ในกลุ่มที่ 3 โดยการแบ่งกลุ่มไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่มา และลักษณะเพศของพืช

Baraket และคณะ (2009b) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *F. carica* ด้วยวิธี PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง internal transcribed spacers (ITSs) ของ nuclear ribosomal DNA (nrDNA) จำนวน 12 สายพันธุ์ จากประเทศตูนีเซีย ซึ่งเป็น common fig จำนวน 11 ตัวอย่าง และ caprifigs จำนวน 1 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ 5'-AAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3' และ 5'-TATGCTTAAACTCCAGCGGG-3' ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยในกลุ่มแรกมีเพียงสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ Bither abiadh เพียงสายพันธุ์เดียว และในกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยการแบ่งกลุ่มไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่มา และลักษณะเพศของพืช

Baraket และคณะ (2009c) ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *F. carica* ด้วยวิธี PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *trnL-trnF* ใน chloroplast DNA (cpDNA) ด้วยไพรเมอร์ชนิด e: 5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3' และ f: 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3' ของ *F. carica* จำนวน 20 สายพันธุ์ จากประเทศตูนีเซีย โดยมาจากภาคตะวันออกเฉียงใต้และกลางจำนวน 12 ตัวอย่าง และภาคตะวันตกเฉียงใต้จำนวน 8 ตัวอย่าง และเมื่อแบ่งตามลักษณะเพศแบ่งเป็นต้นเพศเมียจำนวน 18 ตัวอย่าง และต้นเพศผู้จำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่ามีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 500 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทั้งวิธี Maximum Parsimony (MP) และ Neighbor-Joining (NJ) นั้นให้ผลแตกต่างกันเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยความสัมพันธ์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Parsimony นั้น ในกลุ่มแรกมีเพียงสายพันธุ์ Khalt เพียงสายพันธุ์เดียว และในกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย Sawoudi แสดงความแตกต่างจาก 18 ตัวอย่าง และ Zidi และ Dchiche Assal มีความใกล้ชิดกัน โดยการแบ่งกลุ่มไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่มา และลักษณะเพศของพืช

Baraket และคณะ (2010) ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *F. carica* จำนวน 20 สายพันธุ์ จากประเทศตูนีเซีย ทั้งภาคใต้และกลาง ด้วยวิธี PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ระหว่าง *trnL* (UAA) 5' exon และ *trnL* (UAA) 3'exon ด้วยไพรเมอร์ c (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') และไพรเมอร์ d (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') และ trnL–trnF intergenic spacer ระหว่าง 3' exon ของ *trnL* (UAA) และ *trnF* (GAA) ด้วยไพรเมอร์ e (5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3') และไพรเมอร์ f (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3')ในตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 554 คู่เบส (Zidi2) ถึง 589 คู่เบส (Hammouri) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่ม 1 ประกอบด้วย 4 ตัวอย่าง คือสายพันธุ์ Khalt, Widlani, Hammouri และ Tounsi

Podgornik และคณะ (2510) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *F. carica* โดยการเก็บตัวอย่างจำนวน 38 ตัวอย่าง จากสาธารณรัฐสโลวีเนีย ใน 2 บริเวณ คือ ด้านตะวันตกเฉียงใต้ (Slovene Istria) และด้านในของชายฝั่ง (hinterland zone) จำนวน 25 ตัวอย่าง และสาธารณรัฐโครเอเชีย จำนวน 13 ตัวอย่าง ทำการศึกษาลักษณะต่างๆทางสัณฐานวิทยาจำนวน 74 ลักษณะ เช่น การเพาะปลูก การออกผล ลักษณะ น้ำหนัก และสีของผล และลักษณะของใบ เป็นต้น โดยพบว่าลักษณะของการเกิดรอยหยักของใบ (lobe) โดยส่วนใหญ่มี 3 และ 5 หยัก แต่มีบางสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายตั้งแต่ 3-5, 3-7 หรือ 0-7 หยัก และพื้นที่ใบมีความหลากหลายมาก ซึ่งการศึกษาความหลากหลายของใบนั้นเป็นไปได้ยากเนื่องจากมีความหลากหลายสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chatti และคณะ (2010) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *F. carica* จำนวน 17 ตัวอย่าง จากประเทศตูนิเซีย ด้วยเทคนิค ISSR, RAPD และ RAMPO เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มหลัก โดยกลุ่มแรกนั้นประกอบด้วย Bither Abiadh2, Bither Abiadh3 และ Besbessi ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีผลสีเขียว และสามารถให้ผลผลิตปีละ 2 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างมะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) สายพันธุ์ต่างๆ จากพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ในโครงการหลวงส่วนพระองค์ของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี โดยตัวอย่างที่เก็บจะเป็นมะเดื่อฝรั่งสายพันธุ์ที่รวบรวมมาจากต่างประเทศ และตัวอย่างมะเดื่ออุทุมพร *(F. racemosa)* ที่เป็นพืชในสกุล *Ficus* ที่มีลักษณะเหมือนมะเดื่อฝรั่งมากที่สุด จากสถานที่ต่างๆ

