สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

IDENTIFICATION OF OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.) USING RAPD TECHNIQUE

ธนวัฒน์ ชูช่อ

THANAWAT CHUCHOR

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49665
วัน, เดือน, ปี 12 มี.ค. 2547

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชไร่

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-215-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IDENTIFICATION OF OIL PALM (*Elaeis guineensis* Jacq.) USING RAPD TECHNIQUE

THANAWAT CHUCHOR

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRONOMY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2003

ISBN 974-324-215-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี
นักศึกษา	นายธนวัฒน์ ชูช่อ
รหัสประจำตัว	41066102
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	พืชไร่
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์
	ผศ.ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม

บทคัดย่อ

ปัญหาของการปลูกปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ในประเทศไทย คือ พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะปลูกไม่ใช่พันธุ์ลูกผสมเทเนร่า (Tenera) แท้ ซึ่งทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำ ดังนั้นวิธีการในการตรวจสอบต้นกล้าเพื่อให้ได้พันธุ์แท้จึงมีความจำเป็น ซึ่งวิธีการดังกล่าว ได้แก่ การใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA; RAPD) จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคอาร์เอพีดีประกอบด้วย การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมันโดยใช้ SDS buffer (ตามวิธีการดัดแปลงของ Dellaporta *et al.* 1983) จากนั้นหมุนเหวี่ยงแยกดีเอ็นเอโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) คือใช้ $MgCl_2$ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์, primer เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase 0.4 ยูนิต, และ ดีเอ็นเอแม่แบบ 20 นาโนกรัม ในขั้นตอนสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเครื่อง DNA thermal cycler ใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส 1 นาที, และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 45 cycles แล้วบ่มในรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากสังเคราะห์ดีเอ็นเอแล้วทำการตรวจสอบผลโดยใช้ agarose gel เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟ 80 โวลต์ ตามด้วยการย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ขนาด 10-mer oligonucleotideได้ 14 ชนิด (OPA11, OPA17, OPC07, OPC08, OPC15, OPD01, OPD03, OPD12, OPE01, OPE16, OPE17, OPE19, OPF07, and OPF08) จาก 100 ชนิด (ใน 5 ชุด OPA, OPC, OPD, OPE, และ OPF บริษัท Operon Technologies สหรัฐอเมริกา) ได้ดีเอ็นเอ 81 แถบ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35 – 1.7 กิโลเบส เมื่อนำ polymorphism ของแถบดีเอ็นเอมาทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม NTSYSpc ได้แผนภูมิทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ที่แบ่งปาล์มน้ำมันได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 : พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, ลูกผสมระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ลูกผสม F62, และ ลูกผสมไม่ทราบพ่อแม่ อีก 3 ตัวอย่าง ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.76 – 0.97 ; กลุ่มที่ 2 : พันธุ์พิซิเฟร่า 425, และพันธุ์พิซิเฟร่า 427 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่ม 0.76; กลุ่มที่ 3 : พันธุ์ดูร่า 589, และ ดูร่า 671 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่มเป็น 0.67 ; กลุ่มที่ 4 : พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, พันธ์ดูร่า 588, และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 7 ตัวอย่าง มีดัชนีความเหมือนแตกต่างกันมาก จึงกล่าวได้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อตรวจสอบพันธุ์ที่ต้องการใช้ในการเพาะปลูกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Identification of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using RAPD technique
Student	Mr. Thanawat Chuchor
Student ID	41066102
Degree	Master of Science
Programme	Agronomy
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Panya Potitirat
Thesis Co-advisor	Assist. Prof. Dr. Arom Sripichitt
	Assist. Prof. Dr. Sontichai Chanpraem

ABSTRACT

Accordingly, the problem of oil palm seedling (*Elaeis guineensis* Jacq.) that planted in Thailand was not real Tenera cultivars and yield of them was too low. The methods for testing the cultivars of oil palm seedling are very important. The one of method to solve this problem is using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. The suitable RAPD technique consisted of genomic DNA extracted from the young leaf of oil palm by using SDS buffer (Dellaporta *et al.* 1983) and then centifuged at 12,000 rpm. The best polymerase chain reaction (PCR) solution contained 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 0.2 μM primer, 0.4 unit of *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA. Amplification reaction was carried out in DNA thermal cycler using 45 cycles : 1 minute at 94 $^{\circ}$C (denaturation), 1 minute at 36 $^{\circ}$C (annealing), and 2 minute at 72 $^{\circ}$C (extension). After the last cycle reaction mixture was incubated at 72 $^{\circ}$C for 10 minute to ensure that primer extension reaction was completed. Amplification product was analysed by electrophoresis, using 1.5 % agarose gel at a constant voltage of 80 volts followed by staining with 10 mg/ml ethidium bromide for 30 minute. From 32 samples of oil palm, RAPD generated by 14 (OPA11, OPA17, OPC07, OPC08, OPC15, OPD01, OPD03, OPD12, OPE01, OPE16, OPE17, OPE19, OPF07, and OPF08) out of 100 different 10–mer oligonucleotide primers (from 5 groups ; OPA, OPC, OPD, OPE, and OPF), gave 81 discriminate banding. The average size of the amplified DNA fragments ranged from 0.35 – 1.7 kb. The polymorphism of those DNA profile evaluated by NTSYSpc was analyzed. The phylogenetic tree devided oil palm into 4 groups including group 1: Dura 064 No. 33, F1 (Dura 064 No. 33 x Pisifera 116 No. 339)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14 samples, F62, and 3 unknown cultivars (similarity coeficient (SC) = 0.76 – 0.97) ; group 2 : Pisifera 425 and Pisifera 427 (SC = 0.76) ; group 3 : Dura 588 and Dura 671 (SC = 0.67) ; and group 4 : Pisifera 116 No. 339, Dura 589, and 7 unknown cultivars (SC = different). The RAPD technique was proved as a useful technique for identification of oil palm cultivars.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์ และ ผศ.ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ตลอดจนจัดหาอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำงานวิจัย จนทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พร้อมกันนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์ และคุณอรอุมา รุ่งน้อย ที่ช่วยดูแลและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคนิคอาร์เอพีดี รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน และที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่คอยเป็นกำลังใจ และช่วยแก้ไขปัญหาทุกปัญหาให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อเสถียร และคุณแม่อรุณี ชูช่อ รวมทั้งญาติพี่น้องทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจในทุกเวลาและช่วยสนับสนุนในทุก ๆ ด้านของการศึกษามาโดยตลอด พร้อมทั้งขอกราบขอบพระคุณคุณครูบาอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ในด้านต่างๆ จนกระทั่งข้าพเจ้าได้ประสบความสำเร็จในวันนี้

ธนวัฒน์ ชูช่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... X

สารบัญภาพ..... XI

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน..... 3

2.1.1 ลักษณะของใบ ลำต้น และราก (vegetative characters) 3

2.1.2 ลักษณะของช่อดอก ผล เมล็ด หรือส่วนสืบพันธุ์ (reproductive character) 4

2.2 การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา..... 5

2.2.1 การจำแนกพันธุ์ปาล์มโดยพิจารณาลักษณะของผล Hartley (1977)..... 6

2.2.2 การจำแนกพันธุ์ปาล์มตามลักษณะประจำพันธุ์ พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ (2523).. 6

2.2.3 การจำแนกพันธุ์ปาล์มตามลักษณะประจำพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร (2523)..... 7

2.3 หลักการตรวจสอบพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี..... 8

2.3.1 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction ; PCR) 8

2.3.2 เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymophic DNA ; RAPD) 9

2.3.3 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกสกัดดีเอ็นเอ..... 13

2.3.4 สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 16

2.3.5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลของเทคนิคอาร์เอพีดี..... 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 25

3.1 อุปกรณ์..... 25

3.1.1 ตัวอย่างใบอ่อนปาล์มน้ำมัน..... 25

3.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ..... 25

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิคอาร์เอพีดี..... 27

3.1.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ผลเทคนิคอาร์เอพีดี..... 27

3.2 วิธีการทดลอง..... 28

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช..... 28

3.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอ..... 28

3.2.3 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ..... 28

3.2.4 วิธีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี..... 28

3.2.5 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 29

3.2.6 การวิเคราะห์ผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี..... 29

3.3 วิธีการดำเนินงาน..... 29

3.3.1 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกสกัดดีเอ็นเอ..... 29

3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 29

3.3.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 30

3.3.4 การคัดเลือกชนิดไพรเมอร์ที่หมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ..... 30

3.3.5 การตรวจสอบผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี..... 30

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 31

3.4 สถานที่ดำเนินงาน..... 31

3.5 ระยะเวลาดำเนินงาน..... 31

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 32

4.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ..... 32

4.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน..... 32

4.1.2 ผลการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างกัน..... 32

4.2 สภาวะที่เหมาะสมของการใช้เทคนิค..... 32

4.2.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2 ผลจากการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 37