2.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1.2.1 บีกเกอร์ (beaker)

2.1.2.2 กระบอกตวง (cylinder)

2.1.2.3 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

2.1.2.4 ปากคีบ (forcept)

2.1.2.5 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

2.1.2.6 ช้อนตักสารเคมี (spatular)

2.1.2.7 โกร่ง และที่บด (mortar and pestle)

2.1.2.8 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และทิป (tip) ขนาดต่างๆ

2.1.2.9 ตะเกียง (burner)

2.1.2.10 คิวเวท (cuvette)

2.1.2.11 ถังบรรจุไนโตเจนเหลว (liquid nitrogen tank)

2.1.2.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

2.1.2.13 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)

2.1.2.14 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

2.1.2.15 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)

2.1.2.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.1.2.17 เครื่องช่วยผสม (vortex)

2.1.2.18 เครื่องชั่ง (balance)

2.1.2.19 ไมโครเวฟ (microwave)

2.1.2.20 ชุดอุปกรณ์อะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.21 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

2.1.2.22 ชุดถ่ายภาพเจล (gel document)

2.1.2.23 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)

2.1.2.24 วัสดุอุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร อลูมิเนียมฟอยด์ และถุงมือยาง

2.1.3 วัสดุ และสารเคมี

2.1.3.1 เอทานอล (ethanol)

2.1.3.2 น้ำปราศจากไอออน (distilled water)

2.1.3.3 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.1.3.4 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชุด DNeasy plant mini kit ของบริษัท Qiagen

2.1.3.5 สารละลาย TE buffer (Tris EDTA buffer)

2.1.3.6 สารละลาย TBE buffer (Tris Borate EDTA buffer)

2.1.3.7 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide, dNTPs) ของบริษัท Roche

2.1.3.8 ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs

2.1.3.9 ไพร์เมอร์ (primer) 1 คู่ คือ ไพร์เมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพร์เมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet *et al.* (1991)

2.1.3.10 เจลอะกาโรส (agarose gel)

2.1.3.11 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromind)

2.1.3.12 สีย้อม (dye)

2.1.3.13 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 เก็บตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ใบอ่อนจำนวน 1-2 ใบ ของมะเดื่อฝรั่งสายพันธุ์ต่างๆ ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี รวมทั้งตัวอย่างมะเดื่ออุทุมพร *(F. racemosa)* นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ

2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบที่เก็บมาได้มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำมาบดโดยไนโตรเจนเหลว พร้อมทั้งตักตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis, Malaysia) โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ คือ เติม Buffer PL ปริมาตร 280 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องผสม (vortex) หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยขณะบ่มให้กลับหลอดไปมาในทุกๆ 15-30 นาที จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หรือไม่สังเกตเห็นเนื้อเยื่อของตัวอย่าง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมเอนไซม์ Rnase A (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม Buffer PB ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสรวมกับเอนไซม์ RNase A หรือปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกันโดยการกลับหลอดไปมา และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม absolute ethanol 99.7 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ย้ายส่วนใสลงในคอลัมม์ที่มี Collection tube รองรับ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวที่อยู่ใน Collection tube เททิ้ง ทำซ้ำจนตัวอย่างหมด ล้างคอลัมม์ด้วย Wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างจนกว่าเมมเบรนสะอาด นำคอลัมม์ที่ไม่มีสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมม์ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เติม Elution buffer ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50-100ไมโครลิตร ให้ท่วมเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถึง -20 องศาเซลเซียส

นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทางด้านคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า กระแสไฟฟ้า 100 โวตต์ พร้อมทั้งเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ขนาด 10,000 คู่เบส หรือ λ Hind III หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และดูแผ่นเจลภายใต้แสงยูวีจากเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านปริมาณทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง *trn*L intron ระหว่าง *trn*L (UAA) 5'exon และ *trn*L (UAA) 3'exon ด้วยคู่ไพร์เมอร์ c (CGAAATCGGTAGACGCTACG) และไพร์เมอร์ d (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) ตาม Taberlet และคณะ (1991) โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพร์เมอร์ c และ d (Invitrogen) ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล (*p*M) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product จากทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส เก็บรักษา PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.4 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำ PCR product ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Tech Dragon Limited เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจัดจำแนกกลุ่ม วิเคราะห์หา phylogenetic tree ทั้งเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ภายในสกุลเดียวกัน คือ มะเดื่ออุทุมพร *(F. racemosa)* และสายพันธุ์ของมะเดื่อฝรั่งจากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 2.1) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบ และแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip package version 3.6 ที่รวมการใช้งานหลายโปรแกรม คือ Seqboot, Dnadist, Neighbor และ Consense ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้วิธี Neighbor-joining เมื่อได้ phylogenetic tree จึงกำหนดรูปแบบแผนภูมิด้วยโปรแกรม Tree view version 1.6.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 รายละเอียดตัวอย่าง *F. carica* จากฐานข้อมูล GenBank ที่นำใช้ในเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Locus	Cultivar
EU191024	Khalt
EU191023	Sawoudi
EU191020	Dchiche Assal
EU191017	Bither Abiadh
EU191014	Grichy
EU191005	Zidi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ผล และอภิปรายผลการทดลอง

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

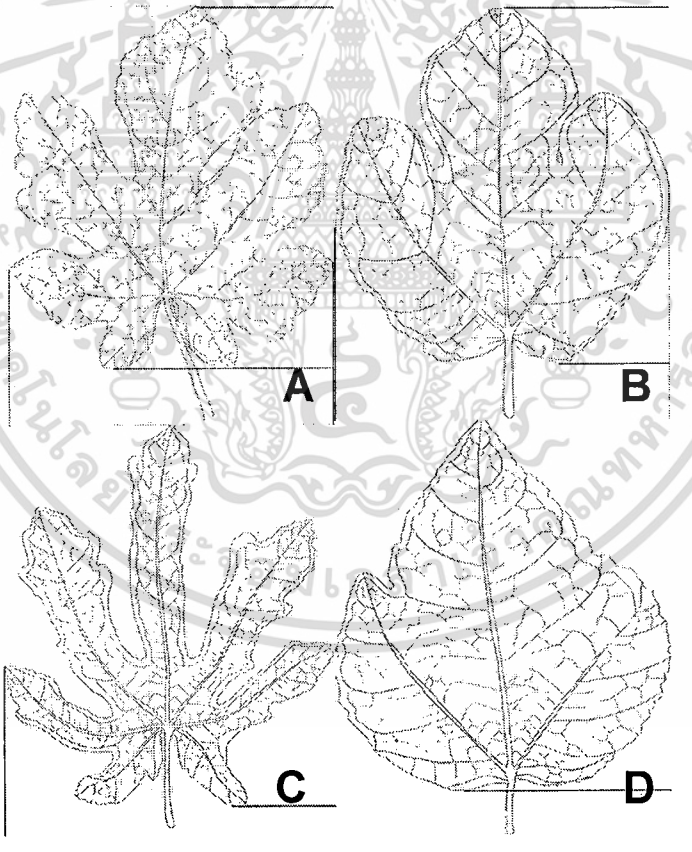
เก็บรวบรวมตัวอย่างมะเดื่อฝรั่ง (*F. carica*) สายพันธุ์ต่างๆ ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ ทั้งหมด 32 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่เก็บจะเป็นมะเดื่อฝรั่งสายพันธุ์ที่รวบรวมจากต่างประเทศ ดังสรุปในตารางที่ 3.1 และมะเดื่ออุทุมพร *(F. racemosa)* เพียง 1 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครราชสีมา

ตารางที่ 3.1 แสดงรหัส และสายพันธุ์ของมะเดื่อฝรั่งที่ใช้ในการวิจัย

รหัส	สายพันธุ์	รหัส	สายพันธุ์
FC 001	Fracazzano	FC 020	Bianchi guido
FC 002	Kadoto หรือ Dotlato	FC 022	Back mission
FC 003	Horai	FC 023	Magnolia
FC 004	Black genoa	FC 024	Ghosh
FC 005	Brown turkey	FC 025	L.S.U Gold
FC 006	Lisa	FC 026	Vern's brown turkey
FC 009	Sugar	FC 027	Fico Genoverse
FC 010	Celeste	FC 028	Black Jack
FC 012	Fico gentile	FC 029	Latarulla
FC 013	Paradiso nero (black)	FC 030	Deanna
FC 014	Ventura	FC 031	Desert king
FC 015	Fico umbrella	FC 032	Schar amber
FC 016	Isfahan	FC 033	Stanford
FC 017	Qila saif	FC 034	Marylane seedless
FC 018	Gilette	FC 035	Adriano
FC 019	Schar italian	FC 036	Bifara