4.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 37

4.3.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของเจลในขั้นตอนการตรวจสอบผล..... 37

4.3.2 ผลจากการปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส..... 37

4.3.3 ผลการปรับความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ในการย้อมตรวจสอบผล..... 40

4.4 ผลการคัดเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี..... 40

4.5 ผลการวิเคราะห์ผลเทคนิคอาร์เอพีดี..... 57

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 59

5.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ..... 59

5.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน..... 59

5.1.2 ผลการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างกัน..... 59

5.2 สภาวะที่เหมาะสมของการใช้เทคนิค..... 60

5.2.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 60

5.2.2 ผลจากการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 61

5.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 62

5.3.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของเจลในขั้นตอนการตรวจสอบผล..... 62

5.3.2 ผลจากการปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส..... 62

5.3.3 ผลการปรับความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ในการย้อมตรวจสอบผล..... 63

5.4 ผลการคัดเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี..... 63

5.5 ผลการวิเคราะห์ผลเทคนิคอาร์เอพีดี..... 64

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 65

บรรณานุกรม..... 67

ภาคผนวก..... 78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก 1..... 79
1.1 การเตรียมสารเคมีในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ..... 79
1.2 การเตรียมสารเคมีในขั้นตอนการวิเคราะห์ความเข้มข้นดีเอ็นเอ..... 80
1.3 การเตรียมสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 81
1.4 ขั้นตอนการเตรียมสกัดดีเอ็นเอ..... 82
1.5 ขั้นตอนการตรวจสอบและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ..... 85
1.6 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 86
1.7 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเครื่อง DNA thermal cycler..... 86
1.8 ขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสตรวจสอบผล..... 87
ภาคผนวก 2..... 88

ประวัติผู้แต่ง..... 93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงลักษณะประจำพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน..... 7

3.1 แสดงชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่หมาะสมเพื่อใช้ในสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 100 ชนิดของบริษัท Operon Technologies..... 30

4.1 แสดงชนิดของไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ทำการคัดเลือกเพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี..... 41

4.2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ จำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 14 ชนิดกับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง..... 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

4.1 การตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอทีสกัดได้จากบัฟเฟอร์ที่ต่างชนิดกัน..... 33

4.2 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่าง ๆ..... 33

4.3 การเปรียบเทียบความเข้มข้นความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ..... 35

4.4 การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ..... 35

4.5 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ..... 36

4.6 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 36

4.7 ความเข้มข้นขอดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ..... 38

4.8 ผลจากการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์..... 38

4.9 ผลการตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ระดับความเข้มข้นของเจลต่าง ๆ..... 39

4.10 การเปรียบเทียบความต่างศักย์ของไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส..... 39

4.11 การเปรียบเทียบการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์เพื่อตรวจสอบผลที่ระยะเวลาต่าง ๆ..... 40

4.12 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA11..... 43

4.13 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA17..... 44

4.14 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC07..... 45

4.15 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC08..... 46

4.16 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC15..... 47

4.17 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD01..... 48

4.18 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD03..... 49

4.19 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD12..... 50

4.20 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE01..... 51

4.21 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE16..... 52

4.22 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE17..... 53

4.23 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE19..... 54

4.24 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF07..... 55

4.25 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF 08..... 56

4.26 phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc ของปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง..... 57

4.27 phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc ของปาล์มน้ำมัน 16 ตัวอย่าง..... 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทางภาคใต้ ปลูกมากในจังหวัดกระบี่ สุราษฎ์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ตามลำดับ พื้นที่เพาะปลูกปาล์มใน 5 จังหวัดนี้คิดเป็นร้อยละ 95.5 ของพื้นที่การเพาะปลูกปาล์มทั้งหมดของประเทศ ในปี พ.ศ. 2540 มีอยู่ประมาณ 1,097,000 ไร่ ผลผลิตทะลายปาล์มสดเท่ากับ 2,681,000 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,445 กก.ต่อไร่ สร้างรายได้ให้กับเกษตรกร 5,817.8 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2541) ปัจจุบันความต้องการปาล์มน้ำมันเพื่อนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี และผลผลิตที่ได้ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ ทำให้ต้องนำเข้าน้ำมันปาล์มดิบจากต่างประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก เนื่องจากผลผลิตเฉลี่ยของปาล์มน้ำมันต่อพื้นที่ของไทยยังคงต่ำเมื่อเทียบกับผลผลิตปาล์มน้ำมันของมาเลเซียและอินโดนีเซีย ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าหลายเท่า ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนดังกล่าว จึงต้องมีการขยายพื้นที่ปลูกและพัฒนาศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น

ปัจจุบันพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกเพื่อเป็นการค้าในประเทศไทย คือ พันธุ์เทเนร่า (Tenera) ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูร่า (Dura) ที่ใช้เป็นต้นแม่ในการผสมข้ามกับต้นพ่อคือพันธุ์พิซิเฟรา (Pisifera) ได้เป็นพันธุ์ลูกผสมเทเนร่าชั่วที่ 1 ที่รวบรวมลักษณะที่ดีเด่นของพ่อและแม่ไว้ เช่น มีทะลายมาก ลักษณะผลขนาดใหญ่ เมล็ดมีกะลาบางมาก ชั้น mesocarp หนา และให้น้ำมันปาล์มสูงถึง 22 - 24 เปอร์เซ็นต์ (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541) จากลักษณะที่ดีของพันธุ์ปาล์มลูกผสมเทเนร่าทำให้มีความต้องการต้นกล้าเพื่อนำมาปลูกสูงมาก แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาเกี่ยวกับเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าที่ซื้อมาไม่ตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ ซึ่งเกิดจากเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าเหล่านั้นไม่ใช่พันธุ์ลูกผสมเทเนร่า หรือเกิดจากการนำเมล็ดที่เกิดจากลูกผสมเทเนร่าชั่วที่ 1 หรือลูกผสมชั่วอื่น ๆ มาปลูก ทำให้ได้ผลผลิตต่ำและไม่เป็นที่ต้องการของโรงงานรับซื้อ ซึ่งปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชผสมข้าม การเก็บเมล็ดที่เกิดจากต้นลูกผสมชั่วแรกมาปลูก ทำให้มีการกระจายของลักษณะที่ ต่าง ๆ ที่ไม่ดีปรากฏออกมา และนอกจากนั้นปาล์มน้ำมันจากบางแหล่งที่เกษตรกรนำมาใช้ในการเพาะปลูกไม่ใช่ลูกผสมแท้

จากปัญหาดังกล่าว ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนต้นกล้าปาล์ม น้ำมันที่จะนำมาใช้ปลูกเพื่อขยายพื้นที่การผลิต เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการทดลองนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้เพื่อการตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งจะสามารถจำแนกพันธุ์ปาล์มได้ตรงตามพันธุ์ และตรงกับความต้องการของเกษตรกรซึ่งจะทำให้เกษตรกรสามารถผลิตปาล์มน้ำมันที่มีคุณภาพและผลผลิตสูงขึ้น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลโดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน

1.2.2 เพื่อศึกษาการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน พันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และพันธุ์ลูกผสมของปาล์มน้ำมัน

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1. ช่วยให้ทราบเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคอาร์เอพีดีที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

1.3.2 สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ปาล์มน้ำมัน เพื่อให้เพาะปลูกได้ตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ

1.3.3 สามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) จัดเป็นพืชยืนต้นที่อยู่ในตระกูลปาล์ม (family Palmae ตั้งชื่อโดย Jacquin ในปี ค.ศ. 1763 Elaeis มาจากภาษากรีก (elaion) แปลว่าน้ำมัน ส่วน Guineensis แสดงให้ทราบถึงแหล่งกำเนิดที่อยู่แถบชายฝั่งกินี (Guinea) (ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529) ในการจำแนกทางพฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมันสามารถจำแนกได้ดังนี้

Division : Spermatophyta.

Sub-division : Angiospermae.

Class : Monocotylendon.

Family : Palmae.

Sub-family : Cocoideae.

Genus : Elaeis.

Elaeis guineensis Jacq. (Africa oil palm) เป็นปาล์มที่มีขนาดใหญ่ มีลำต้นรูปทรงกระบอก แข็งแรง ข้อและปล้องถี่ ลำต้นสูงประมาณ 25 – 30 เมตร มีหนามสั้นๆ ที่บริเวณฐานของใบและภายในทะลาย การวัดการเจริญดูจากจำนวนของการผลิตใบในแต่ละปี (Hardon *et al.* 1985) ต้นอ่อนอายุ 3 – 5 ปี จะเริ่มให้ผลผลิตชุดแรก และจะเริ่มเข้าสู่ระยะต้นแก่เมื่ออายุ 6 – 9 ปี โดยปาล์มน้ำมันอายุ 12 – 15 ปี จะเป็นระยะที่ให้ผลผลิตสูงสุด อายุในการให้ผลผลิตุ้มค่าของปาล์มน้ำมัน คือ 20 – 30 ปี (Gascon *et al.* 1989)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

2.1.1 ลักษณะของใบ ลำต้น และราก (vegetative characters)

2.1.1.1 ใบ Corley and Gray (1976) ศึกษาการพัฒนาของใบจากระยะเริ่มต้น จนถึงระยะใบแก่พบว่า ใบประกอบด้วยใบย่อย (leaflet) โดยเรียงอยู่ในลักษณะสองระดับ เหลื่อมกันอย่างเป็นระเบียบในแต่ละข้างของแกนอันเป็นลักษณะพิเศษของ *E. guineensis* ในแต่ละใบย่อยจะประกอบด้วย แผ่นใบ (lamina) ท่อ (midrb) และตรงกลางจะมีแกนทางใบ (rachis) ต่อกับก้านใบ (petiole) ส่วนที่เป็นแผ่นใบของใบย่อยที่อยู่บริเวณต่ำสุดจะไม่มีการพัฒนา ส่วนท่อขนาดสั้นของใบย่อยเหล่านี้จะเริ่มเปลี่ยนเป็นหนาม (spines) โดยจะพบชัดเจนบริเวณก้านใบ (Rees. 1963) ปาล์มน้ำมันที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะมีทางใบ (frond) เกิดขึ้นที่รอบยอด (crow) ประมาณ 40 - 50 ทาง (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.2 ลำต้นมีลักษณะเป็นต้นเดี่ยวตั้งตรงรูปร่างทรงกระบอก มีเนื้อเยื่อเจริญเฉพาะตรงปลายยอด ซึ่งใน 2 - 3 ปีแรกจะช่วยในการเจริญเติบโตทางด้านกว้าง หลังจากนั้นแล้วจึงจะมีการเจริญทางด้านความสูงเรื่อยไปประมาณ 25 - 50 เซนติเมตร ต่อปี (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541) บนลำต้นปกคลุมด้วยตอใบเรียงตัวกันเป็นเกลียวโดยรอบทั้งวนขวาและวนซ้ายพบว่า 53 เปอร์เซ็นต์เรียงตัวแบบวนซ้าย โดยคุณสมบัตินี้จะแตกต่างกันในปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ (Arasu. 1970)

2.1.1.3 รากเกิดขึ้นตรงฐานโคนของลำต้นเป็นระบบแขนง (adventitiuos root system) แบ่งออกเป็นหลายชุดดังนี้ คือ รากชุดแรก (primary root) เกิดตรงโคนลำต้นมีขนาดใหญ่ที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 – 10 มิลลิเมตร) มีลักษณะการเจริญเติบโตเป็น 2 แบบ คือ เจริญตามแนวนอนอาจจะยาวออกไปไกลถึง 15 – 20 เมตร อีกส่วนหนึ่งจะเจริญไปตามแนวลึก (ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529) จากนี้จะมีการแตกแขนงจากรากชุดที่สองจะลดลงตามลำดับ รากชุดที่สามจะไม่มีรากขน รากชุดที่สี่จะทำหน้าที่ดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารแทน ความหนาแน่นของรากจะพบในบริเวณรัศมีของพุ่มใบและลึกลงไปประมาณ 15 เซนติเมตร จากผิวดิน (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541) การศึกษาของ Lambourne (1935) ในปาล์มน้ำมันอายุ 11 ปี ในสภาวะอากาศแห้ง และมีระดับน้ำใต้ดินสูง พบว่ามีการกระจายของรากอยู่บริเวณผิวดินในระยะ 45 เซนติเมตร

2.1.2 ลักษณะของช่อดอก ผล เมล็ด หรือส่วนสืบพันธุ์ (reproductive character)

2.1.2.1 ช่อดอกปาล์มน้ำมันจะเริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณ 2 - 3 ปี หลังจากปลูกลงในแปลงแล้ว ช่อดอกจะเกิดจากตาดอกซึ่งอยู่ตรงซอกโคนก้านใบทุกใบ ใช้เวลาพัฒนาจนถึงดอกบานประมาณ 33 - 34 เดือน ช่อดอกที่เกิดขึ้นมาใหม่จะถูกหุ้มด้วยกาบหุ้มช่อดอก (spathe) ซึ่งจะเปิดออก 6 - 8 สัปดาห์ก่อนดอกบาน (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541) ช่อดอกชนิดต่าง ๆ นั้นมีลักษณะ ดังนี้

1) ช่อดอกเพศผู้ (male inflorescence) ประกอบด้วยช่อดอกย่อย (spikelet) ที่มีลักษณะยาวเรียวคล้ายนิ้วมือ ไม่มีหนาม แต่ละอันยาวประมาณ 10 - 20 เซนติเมตร เรียงอยู่บนแกนกลาง ช่อดอก แต่ช่อดอกย่อยจะมีดอกตัวผู้เล็ก ๆ เกิดโดยรอบประมาณ 700 - 1,200 ดอก (ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529) เวลาดอกบานจะบานออกจากโคนมายังปลายช่อใช้เวลา 2 - 3 วัน ช่อดอกทั้งช่อจะให้เกสรตัวผู้ประมาณ 25 - 50 กรัม (Hardon and Turner. 1976)

2) ช่อดอกเพศเมีย (female inflorescence) เป็นแบบ spike หรือ spadix ยาวประมาณ 24 - 45 เซนติเมตร ประกอบด้วยช่อดอกย่อยซึ่งมีใบประดับที่ยาวปลายแหลม (spinous bract) เรียงเป็นเกลียวบนแกนช่อดอกใหญ่ ช่อดอกย่อยที่อยู่ตรงกลางแกนจะมีดอกตัวเมียประมาณ 12 - 30 ดอก (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541) และจะมีน้อยลงทางโคนและปลายแกนของช่อ ทั้งช่อดอกจะมีตัวเมียทั้งสิ้นหลายพันดอก เมื่อดอกพร้อมที่จะผสม (receptive) จะเห็นยอดเกสรตัวเมีย (stigma) ซึ่งมี 3 แฉก โดยดอกที่จะพัฒนาไปเป็นผลปาล์มนั้นจะพัฒนาอยู่ตรงกลางของกลุ่มดอก 3 ดอก ซึ่งดอกด้านข้าง 2 ดอกเป็นดอกตัวผู้ที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นผล (Lawton.1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ช่อดอกผสมหรือกะเทย (mixed inflorescence) ช่อดอกประเภทนี้คือช่อดอกที่มีช่อดอกย่อยทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน เกิดขึ้นในบางโอกาสเท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่ปาล์มเริ่มผลิตช่อดอกใหม่ ๆ (อายุประมาณ 3 - 4 ปี) โดยทั่วไปช่อดอกย่อยเพศเมียจะอยู่บริเวณส่วนกลาง และช่อดอกย่อยเพศผู้จะอยู่ทางส่วนโคนและปลายของช่อดอกใหญ่ ช่อดอกประเภทนี้เป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์เพราะจะให้ผลผลิตต่ำ (Hartley. 1977)

2.1.2.2 ผลและเมล็ด หลังจากดอกได้รับการผสมแล้วประมาณ 5 – 6 เดือน ผลก็จะสุก การสุกของผลจะช้าหรือเร็วยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ปาล์มที่โตเต็มที่แล้วสามารถจะให้ผลผลิตได้ โดยผลปาล์มเป็นแบบ drupe ไม่มีก้านขั้วผล (sessile drupe) ประกอบด้วยเปลือกชั้นนอก (exocarp) เปลือกชั้นกลางหรือกาบ (mesocarp) ซึ่งเป็นส่วนที่มีน้ำมันอยู่ทั้งสองส่วนเรียกรวมกันว่า pericarp และมีชั้นในสุดเป็นกะลา (endocarp) (ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529) ถัดจากส่วนนี้ไปก็เป็นส่วนของเมล็ดซึ่งประกอบด้วย เนื้อในเมล็ด (kernel หรือ endosperm) ซึ่งมีน้ำมันอยู่เช่นกัน ผลและเมล็ดเป็นส่วนที่มีความสำคัญที่สุดเพราะเป็นส่วนที่จะให้น้ำมัน

2.1.2.3 สีของผล ผลของปาล์มน้ำมันโดยทั่วไปเมื่อยังอ่อนจะมีสีน้ำตาลดำ เมื่อสุกจะมีสีแดง เนื่องจากมีรงควัตถุ (carotenoid) อยู่ใน pericarp ส่วนที่โคนผลจะไม่มีสี ผลที่มีสีแบบนี้เรียกว่า nigrescens แบ่งออกเป็น rubro-nigrescens (สุกสีแดงตลอดผล) และ rutilo-nigrescens (สุกสีเหลืองอ่อน) ประเภทที่มีผลสีเขียวเวลายังไม่สุกและสีแดงอ่อน เนื่องจากไม่มีรงควัตถุ exocarp เรียกว่า virescens พบน้อยเนื่องจากถูกควบคุมด้วยยีนด้อยเพียงคู่เดียว (Purvis. 1957)