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่าง และจดบันทึกลักษณะต่างๆของใบมะเดื่อฝรั่ง ทั้งรูปร่างลักษณะของใบ ขนาดของใบ ลักษณะของผิวใบ ลักษณะของแผ่นใบ จำนวนเส้นก้านใบ สีของใบ การจัดเรียงของเส้นใบ ตามหลักการจัดจำแนกของชุมพล (2551) พบว่ามะเดื่อฝรั่งมีการเรียงตัวของใบบนกิ่งเป็นแบบสลับ ลักษณะของผิวใบมีผิวใบเรียบและมีขน ลักษณะเนื้อใบคล้ายกระดาษ การจัดระเบียบของเส้นใบเป็นการเรียงเส้นใบย่อยแบบร่างแห แต่มีลักษณะของแผ่นใบแตกต่างกันออกไป เช่น แผ่นใบมีลักษณะของปลายใบแบบปลายมน หรือแหลม โคนใบเป็นรูปติ่งหู และขอบใบไม่เรียบมีลักษณะเป็นขอบหยักลึกประมาณ 4 หยัก (รูปที่ 3.1 A) แผ่นใบมีลักษณะของปลายใบแบบปลายมน โคนใบเป็นลักษณะรูปหัวใจ และขอบใบมีลักษณะเป็นรอยหยักลึกน้อยประมาณ 2 หยัก (รูปที่ 3.1 B) ลักษณะของแผ่นใบมีลักษณะของปลายใบแบบปลายแหลม โคนใบเป็นรูปเงี่ยงใบหอก และขอบใบมีลักษณะไม่เรียบและมีรอยหยักลึกมากประมาณ 4 หยัก จนมีลักษณะเป็นแฉก (รูปที่ 3.1 C) รวมทั้งมีลักษณะของแผ่นใบแบบปลายแหลม โคนใบรูปหัวใจ และขอบใบเรียบมีลักษณะเป็นรอยหยักเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 3.1 D)



รูปที่ 3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *F. carica* A: โคนใบเป็นรูปติ่งหู ขอบใบมีรอยหยักลึก, B: โคนใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบมีรอยหยักลึกน้อย, C: โคนใบเป็นรูปเงี่ยงใบหอก ขอบใบมีรอยหยักลึกมาก และ D: โคนใบรูปหัวใจ ขอบใบมีรอยหยักเพียงเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จากการศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ในการศึกษาครั้งนี้พบลักษณะสอดคล้องกับ Podgornik และคณะ (2510) ที่พบว่าลักษณะของการเกิดรอยหยักของใบ (lobe) นั้นส่วนใหญ่มี 3 และ 5 หยัก แต่มีบางสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายตั้งแต่ 3-5, 3-7 หรือ 0-7 หยัก ซึ่งมีความหลากหลายสูง จึงควรมีการศึกษาลักษณะอื่นๆ ร่วมด้วย

3.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

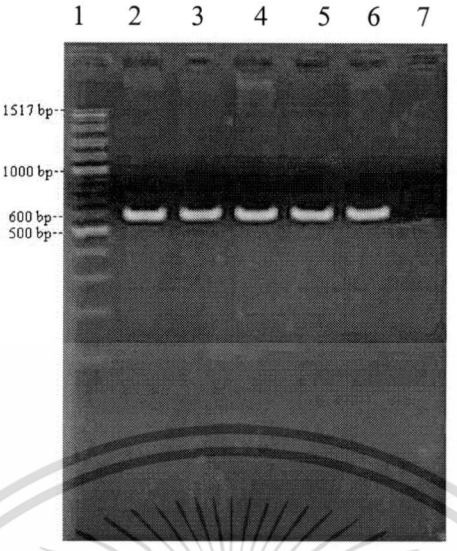
3.2.1 ผลการเพิ่มป ริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมะเดื่อฝรั่งทั้งหมด 32 สายพันธุ์ มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ระหว่าง *trnL* (UAA) 5' exon และ *trnL* (UAA) 3'exon ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ c ซึ่งมีลำดับเบส 5′-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3′ และไพรเมอร์ d ซึ่งมีลำดับเบส 5′-GGGGATAGAGGGACTTGAAC- 3′ ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง *trnL* ได้ โดยที่ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 คู่เบส ดังแสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสของตัวอย่าง FC 001 Fracazzano, FC 002 Kadoto หรือ Dotlato, FC 003 Horai, FC 004 Black genoa และ FC 005 Brown turkey ในเลนที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ ในรูปที่ 3.2 โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (เลนที่ 1) และ negative control คือชุดที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ (เลนที่ 7) แต่สำหรับมะเดื่ออุทุมพรไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง *trnL* ด้วยไพรเมอร์ c และ d ได้

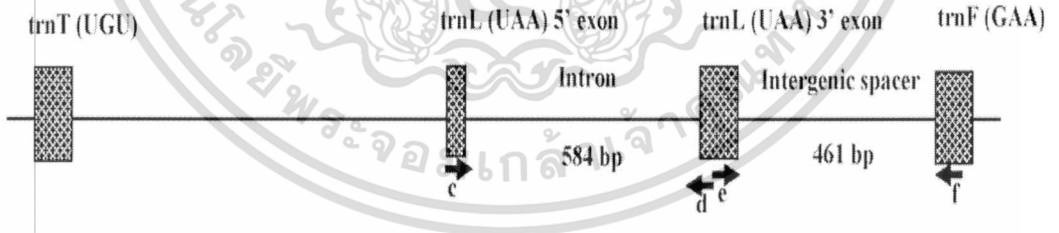
จากผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทำเทคนิคพีซีอาร์ในตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ระหว่าง *trnL* (UAA) 5' exon และ *trnL* (UAA) 3'exon จะได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันทุกตัวอย่าง ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอใกล้เคียงกับยาสูบที่มีขนาดประมาณ 577 คู่เบส (Taberlet และคณะ, 1991) รวมทั้งใน *F. carica* จากประเทศตูนีเซีย ที่ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 554 คู่เบส (Zidi2) ถึง 589 คู่เบส (Hammouri) (Baraket และคณะ, 2010) ที่ใช้ไพรเมอร์ c และ d ดังรูปที่ 3.2 และนำ PCR product วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Tech Dragon Limited) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยชีววิทยาสารสนเทศต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