2.1.2.4 ความหนาของกะลา Smith (1935) ได้แสดงลักษณะความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ ดังต่อไปนี้

1) ดูร่า เป็นปาล์มน้ำมันประเภทที่มีกะลาหนา 2 – 8 มิลลิเมตรลักษณะไม่มีเยื่อรอบกะลา โดยจะมี mesocarp 35 - 55 เปอร์เซ็นต์ (ของผล) ในพันธุ์ Deli dura มีมากถึง 65 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีเนื้อเยื่อที่อยู่วงรอบกะลา (fibre ring)

2) เทเนร่า เป็นปาล์มน้ำมันประเภทที่มีกะลาหนาปานกลาง คือประมาณ 0.5 – 4 มิลลิเมตร มีเนื้อเยื่อรอบกะลา มี mesocarp 60 - 96 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำมัน 22 – 24 เปอร์เซ็นต์ เนื้อในเมล็ดขนาดกลาง เป็นลูกผสมระหว่าง ดูร่า และ พิซิเฟร่า มีเนื้อเยื่อที่อยู่วงรอบกะลา

3) พิซิเฟร่า เป็นปาล์มน้ำมันที่มีกะลาบางหรืออาจจะไม่มีก็ได้ มีเยื่อรอบกะลา และมี mesocarp ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์

2.2 การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันมีถิ่นฐานดั้งเดิมอยู่ในแอฟริกาตอนกลางและตะวันตก ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชที่มีความแปรปรวนของลักษณะรูปร่างได้เสมอ และความแปร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรวนที่เกิดขึ้นอาจจะเป็นเพราะสภาพแวดล้อมที่ปลูก หรือลักษณะแตกต่างทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน โดยทั่วไปการจำแนกพันธุ์ปาล์มจะดูจากลักษณะทางสัณฐาน (morphology) ได้แก่

2.2.1 การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยพิจารณาลักษณะของผลโดย Hartley (1977) จำแนกได้ดังต่อไปนี้

2.2.1.1 สีผิวผลเมื่อดิบ มี 2 ลักษณะ คือ สีเขียว (nigrescens) และมีสีดำ (virescens)

2.2.1.2 สีของเปลือกนอกเมื่อสุก มี 2 ลัษณะ คือ สีเหลืองซีด (albescens) และสีส้มแดง

2.2.1.3 รูปร่างผลมี 2 ลักษณะ คือมีเปลือกนอกปกติ และมีเปลือกนอกผิดปกติ (mantled fruit)

2.2.1.4 ความหนาของกะลา มี 3 ลักษณะคือ หนา (Dura) บาง (Tenera) และไม่มีกะลา (Pisifera)

ปาล์มน้ำมันที่ปลูกเป็นการค้านั้น ชื่อพันธุ์เทเนอร่า มีผลดิบสีดำ และเมื่อสุกเปลือกนอกจะมีสีส้มแดงและผลปกติ ลักษณะความหนาของกะลาเป็นลักษณะที่สำคัญที่สุดต่อเศรษฐกิจ เพราะมีผลต่อปริมาณเปลือกนอกที่ให้น้ำมัน ลักษณะนี้มียีนควบคุม 1 คู่ ลักษณะกะลาหนาถูกควบคุมด้วยยีน D ลักษณะไม่มีกะลาถูก ควบคุมด้วยยีน d ยีนทั้ง 2 นี้เป็นยีนที่ไม่ข่มกัน พันธุ์ดูร่ามียีโนไทป์ DD พันธุ์พิสิเฟอร่ามียีโนไทป์ dd และพันธุ์เทเนอร่ามียีโนไทป์ Dd ได้จากการผสมระหว่างสองพันธุ์แรก

2.2.2 การจำแนกพันธุ์ปาล์มตามลักษณะประจำพันธุ์โดย พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ (2523)

พันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 พันธุ์ คือ

2.2.2.1 Macrocaya ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้มีกะลาหนาประมาณ 6 – 8 มิลลิเมตร น้ำหนักของกะลาประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักผลทั้งหมด แต่ชั้นของ mesocarp บาง จึงทำให้ปริมาณน้ำมันในผลต่ำ ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้ไม่เหมาะที่จะนำมาปลูกเป็นการค้า

2.2.2.2 ดูร่า ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูร่า มีชั้นของ mesocarp หนาปานกลาง หรือประมาณ 35 – 55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักผล มีน้ำมันประมาณ 17 - 18 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักผล กะลาหนา 2 - 8 มิลลิเมตร หรือประมาณ 25 - 55 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทั้งหมด ปริมาณของเนื้อที่อยู่ในเมล็ดประมาณ 7 - 20 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักผลทั้งหมด

2.2.2.3 พิซิเฟร่า ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้มีกะลาหนามาก แต่ชั้นของ mesocarp จะหนากว่าพันธุ์ดูร่า เนื้อในเมล็ดมีน้อยแต่เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง นอกจากนี้ยังมี sex ratio สูงกว่าพันธุ์ดูร่า แต่ปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอร่า มักจะผลิตช่อดอกตัวเมียที่เป็นหมัน และก่อนที่ผลจะสุกมักจะเน่าก่อนเสมอ ส่วนต้นที่เป็นหมันส่วนใหญ่มักจะเจริญเติบโตทางลำต้นจึงไม่เหมาะที่จะนำมาปลูกเป็นการค้า นักปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้ปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้า

2.2.2.4 เทเนร่าปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่าง ปาล์มน้ำมันพันธุ์พิสิเฟอร่าเป็นต้นพ่อกับปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูร่าที่ใช้เป็นต้นแม่ โดยการรวมลักษณะที่ดีของปาล์มน้ำมันทั้ง 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์เอาไว้ด้วยกัน ลักษณะที่ดีของปาล์มนำมันพันธุ์นี้ได้แก่ มีกะลาบางประมาณ 0.5 – 4 มิลลิเมตร หรือประมาณ 1 - 32 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทั้งหมด เนื้อที่อยู่ในเมล็ดมีประมาณ 3 - 15 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักผล ขั้วของ mesocarp มีความหนาตั้งแต่ปานกลางจนถึงหนามาก หรือมีน้ำหนักประมาณ 60 – 96 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำมันประมาณ 22 – 24 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักผลทั้งหมด นอกจากนี้ยังมี sex ratio และจำนวนทะลายมากกว่าพันธุ์ดูร่า จึงทำให้เกษตรกรนิยมปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์นี้กันมาก

2.2.3 การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้ลักษณะประจำพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร (2523)

จำแนกพันธุ์ปาล์มนำมันเป็น 3 พันธุ์ได้แก่ ดูร่า เทเนร่า และพิซิเฟร่า ซึ่งแสดงลักษณะความแตกต่างในปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ ดังนี้

2.2.3.1 พันธุ์ดูร่า ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูร่าที่ดีพบในแถบตะวันออกไกลเรียกว่า Deli dura ซึ่งให้น้ำมันต่อทะลายประมาณ 18 - 19.5 เปอร์เซ็นต์ กะลาขนาดปานกลาง 2 - 8 มิลลิเมตร หรือ 25 - 30 เปอร์เซ็นต์ มีเปลือกหนาระหว่างเนื้อนอกที่มีน้ำมันและเนื้อในหนา ปัจจุบันดูร่านี้ใช้เป็นแม่พันธุ์สำหรับผลิตลูกผสมเทเนร่า

2.2.3.2 พันธุ์พิซิเฟร่า เป็นพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีกะลาบางมาก เปลือกนอกหนากว่าพันธุ์ดูร่า (5.0 – 10.0 มิลลิเมตร) เมล็ดในเล็ก แต่มีข้อเสียคือ ขนาดของผลเล็ก ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันและมีการผลิตทะลายต่อต้นจำนวนต่ำปัจจุบันใช้พันธุ์พิซิเฟร่านี้เป็นพ่อสำหรับผลิตพันธุ์ลูกผสม

2.2.3.3 พันธุ์เทเนร่า เป็นพันธุ์ผสมระหว่างดูร่าพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อพิซิเฟร่า เป็นพันธุ์ที่มีเปลือกสำหรับอัดน้ำมันมาก เนื้อนอกหนา และให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันมาก มีกะลาบาง (0.5 – 4 มิลลิเมตร หรือ 3.0 - 10.0 มิลลิเมตร) และมีน้ำมันทั้งทะลายประมาณ 22 – 25 เปอร์เซ็นต์ มีทะลายดกกว่าพันธุ์ ดูร่า เนื่องจากพันธุ์เทเนร่ามีคุณสมบัติดีหลายประการจึงมักนิยมปลูกเป็นการค้า

ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะประจำพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน (กรมวิชาการเกษตร. 2523)