116838



รูปที่ 3.2 ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง *trn L* โดย เลนที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, เลนที่ 2 คือ FC 001 Fracazzano, เลนที่ 3 คือ FC 002 Kadoto หรือ Dotlato, เลนที่ 4 คือ FC 003 Horai, เลนที่ 5 คือ FC 004 Black genoa, เลนที่ 6 คือ FC 005 Brown turkey และเลนที่ 7 คือ negative (ชุดที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ)

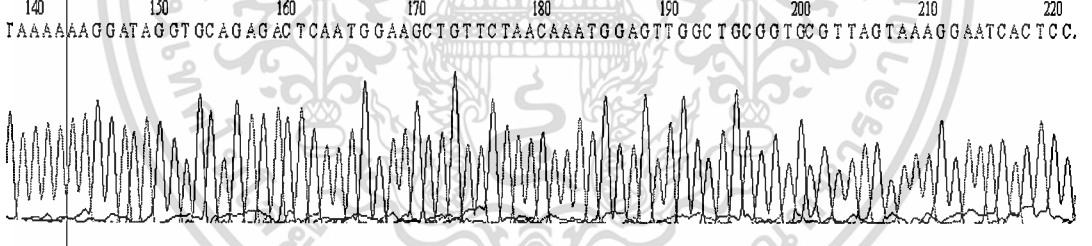


รูปที่ 3.3 โครงสร้างของบริเวณ *trnT* (UGU) – *trnF* (GAA) ที่ประกอบด้วยตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ระหว่าง *trnL* (UAA) 5' exon และ *trnL* (UAA) 3'exon และ *trnL–trnF* intergenic spacer ระหว่าง 3' exon ของ *trnL* (UAA) และ *trnF* (GAA) ตำแหน่งของไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product (Baraket และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 ความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ c และไพรเมอร์ d เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบความถูกต้องโดยตรวจดู profile ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้ง 32 สายพันธุ์ ดังพีคตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของตัวอย่าง FC 013 Paradiso nero (black) (รูปที่ 3.4) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันสายพันธุ์ พบว่าในทุกตัวอย่างเป็น *F. carica* ในสายพันธุ์ต่างๆ โดยมีค่าความเหมือน 99-100% เมื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ Phylogenetic tree โดยโปรแกรม Bioedit ซึ่งเป็นการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้น เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ขนาด 515 คู่เบส มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip ที่ประกอบด้วยโปรแกรม Seqboot, Dnadist, Neighbor และ Consense ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้การวิเคราะห์ด้วยพารามิเตอร์ Neighbor-joining เมื่อได้ phylogenetic tree จึงกำหนดรูปแบบแผนภูมิด้วยโปรแกรม Tree view



รูปที่ 3.4 พีคตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ FC 013 Paradiso nero (black)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้ง 32 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ของมะเดื่อฝรั่งจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ Khalt (EU191024), Sawoudi (EU191023), Dchiche Assal (EU191020), Bither Abiadh (EU191017), Grichy (EU191014) และ Zidi (EU191005) มาวิเคราะห์ และแสดง phylogram ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยกลุ่มแรกมีเพียงสายพันธุ์ Khalt (EU191024) แยกออกมาเพียงสายพันธุ์เดียว (monophyletic) และในกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่ง Sawoudi (EU191023) แสดงความแตกต่างจากตัวอย่างที่เหลือ หรือแยกเป็นกลุ่มย่อยแรก โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 32 สายพันธุ์ และ Dchiche Assal (EU191020), Bither Abiadh (EU191017), Grichy (EU191014) และ Zidi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