ลักษณะ	ดูร่า	เทเนร่า	พิซิเฟร่า
1. ความหนาของกะลา (มิลลิเมตร)	2 - 8	0.5 - 4	บางมาก
2. เส้นใยรอบกะลา		มี	มี
3. ผล/ทะลาย (เปอร์เซ็นต์)	60	60	มักเป็นหมัน
4. เปลือกนอก/ผล (เปอร์เซ็นต์)	60 - 65	75 - 85	92 - 97
5. กะลา/ผล (เปอร์เซ็นต์)	4 - 20	3 - 28	3 - 8
6. น้ำมัน/เปลือกนอก (เปอร์เซ็นต์)	50	50	50
7.น้ำมัน/ทะลาย (เปอร์เซ็นต์)	18 - 19.5	22.5 - 25.5	25 - 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 หลักการตรวจสอบพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการหาความสัมพันธ์ และการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Soller and Beckman. 1983) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (Nyborn *et al.* 1990) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (William *et al.* 1990 ; Welsh and McClelland. 1990) เทคนิคเหล่านี้ทำให้เห็นความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของพืช ซึ่งช่วยในการบ่งชี้และจัดจำแนกพันธุ์พืชได้ โดยใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการตรวจและใช้ประโยชน์จากการเกิดความแตกต่างรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (polymorphism) ในการจำแนกพันธุ์พืชชนิดนั้น ๆ

เมื่อกล่าวถึงการนำเทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA; RAPD) หรือที่เรียกสั้น ๆ ว่า Rapid มาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชเป็นวิธีการที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว สามารถทำการตรวจสอบพืชได้หลายชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่เจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) จึงสามารถนำมาใช้กับพืชได้ทุกชนิดโดยไม่ต้องใช้โพรบ (probe) ที่เฉพาะเจาะจงกับพืชแต่ละชนิดและสามารถตรวจสอบได้ทั้งจีโนม (genome) ของพืชซึ่งมีระดับของ polymorphism สูง ทำให้สามารถประเมินการกระจายตัวทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาศึกษาได้ (พรพันธุ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2537)

William *et al.* (1990) ได้คิดค้นเทคนิคอาร์เอพีดีขึ้น โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารพันธุกรรม (DNA) ของพืชจะมีการเรียงตัวของลำดับเบสแตกต่างกันในพืชแต่ละพันธุ์ ได้แก่ adenine (A) thymine (T) guanine (G) และcytosine (C) ซึ่งเบสแต่ละตัวจะเป็นคู่สมกัน โดย A จับคู่กับ T และ C จะจับคู่กับ G เมื่อนำดีเอ็นเอของพืชที่จะทำการตรวจสอบมาเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) แล้วนำมาทดสอบโดยวิธีทางอิเล็กโตรโฟรีซีส ตรวจสอบการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง เรียกว่าเป็น polymorphism กัน ซึ่งหมายถึงพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งสองมีความแตกต่างกัน ใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชหลายชนิด ได้แก่ พืชตระกูลกะหล่ำ ข้าว และถั่วเหลือง ฯลฯ (Yu *et al.* 1993)

2.3.1 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR)

Saiki *et al.*(1985) ได้เสนอผลงานการค้นพบเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคนี้ได้นำความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ ทำให้ดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่แยกตัวออกเป็นสายเดี่ยว (DNA template denature) ขั้นที่ 2 เกิดการเข้าคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ (primer annealing) และขั้นที่ 3 มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อออกไปจากส่วนของไพรเมอร์ (primer extension) โดยทั้ง 3 ขั้นตอน จะใช้อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ denaturation ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส ขั้นตอน primer annealing ไพรเมอร์จะเข้าไปจับตรงบริเวณที่มีเบสคู่สมบนดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ใช้เป็นต้นแบบ ที่อุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส และขั้นตอน primer extension การต่อสาย

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นโดยเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' – OH ของไพรเมอร์ ใช้เอ็นไซม์ Klenow Fragment ซึ่งต้องการอุณหภูมิพอเหมาะที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อทำซ้ำจำนวนหลายรอบทำให้มีการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากเดิมได้อย่างทวีคูณแบบ exponential โดยมีผลผลิตที่เป็นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยาพีซีอาร์มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ การทำซ้ำจำนวน 30 รอบจะได้ผลผลิตเป็นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเป็นล้านชิ้น แต่เอนไซม์ Klenow Fragment ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นไม่ทนต่อความร้อนในขั้นตอน denaturation ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิสูง เอนไซม์จะสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปทุกขั้นตอนทำให้สิ้นเปลืองและยุ่งยาก ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนได้สูง โดยแยกสกัดจากแบคทีเรียที่ทนความร้อนชื่อ *Thermus aquaticus* (*Taq*) ดังนั้นจึงเริ่มนำเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์หลังจากนั้นมีการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์มาเป็นลำดับ โดยมีการประดิษฐ์เครื่องควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์อัตโนมัติ และใช้คอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการออกแบบไพรเมอร์ตลอดจนเครื่องสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ ได้

2.3.2 เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymophic DNA ; RAPD)

เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิคพีซีอาร์ ทำได้โดยการสุ่มใช้ไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ เพียงหนึ่งไพรเมอร์ แทนที่จะใช้ไพรเมอร์ที่ทราบลำดับอยู่แล้วและมีขนาดยาวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยทั่วไปไพรเมอร์สายสั้นจะเกาะกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมได้หลายตำแหน่ง และใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่มจากดีเอ็นเอแม่แบบที่ซับซ้อน โดยไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอในทิศทางตรงกันข้ามกัน และห่างกันในระยะหนึ่งจะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้ จำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์จะขึ้นกับความยาวของไพรเมอร์ ขนาดของจีโนม และตำแหน่งของการเกาะของไพรเมอร์บนจีโนม ไพรเมอร์ที่ใช้ในพืชส่วนใหญ่มีความยาว 8 – 10 นิวคลีโอไทด์ สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่แตกต่างกัน 2 – 10 ขนาด ไพรเมอร์ที่ใช้ต้องมีลำดับเบสแบบสุ่มมีปริมาณ G+C 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นอย่างน้อย และมี inverted repeat ภายในน้อย (บุรชัย. 2536) การใช้ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ ในการทำให้เกิดลายพิมพ์จากจีโนมที่ซับซ้อน โดยไพรเมอร์ที่ใช้นั้นไม่จำเป็นต้องทราบลำดับมาก่อน วิธีนี้เรียกว่า arbitary primer PCR (AP-PCR) (Welsh and McClelland. 1990) ผลผลิตที่เกิดขึ้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส แล้วทำการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งจะเห็นความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอเป็นรูปแบบได้แตกต่างกันซึ่งเรียกว่าการเกิด polymorpism การเกิด polymorphism เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะหรือจากการเปลี่ยนแปลงซึ่งจะไปเปลี่ยนแปลงขนาด หรือป้องกันการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย เช่นการเกิด insertion deletion และ invertion ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่ได้สามารถตรวจพบได้ค่อนข้างน้อย และผลผลิตที่เกิดขึ้นแต่ละอันจะแสดงออกถึง 1 อัลลีล (allele) ต่อ โลคัส

เอกสาร ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(locus) ในการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้จะถูกถ่ายทอดในรูปของ dominant marker (Waugh and Powell. 1992)

เทคนิคอาร์เอพีดีนี้ถูกนำมาใช้ได้อย่างกว้างขวางในการหาตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแหล่งรวบรวมพันธุ์พืช ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ใช้คาดคะเนความแปรปรวนของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชชนิดเดียวกัน และสามารถใช้ตรวจสอบจีโนมพืชได้ (Thormann *et al.* 1994) งานวิจัยที่ได้นำเทคนิคอาร์เอพีดีเข้ามาใช้ในการตรวจสอบพันธุ์พืช ได้แก่

Hu and quiros (1991) ศึกษาการใช้ อาร์เอพีดีในการตรวจสอบกะหล่ำ และ บรอคโคลี่โดยใช้ไพรเมอร์ 10 เบส 4 ชนิดตรวจสอบบรอคโคลี่ 14 สายพันธุ์ และกะหล่ำ 12 สายพันธุ์ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมีขนาด 300 – 2,600 คู่เบส 28 เปอร์เซ็นต์ของ RAPD marker ที่เกิดขึ้นจะพบทั้งในบรอคโคลี่ และกะหล่ำส่วนอีก 12.5 เปอร์เซ็นต์จะจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด

Koller *et al.* (1995) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกแอปเปิลจำนวน 11 สายพันธุ์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น มีรูปแบบที่แตกต่างกันในสายพันธุ์แอปเปิล 11 สายพันธุ์ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีผลต่อความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี และสามารถหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม เพื่อประโยชน์ในการตรวจหาสายพันธุ์แอปเปิล

Tinker *et al.* (1992) ศึกษาการทำอาร์เอพีดีในข้าวบาร์เล่ย์ สายพันธุ์แท้ 27 สายพันธุ์ และพวกที่เป็น double haploid อีก 20 สายพันธุ์ ใช้ไพรเมอร์ 10 เบส จำนวน 33 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ 19 ชนิดที่ทำให้เกิด polymorphism ที่แตกต่างกัน ของดีเอ็นเอทั้งหมดถูกจัดเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็น dominant ยกเว้น 1 แบบที่พบว่าเป็น codominant