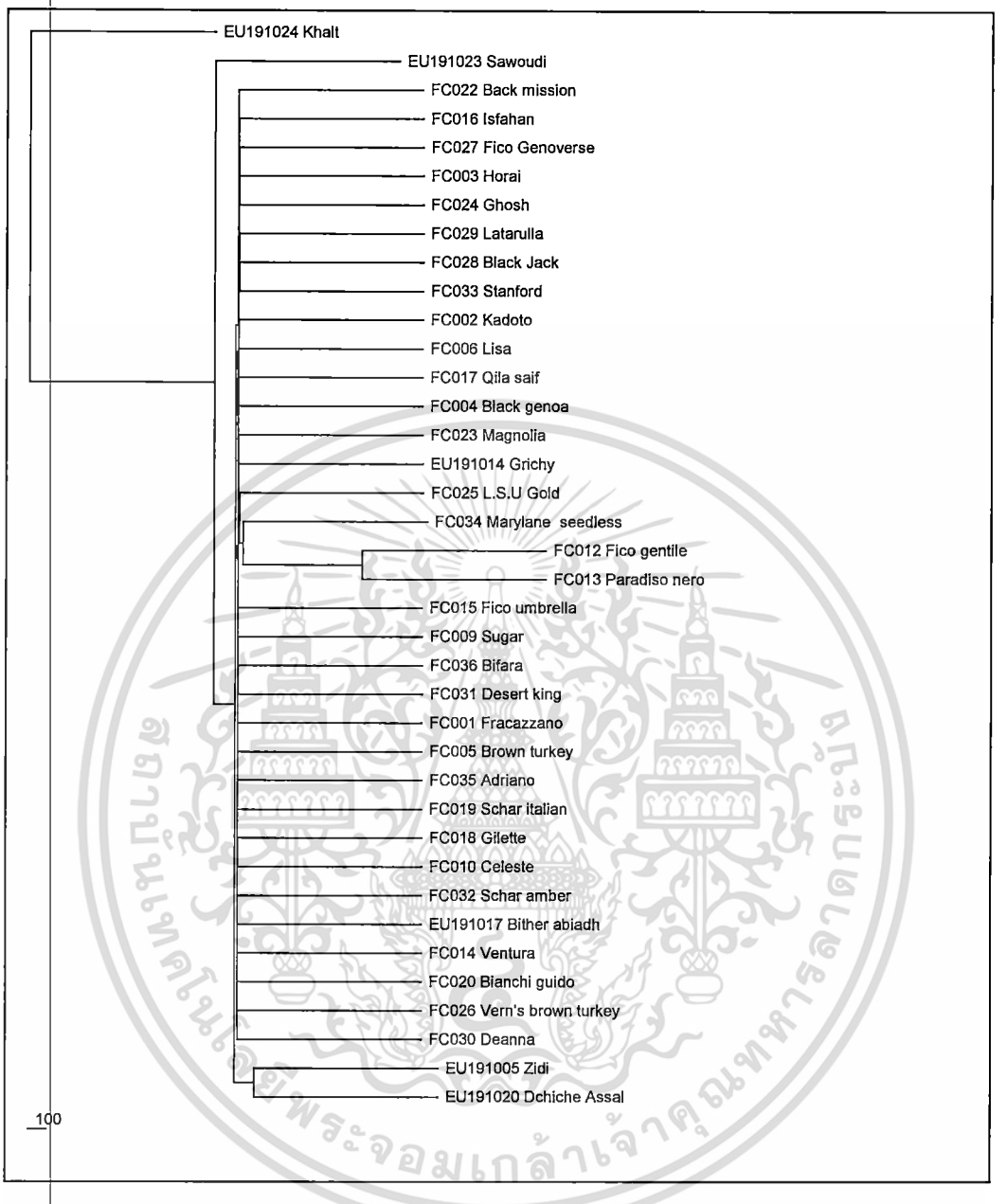
(EU191005) อยู่ในกลุ่มย่อยที่สอง โดย Zidi (EU191005) และ Dchiche Assal (EU191020) แสดงความใกล้ชิดกัน รวมทั้ง FC 012 Fico gentile และ FC 013 Paradiso nero (black) ที่แสดงความใกล้ชิดกัน

จากความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุลของ FC 012 Fico gentile และ FC 013 Paradiso nero (black) ที่แสดงความใกล้ชิดกัน อาจแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปได้ รวมทั้งการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าแม้สายพันธุ์ของ *F. carica* ที่นำมาจากประเทศต่างๆ จำนวน 32 สายพันธุ์ ที่มีความหลากหลายของลักษณะของใบยังแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรม อาจมีผลมาจากในการปรับปรุงพันธุ์ของ *F. carica* เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์เพื่อการเพาะปลูกทั้งให้ได้ความหลากหลายของผลผลิต และเหมาะกับสภาพภูมิประเทศแต่ละที่ ลูกผสมที่ได้ก็จะมีการตั้งชื่อใหม่ที่เพิ่มมากขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 32 สายพันธุ์ และจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 6 สายพันธุ์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Salhi-Hannachi และคณะ (2006) ที่ศึกษาในตัวอย่าง *F. carica* จำนวน 35 ตัวอย่าง จากประเทศตูนิเซีย ด้วยเทคนิค RAPD หรือการศึกษาของ Baraket และคณะที่ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS ของ nrDNA จำนวน 12 สายพันธุ์ จากประเทศตูนีเซีย (Baraket และคณะ, 2009b) ตำแหน่ง *trnL-trnF* (Baraket และคณะ, 2009c) และตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron ใน cpDNA จาก *F. carica* จำนวน 20 สายพันธุ์ จากประเทศตูนีเซีย (Baraket และคณะ, 2010) รวมทั้งการศึกษาของ Chatti และคณะ (2010) ที่ศึกษาด้วยเทคนิค ISSR, RAPD และ RAMPO ใน *F. carica* จำนวน 17 ตัวอย่าง