Stiles *et al.* (1993) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธ์มะละกอจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มะละกอได้ ยังพบอีกว่ามะละกอ 7 สายพันธุ์ จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มฮาวาเอียน และอีก 3 สายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มอื่น ๆ

Yu and Nguyen (1994) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในการตรวจหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าว (*Oryza sativa* L.) นาดอนและนาลุ่ม 13 สายพันธุ์ พบว่าการใช้ไพรเมอร์ทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 260 ชิ้น และ 80 เปอร์เซ็นต์ ของชิ้นดีเอ็นเอแสดงการเป็น polymorphism สามารถใช้ในการสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมได้

Shah *et al.* (1994) ตรวจหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิด สามารถแสดง polymorphism ในช่วง 0.2 – 2.3 กิโลเบส และมีค่าดัชนีความเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.16 – 0.44

Sweeney and Danneberger (1994) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนก perennial ryegrass ซึ่งเป็นพันธุ์สังเคราะห์ คือ "Accolade" และ "Caravelle" โดยใช้ดีเอ็นเอจาก bulk sample จำนวน 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นและดีเอ็นเอจากแต่ละต้น นำมาทำอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด ผลปรากฏว่า ไพรเมอร์ 2 ชนิดสามารถใช้ในการจำแนกได้

Fernando and Cass (1995) ศึกษาโคลนของการจำแนก *Butornus umbellatus* ซึ่งเป็นพืชผสมข้าม โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า การจำแนกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ให้ผลรวดเร็วในการจำแนก

Benner *et al.* (1995) จำแนกหาค่า polymorphism ในกล้วยไม้สกุลแคทลียา (*Cattleya*) ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่าไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิดทำให้เกิด unique DNA fingerprint โดยดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.22 – 0.61

MaaB and Klaas (1995) ใช้เทคนิคไอโซไซม์และอาร์เอพีดี ในการจำแนกกระเทียม (*Allium sativum* L.) โดยใช้ไอโซไซม์จำนวน 12 ชนิด และไพรเมอร์ จำนวน 15 ชนิด ผลการวิเคราะห์สามารถแบ่งกระเทียมออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม Ophiocorodon, Suvtropical, longicuspis และ Sativum

Sharma *et al.* (1995) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง ลินิน (Linin) พันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 24 ชนิด สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism จำนวน 88 แถบ มีดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.54 – 0.90

Lu *et al.* (1996) จำแนกพันธุ์ท้อ (*Prunus persica* L.) จำนวน 18 พันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด สามารถตรวจพบไพรเมอร์ที่ทำให้เกิด polymorphism จำนวน 20 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 40 แถบ ทำให้สามารถแยกพันธุ์ท้อออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรค Root-Knot nematode ค่าดัชนีความเหมือนระหว่างพันธุ์อยู่ในช่วง 0.18 – 0.90

Parsons *et al.* (1997) ตรวจหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมสูง ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี และไอเอสเอสอาร์- พีซีอาร์ (ISSR - PCR) พบว่าไพรเมอร์จำนวน 14 ชนิดในเทคนิคอาร์เอพีดีได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 94 แถบ โดยมีไพรเมอร์ 47 ชนิดที่ทำให้เกิด polymorphism ค่าดัชนีความเหมือนภายในชนิดของข้าวได้ 0.30 – 0.95 ส่วนในกลุ่มของไอเอสเอสอาร์-พีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 71 แถบ มีไพรเมอร์จำนวน 40 ชนิด ทำให้ polymorphism ดัชนีความเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.40 – 0.95

วินิตชาญ รื่นใจชน (2540) นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้แยกความแตกต่างของหญ้าแฝก 10 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 144 ชนิด พบว่ามีอยู่ 12 ชนิด ที่ทำให้เกิด polymorphism นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจแยกหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอนได้ด้วย

พรรณาราย ขันธรักษา (2541) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวเหนียว 16 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส ทั้งหมด 120 ชนิด พบว่ามีอยู่ 8 ชนิดที่ทำให้เกิด polymorphism จำนวนทั้งหมด 63 แถบ และสามารถจัดกลุ่มข้าวเหนียวได้ 4 กลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มลิวรรณ นาคขุนทด (2541) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอในการศึกษาอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการของพืชสกุลมังคุด 12 ชนิด โดยในเทคนิคอาร์เอพีดีใช้ไพรเมอร์ 12 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 107 แถบ ส่วนเทคนิคอาร์เอเอ็มพีโอใช้ microsattelite โพรบจำนวน 11 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 94 แถบ เมื่อนำผลของอาร์เอพีดีและอาร์เอเอ็มพีโอมาวิเคราะห์สามารถบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ในแนวทางเดียวกัน

การประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยวิธี ordinary method หรือวิธี cluster analysis พบว่ามีการศึกษาในพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ กะหล่ำ (Hu and Quiros. 1991; Kresavich *et al.* 1992; Lanner *et al.* 1996) ข้าวสาลี (Devos and Gale. 1992; Castagna *et al.* 1997) โกโก้ (Wilde *et al.* 1992; Lerceteau *et al.* 1997) หญ้าสโตโล (Kazan *et al.* 1992) ข้าวบาร์เล่ย์ (Tinker *et al.* 1993) มะละกอ (Stiles *et al.* 1993) ข้าวฟ่าง (Tao *et al.* 1993) ขึ้นฉ่าย (Yang and Quiros. 1993) ผักกาดแดง (Jung *et al.* 1993) หอมกระเทียม (Susan *et al.* 1993; Wikkie *et al.* 1993; Maab and Klaas. 1995) แอปเปิล (Landry *et al.* 1994) ดอกบัว (Campos *et al.* 1994) กาแฟ (Orozco-Castillo *et al.* 1994) ข้าวโอ๊ต (Heun *et al.* 1994) ข้าว (Parminder *et al.* 1994; Yu and Nguyen. 1994; สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช และคณะ. 2538) มะเขือและมันฝรั่ง (Karihaloo *et al.* 1995; Spooner *et al.* 1997) ถั่วแดง (Sharma *et al.* 1995) ถั่วลันเตา (Hoey *et al.* 1996) แตงโม (Lee *et al.* 1996) กุหลาบ (Millan *et al.* 1996) ไม้เลื้อยต่างๆ (Arcade *et al.* 1996; Katzir *et al.* 1996; Pillay and Kenny. 1996) ข้าวโพด (Lanza *et al.* 1997) ผักโขม (Chan and Sun. 1997) ฝ้าย (Igbal *et al.* 1997) และมังคุด (มะลิวรรณ นาคขุนทด. 2541) สำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์เทคนิคอาร์เอพีดีในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช พบว่าสามารถใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีในการติดตามตรวจสอบยีนที่ควบคุมลักษณะที่เราต้องการ เช่น ใช้ในการติดตามตรวจสอบยีนที่ทำให้พืชต้านทานโรคของ มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum)* (Klein-Lankhorst *et al.* 1991; Martin *et al.* 1991) ผักกาดหอม (Michelmore *et al.* 1991) ถั่วลันเตา (Harley *et al.* 1993) กะหล่ำ (Paran and Michelmore. 1993) ข้าวบาร์เล่ย์ (Poulsen *et al.* 1995) ยาสูบ (Bai *et al.* 1995) Chinese elm (Benet *et al.* 1995) rapeseed (*Brassica napus*) (Fello *et al.* 1995.) ข้าวสาลี (Talbert *et al.* 1996; Dweikat *et al.* 1997) ลูกพลัม (Warburton *et al.* 1996) และหัวผักกาดแดง (Scholten *et al.* 1997) นอกจากนั้นยังได้นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชหลายชนิด ได้แก่ กุหลาบ (Torres *et al.* 1993) แอปเปิล (Koller *et al.* 1993) poplar (Castiglione *et al.* 1993) ผักกาด (Mailer *et al.* 1994) pigean pea (Ratnaparkhe *et al.* 1995) น้อยหน่า (Ronning *et al.* 1995) พริก (Prince *et al.* 1995) มะม่วง (Schnell *et al.* 1995) ฝ้าย (Multani and Lyon. 1995) และมันฝรั่ง (Spooner *et al.* 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกสกัดดีเอ็นเอ

Aitchitt *et al.* (1993) รายงานว่าเทคนิคทางชีวโมเลกุลจำเป็นต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มี คุณภาพและบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็มีข้อจำกัดในกรณีของการวิเคราะห์ผล โดยเฉพาะการใช้ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเนื้อเยื่อจากแหล่งต่างกัน หรือวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน มีผลทำให้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันได้บ้าง เนื่องจากความสามารถในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์จะแปรเปลี่ยนไปถ้ามีดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่ออื่นปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยทำให้การแปรผลในเทคนิคอาร์เอพีดี เปลี่ยนแปลงหรือผิดพลาดได้ (Weeden *et al.* 1992) Staub *et al.* (1996) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งเนื้อเยื่อ และสภาวะที่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากแหล่งปนเปื้อนอื่น ๆ ในการจำแนกพันธุ์แตงกวา โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีพบว่าดีเอ็นเอจากใบอ่อนเป็นแหล่งเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืช เนื่องจากว่าในพืชที่แก่จะประกอบด้วยสารต่าง ๆ โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีผลยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ และพบว่าดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น เชื้อราที่เกิดกับใบพืชเอง และพืชชนิดอื่นมีผลทำให้แถบของดีเอ็นเอไม่ชัดเจนและไม่ปรากฏ polymorphism ระหว่างพันธุ์แตงกวาที่ต้องการศึกษา นอกจากนั้น Porebski *et al.* (1997) ศึกษาการแยกสกัดดีเอ็นเอจากใบ *Fragaria* spp. ซึ่งเป็นพืชที่คล้ายคลึงกับ berry ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) แทนนิน (tannin) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) สูง ซึ่งสารเหล่านี้มีผลยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ นอกจากนี้แล้วการที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีสารพวกโพลีแซคคาไรด์สูงจะทำให้ดีเอ็นเอมีลักษณะข้นและเหนียวคล้ายกาว ทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติงานและไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เพราะสารดังกล่าวนี้จะยับยั้งกิจกรรมของ *Taq* DNA polymerase ในขณะทำปฏิกิริยา พีซีอาร์

2.3.3.1 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)

Aitchitt *et al.* (1993) ได้ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ใบสด พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB ความเข้มข้นสูง 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอเพียง 1 ครั้งด้วย chloroform-isoamyl alcohol แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย sodium acetate และ ethahnol เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสกัดดีเอ็นเอจากใบแก่ของอินทผาลัม (*Phoenix dactylifera* L.)

Fabbri *et al.* (1995) ใช้ CTAB buffer 25 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย tris - HCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 NaCl เข้มข้น 1.4 โมลาร์ EDTA เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ CTAB 2 เปอร์เซ็นต์ PVP 1 เปอร์เซ็นต์ β – mercaptoethanol เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ $NaHSO_3$ เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดตัวอย่างใบของโอลีฟพบว่าให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีได้ในการจำแนกพันธุ์มะม่วงของ

Valenzuela *et al.* (1997) ใช้ CTAB buffer ที่มี tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 1.4 โมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ CTAB เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ β -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาผลประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mercaptoethanol เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ให้ผลดีในการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะม่วง

การสกัดดีเอ็นเอจากใบของข้าวพันธุ์ U.S. rice ของ Cao and Oard (1997) ใช้บัฟเฟอร์ CTAB ซึ่งมีองค์ประกอบของ tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 5 โมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ CTAB เข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร β-mercaptoethanol เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร ใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและความเข้มข้นสูงสามารถนำมาใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดีได้

Menkir *et al.* (1997) ใช้ บัฟเฟอร์ CTAB ซึ่งมีองค์ประกอบของ tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.22 โมลาร์ NaCl เข้มข้น 0.8 โมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.22 โมลาร์ CTAB เข้มข้น 8 มิลลิลิตรต่อลิตร N – lauryl sarcosine เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สกัดดีเอ็นเอจากใบของข้าวฟ่าง

การสกัดดีเอ็นเอจากใบฝ้ายของ Igbal *et al.* (1997) ใช้บัฟเฟอร์ CTAB ซึ่งมีองค์ประกอบของ tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ NaCl เข้มข้น 14 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ PVP เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ CTAB เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ β- mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

การสกัดดีเอ็นเอจากใบของข้าวโพดของ Lanza *et al.* (1997) ใช้บัฟเฟอร์ CTAB ซึ่งมีองค์ประกอบของ tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 700 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ CTAB เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ β- mercaptoethanol เข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์

นอกจากนั้นในการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ raspberry (Parent and Page. 1998) กาแฟ (Orozco-Castillo *et al.*1994) ใบมันฝรั่ง (Demeke *et al.* 1996) แตงกวา (Staub *et al.* 1996; Kennard *et al.* 1994) กุหลาบ (Debener *et al.* 1996) พืชตระกูล malus (Ur-Rahman *et al.* 1997) Grimson clover (Steiner *et al.* 1998) และในข้าวสาลี (Hernandez *et al.* 1999) ก็ใช้ CTAB buffer ในการสกัดดีเอ็นเอเช่นกัน

2) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS (sodiumdodicylsulphate)

Dellaporta *et al.* (1983) ทำการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชพบว่า องค์ประกอบของ extraction buffer ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอได้ดี ประกอบด้วย tris-HCL pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ SDS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ β- mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

Keil and Griffin (1994) ใช้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ tris -HCl pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ PVP เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของยูคาลิปตัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Binelli and Bucci (1994) ใช้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ tris -HCl pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ β - mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ PVP เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของ *Picea abies* Karst.

Mackill (1995) ใช้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 700 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ β- mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ PVP เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว จำนวน 134 พันธุ์ เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าว

Huff (1997) ใช้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร tris -HCl pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ β- mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ PVP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของ ryegrass นอกจากนี้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS ยังใช้ในการสกัดดีเอ็นเอใบปาล์มน้ำมัน (Shah *et al.* 1994) และ จากใบของมะเขือเทศ (Chague. 1996)

3) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของเกลือ

Freqene *et al.* (1994) ใช้ extraction buffer ที่ประกอบด้วย tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อย

Divaret *et al.* (1999) ใช้ extraction buffer ที่ประกอบด้วย tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ NaCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจาก *Brassica Oleracea* L. นอกจากนี้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของเกลือยังใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของพิทูเนีย (Cerny *et al.* 1996) และ ใบถั่วเหลือง (Lange. 1998)

2.3.3.2 จำนวนรอบที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยง (centifuge) แยกดีเอ็นเอ

Fabbri *et al.* (1995) ใช้การหมุนเหวี่ยง 2,000 g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาดีเอ็นเอออกจากบัฟเฟอร์ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ ส่วน Mackill (1995) หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบข้าวออกจากบัฟเฟอร์ด้วยความเร็วรอบ 1,800 g เป็นเวลา 15 นาที Autio *et al.* (1998) หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบแอปเปิลด้วยความเร็วรอบ 10,000 g 10 นาที และ 15,000 g 10 นาที Cao and Oard (1997) ใช้ความเร็วในการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบข้าวพันธุ์ U.S.rice ด้วยความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 15 นาที ส่วนในการศึกษาของ Igbal *et al.* (1997) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที ได้ดีเอ็นเอเป็นวุ้นใสเหมาะที่จะใช้ในขั้นตอนศึกษาต่อไป Orozco-Castillo *et al.* (1994) หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบกาแฟออกจากบัฟเฟอร์ด้วยความเร็วรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8,000 g เป็นเวลา 15 นาที ในการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบ Grimson clover ออกจากบัฟเฟอร์ของ Steiner *et al.* (1998) ใช้ความเร็วรอบ 1,1000 g เป็นเวลา 2 นาที Ur-Rahman *et al.* (1997) หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบพืชตระกูล malus ออกจากบัฟเฟอร์ด้วยความเร็วรอบ 13,000 g เป็นเวลา 2 นาที Keil and Griffin (1994) หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบยูคาลิปตัสออกจากบัฟเฟอร์ด้วยความเร็วรอบ 13,000 g เป็นเวลา 5 นาที เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chague *et al.* (1996) ในการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอใบมะเขือเทศออกจากบัฟเฟอร์ และ Huff (1997) ใช้ความเร็วรอบสูงในการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกดีเอ็นเอจากใบหญ้า ryegrass โดยใช้ความเร็วรอบ 15,300 g เป็นเวลา 20 นาที

2.3.4 สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์

Aitchitt *et al.* (1993) รายงานว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ในพีซีอาร์มีผลต่อความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอ นอกจากนี้ Hoelzel and Green (1998) รายงานว่าการใช้ไพรเมอร์ (primer) ขนาด 10 -12 คู่เบส (base pair) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่ม มักพบว่าไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบสสามารถจับคู่ได้กับดีเอ็นเอทุก ๆ ประมาณ 1 ล้านเบส จึงทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นได้ และเมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีทางอิเล็คโตรโฟรีซีสมีแถบของ ดีเอ็นเอจำนวนไม่มากนักทำให้ตรวจสอบได้ง่าย

1.3.4.1 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Mackill (1995) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นจากใบข้าว มีองค์ประกอบของสารต่างๆในปฏิกิริยาดังนี้ คือ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 12.5 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 25 นาโนกรัม *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.5 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบ เข้มข้น 15 นาโนกรัม ซึ่งสารมารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 10 จาก 120 ไพรเมอร์ให้ polymorphism ที่แตกต่างกัน 30 แถบดีเอ็นเอ