ในการแบ่งตัวอย่างจำนวน 38 สายพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยกลุ่มแรกมีเพียงสายพันธุ์ Khalt (EU191024) แยกออกมาเพียงสายพันธุ์เดียว (monophyletic) และในกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยมีสายพันธุ์ Sawoudi (EU191023) แยกเป็นกลุ่มย่อยแรก โดยตัวอย่างอีกจำนวน 36 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่มย่อยที่สอง และมีสายพันธุ์ Zidi (EU191005) และ Dchiche Assal (EU191020) แสดงความใกล้ชิดกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Baraket และคณะ (2009c) ที่พบว่า *F. carica* จำนวน 20 สายพันธุ์ จากแหล่งต่างๆในประเทศตูนีเซีย เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Parsimony สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยในกลุ่มแรกมีเพียงสายพันธุ์ Khalt เพียงสายพันธุ์เดียว และในกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดย Sawoudi แสดงความแตกต่างออกจาก 18 ตัวอย่าง และ Zidi และ Dchiche Assal แสดงความใกล้ชิดกัน แม้ว่าวิเคราะห์ในตำแหน่ง *trnL-trnF* ใน cpDNA ด้วยไพรเมอร์ต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 Phylogenetic tree ของ F. carica จำนวน 32 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากฐานข้อมูล GenBank ในบริเวณ *trnL* (UAA) intron โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining ที่มีค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ Baraket และคณะ (2010) วิเคราะห์ในตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron แม้ว่าจะแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มหลัก แต่ในกลุ่มที่ 1 จะประกอบด้วย 4 ตัวอย่าง คือสายพันธุ์ Khalt, Widlani, Hammouri และ Tounsi อาจเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *trnL* intron มีความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับต่ำ ดังที่ Quandt และ Stech (2005) กล่าวว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *trnL* intron บริเวณ motifs P, Q, R และ S จะเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง (highly conservation) จึงมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย

ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยมีสายพันธุ์ Sawoudi (EU191023) แยกเป็นกลุ่มย่อยแรก และตัวอย่างอีกจำนวน 36 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่มย่อยที่สอง จึงอาจกล่าวว่าในการศึกษาในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพร์เมอร์ชนิด c และ d มีข้อจำกัดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาตำแหน่งอื่นๆ ทั้งในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ เช่น ตำแหน่ง *trnT-L* intergenic spacer หรือ *trnK* intron และในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 รวมทั้งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอื่น เช่น RAPD หรือ RFLP เพื่อประกอบการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
สรุป และเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของมะเดื่ออุทุมพร (*F. racemosa*) ที่เก็บได้จากจังหวัดนครราชสีมา และสายพันธุ์มะเดื่อฝรั่ง (*F. carica*) ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และรวบรวม ณ พระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ในโครงการหลวงส่วนพระองค์ของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction (PCR) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron ด้วยคู่ไพรเมอร์ c และ d ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trn*L (UAA) 5'exon ถึง *trn*L (UAA) 3'exon สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *F. carica* จำนวน 32 ตัวอย่าง ได้ทุกตัวอย่างโดยมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *F. racemosa* ได้ เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันสายพันธุ์ พบว่าในทุกตัวอย่างเป็น *F. carica* ในสายพันธุ์ต่างๆ โดยมีค่าความเหมือน 99-100% เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. carica* จำนวน 32 สายพันธุ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. carica* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ Khalt (EU191024), Sawoudi (EU191023), Dchiche Assal (EU191020), Bither Abiadh (EU191017), Grichy (EU191014) และ Zidi (EU191005) มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยโปรแกรม Phylip ที่มีค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้การวิเคราะห์ด้วยพารามิเตอร์ Neighbor-joining จาก phylogram สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยกลุ่มแรกมีเพียงสายพันธุ์ Khalt (EU191024) แยกออกมาเพียงสายพันธุ์เดียว (monophyletic) และในกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่ง Sawoudi (EU191023) แยกเป็นกลุ่มย่อยแรก โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 32 สายพันธุ์ และ Dchiche Assal (EU191020), Bither Abiadh (EU191017), Grichy (EU191014) และ Zidi (EU191005) อยู่ในกลุ่มย่อยที่สอง โดย Zidi (EU191005) และ Dchiche Assal (EU191020) แสดงความใกล้ชิดกัน รวมทั้ง FC 012 Fico gentile และ FC 013 Paradiso nero (black) ที่แสดงความใกล้ชิดกัน แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่มีความหลากหลายในระดับสปีชีส์ต่ำ จึงอาจกล่าวได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *trn*L (UAA) intron มีความหลากหลายไม่เพียงพอกับการนำมาใช้หาความสัมพันธ์ในลำดับสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชุมพล คุณวาสี. 2551. สัณฐานวิทยาเบื้องต้นในการระบุชื่อวงศ์พืชดอกสามัญ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วัฒนา ตันมิ่ง และ ประนอม จันทรโณทัย. 2005. ความหลากหลายของพืชสกุลไทย (*Ficus* L.) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 37: 112-120.

Altschul, S.F., Warren, G., Webb, M., Eugene, W.M. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215: 403-410.

Baraket, G., Chatti, K., Saddoud, O., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M., and Salhi-Hannachi, A. 2009a. Genetic analysis of Tunisian fig (*Ficus carica* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Scientia Horticulturae 120: 487-492.

Baraket, G., Saddoud, O., Chatti K., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M. and Salhi-Hannachi, A. 2009b. Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.). Scientia Horticulturae 120: 34–40.

Baraket, G., Saddoud, O., Chatti, K., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M. and Salhi-Hannachi, A. 2009c. Chloroplast DNA analysis in Tunisian fig cultivars (*Ficus carica* L.): Sequence variations of the *trnL-trnF* intergenic spacer. Biochemical Systematics and Ecology. 36: 828–835.

Baraket, G., Abdelkrima, A.B., Saddoud, O., Chatti, K., Mars, M., M., Trifi, M. and Salhi-Hannachi, A. 2010. Molecular polymorphism of cytoplasmic DNA in *Ficus carica* L.: Insights from non-coding regions of chloroplast DNA. Scientia Horticulturae. 125: 512–517.

Cabrita Luis F., Aksoy U., Hepaksoy S. and Leitao Jose M. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. Scientia Horticulturae. 87: 261-273.

Chantarasuwan, B. and Kumtong, P. 2005. On two varieties of *Ficus hispida* L.f. (Moraceae) in Thailand. The Thailand Natural History Museum Journal. 1(1): 79-85.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chatti, K., Saddoud, O., Salhi-Hannachi, A., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M. 2007. Analysis of genetic diversity and relationships in a Tunisian fig (*Ficus carica*) germplasm collection by random amplified microsatellite polymorphisms. Journal of Integrative Plant Biology. 49: 386-391.

Chatti, K., Baraket, G., Abdelkrim, A.B., Saddoud, O., Mars, M., Trifi, M. and Salhi-Hannachi, A. 2010. Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (Ficus carica) cultivars. Biochemical Genetics. 48: 789–806.

Fang, J., Chen, J. and Henny, R.J. Chao, C.T. 2007. Genetic relatedness of ornamental *Ficus* species and cultivars analyzed by amplified fragment length polymorphism markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. 132(6):807–815.

Guasmi, F., Ferchichi, A., Farés, K. and Touil, L. 2006. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. African Journal of Biotechnology. 5: 1370-1374.

Lansky, E.P., Paavilainen, H.M., Pawlus, A.D., Newman, R.A., 2008. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. Journal of Ethnopharmacology. 119: 195-213.

Podgornik, M., Vuk, I., Vrhovnik, I. and Mavsar, D.B. 2010. A survey and morphological evaluation of fig (*Ficus carica* L.) genetic resources from Slovenia. Scientia Horticulturae. 125: 380–389.

Quandt, D and Stech, M. 2005. Molecular evolution of the *trnL*UAA intron in bryophytes. Molecular Phylogenetics and Evolution 36: 429-443.

Rout, G.R. and Aparajita, S. 2009. Genetic relationships among 23 *Ficus* accessions using inter-simple sequence repeat markers. Journal of Crop Science and Biotechnology. 12: 91- 96.

Sadder, M.T. and Ateyyeh, A.F. 2006. Molecular assessment of polymorphism among local Jordanian genotypes of the common fig (*Ficus carica* L.). Scientia Horticulturae. 107: 347-351.

Salhi-Hannachi, A., Chatti, K., Saddoud, O., Mars, M., Rhouma, A., Marrakchi, M. and Trifi, M. 2006. Genetic diversity of different Tunisian fig (*Ficus carica* L.) collections revealed by RAPD fingerprints. Hereditas, 143: 15-22.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology. 17: 1105-1109.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weiblen, G.D., 2000. Phylogenetic relationships of functionally diocious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology. American Journal of Botany. 87: 1342–1357.

[Online].Available: http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04-plant/Narongchai/plant_00.html

[Online].Available: http://www.meemelink.com

[Online].Available: http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/chlDNA.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้