Staub *et al.* (1996) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แก่ *Taq* DNA polymerase แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) และ dNTPs พบว่าสารแต่ละชนิดมีผลต่อการปรากฏของแถบดีเอ็นเอของแตงกวา และพบว่าสภาพที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิดที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี คือปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 9.0) Triton X –100 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgCl_2$ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส เข้มข้น 0.17 ถึง 0.33 มิลลิโมลาร์ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 15 นาโนกรัม และ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต

Lu *et al.* (1996) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากใบท้อ ใช้องค์ประกอบในปฏิกิริยาดังนี้ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

(pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.75 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 15 นาโนกรัม ซึ่งสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 20 ไพรเมอร์ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 40 แถบดีเอ็นเอ และใช้ 6 ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์และจำแนกพันธุ์ท้อได้ชัดเจน

Xu and Bakalinsky (1996) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์องุ่น 9 ตัวอย่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้ความเข้มข้นของสารดังนี้ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ Triton X –100 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 5 นาโนกรัม

Demeke *et al.* (1996) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของมันฝรั่งเพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ โดยใช้ความเข้มข้นของสาร ดังนี้ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ Gelatin 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgCl_2$ เข้มข้น 1.9 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 14 คู่เบส เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต และดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 3 นาโนกรัม

Debener *et al.* (1996) ใช้ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากใบกุหลาบ ดังนี้ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ Gelatin 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgCl_2$ เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 20 นาโนกรัม พบว่าจากไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ 13 ไพรเมอร์ให้ 104 polymorphism ซึ่งสามารถนำมาใช้จำแนกพันธุ์กุหลาบได้

Levi and Rowland (1997) ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในผักโขมโดยใช้ความเข้มข้นของสารดังนี้ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 9.0) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ Triton X –100 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgCl_2$ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.4 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 60 นาโนกรัม

Valenzuela *et al.* (1997) จำแนกพันธุ์มะม่วงโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีซึ่งในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ใช้ความเข้มข้นของสารดังนี้ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 3 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 25 นาโนกรัม ผลสามารถคัดเลือกไพรเมอร์จาก 40 ไพรเมอร์ ได้ 13 primer ให้ 109 แถบของดีเอ็นเอ สามารถจำแนกพันธุ์มะม่วงได้เป็น 4 กลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

McNally and Mutschler (1997) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆ ได้แก่ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส เข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 20 - 40 นาโนกรัม

Hansen *et al.* (1997) ทำการจำแนกพันธุ์ของพืชตระกูล *Brassica napus* โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่มีความเข้มข้นของสาร ดังนี้ tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.75 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 50 นาโนกรัม

Huang *et al.* (1997) ทำการศึกษาพันธุ์ข้าวโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาใช้ความเข้มข้นของสารดังนี้ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ gelatin 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgCl_2$ เข้มข้น 1.9 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์เข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 20 นาโนกรัม

Parent and Page (1998) ทำการจำแนกพันธุ์ raspberry 15 ตัวอย่าง โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ Gelatin 0.01 เปอร์เซ็นต์ dNTPs เข้มข้น 160 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 24 คู่เบส เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 10 นาโนกรัม

Autio *et al.* (1998) ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในแอปเปิลโดยใช้ความเข้มข้นของสารดังต่อไปนี้ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 10.15 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ gelatin 0.1 เปอร์เซ็นต์ dNTPs เข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ใช้ 0.55 ไมโครลิตร ไพรเมอร์เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ใช้ 0.1 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 5 ยูนิต ใช้ 0.1 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 10 นาโนกรัม

Hernandez *et al.* (1999) ศึกษาการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นของข้าวสาลีโดยใช้ความเข้มข้นของสารต่อปฏิกิริยาดังนี้ ปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตร tris – HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 8.3) KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส เข้มข้น 0.32 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต และดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 20 - 40 นาโนกรัมพบว่าเทคนิคอาร์เอพีดี เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์ได้ชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.2 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Binelli and Bucci (1994) ใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 92 องศา เป็นเวลา 1 นาที 55 วินาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 55 วินาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอของ *Picea abies* karst.ที่สมบูรณ์

Orozco-Castillo *et al.* (1994) ใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สังเคราะห์ดีเอ็นเอของกาแฟ

Kennard *et al.* (1994) ใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอของแตงกวา

Mackill (1995) ทำปฏิกิริยาในดีเอ็นของข้าว โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 66 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

Demeke *et al.* (1996) ศึกษาการจำแนกพันธุ์มันฝรั่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าการใช้ไพรเมอร์ขนาด 14 คู่เบส ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิสำหรับ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ annealing 35.5 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ extention 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำปฏิกิริยา 45 รอบ เป็นสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Lu *et al.* (1996) ใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอจากใบของท้อ

Xu and Bakalinsky (1996) ทำการจำแนกพันธุ์องุ่นโดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing ตามความยาวของไพรเมอร์ และอุณหภูมิสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

Debener *et al.* (1996) จำแนกพันธุ์กุหลาบปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิdenature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 วินาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 39 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

Baudracco-Arnas and Pitrat (1996) โดยใช้อุณหภูมิ denatureในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 92 องศาเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอของแตงโม

Pummi (1997) โดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 92 องศาเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 วินาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 15 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดีเอ็นเอข้าวฟ่าง

Levi and Rowland (1997) ศึกษาการจำแนกพันธุ์ผักโขม โดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 92 องศาเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 47 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

Valenzuela *et al.* (1997) ทำการจำแนกพันธุ์มะม่วงโดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

McNally and Mutschler (1997) ใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hansen *et al.* (1997) ใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอพืชตระกูล *Brassica napus*

Huang *et al.* (1997) จำแนกพันธุ์ข้าวโดยใช้ปฏิกิริยาพีซอาร์ ที่อุณหภูมิในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

Cao and Oard (1997) ศึกษาในข้าวพันธุ์ U.S.rice โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 41 รอบ

Huff (1997) โดยใช้อุณหภูมิ denatureในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 7 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอของ ryegrass ที่สมบูรณ์และชัดเจน

Schneider *et al.* (1997) ศึกษาการสร้างความต้านทานความแห้งแล้วในถั่วโดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 3 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

Chan and Sun (1997) ศึกษาการจำแนกพันธุ์ผักโขม โดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

Ur-Rahman *et al.* (1997) ทำการศึกษาพืชในตระกูล malus โดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 92 องศาเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 55 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peil *et al.* (1997) โดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing ใช้อุณหภูมิตามขนาดของไพรเมอร์ และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอของข้าวสาลี

Lanza *et al.* (1997) โดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอของข้าวโพด

Igbal (1997) โดยใช้อุณหภูมิ denature ในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ a nnealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอของฝ้าย

Hoelzel and Green (1998) รายงานว่าเมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีทางอิเล็กโตรโฟรีซีสมีแถบของดีเอ็นเอจำนวนไม่มากนักทำให้ตรวจสอบได้ง่าย และพบว่าความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในขั้นตอน annealing extension และ denaturing time จะมีผลต่อจำนวนแถบที่จะถูกเพิ่มปริมาณ (amplify) นอกจากนี้ยังได้แนะนำถึงวิธีการในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ว่าควรใช้อุณหภูมิสำหรับ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 45 รอบ

Parent and Page (1998) ใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ในปฏิกิริยาในดีเอ็นเอของ raspberry

Autio *et al.* (1998) ใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของแอปเปิล

Hernandez *et al.* (1999) ใช้อุณหภูมิในระยะแรกของปฏิกิริยาที่ 94 องศาเป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงใช้อุณหภูมิสำหรับ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที อุณหภูมิสำหรับ annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และอุณหภูมิสำหรับ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ หลังจากนั้นในขั้นสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสมบูรณ์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของข้าวสาลี

2.3.5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลของเทคนิคอาร์เอพีดี

2.3.5.1 ความเข้มข้นของเจลที่ใช้ตรวจสอบผล

ในการตรวจสอบผลของเทคนิคอาร์เอพีดีโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ในแต่ละงานวิจัยใช้ความเข้มข้นของเจลแตกต่างกัน เช่น Hernandez *et al.* (1999) ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน ดีเอ็นเอของข้าวสาลี ส่วน Igbal (1997) ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน ดีเอ็นเอของฝ้าย Peil *et al.* (1997) ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.3 เปอร์เซ็นต์ ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน ดีเอ็นเอของข้าวสาลี และในมันฝรั่ง (Demeke *et al.* 1996) ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.8 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีศึกษาใน ท้อ (Lu *et al.* 1996) กุหลาบ (Debener *et al.* 1996) ข้าว (Huang *et al.* 1997) malus (Ur-Rahman *et al.* 1997) และ ข้าวโพด (Lanza *et al.* 1997) ใช้เจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนั้นยังมีการใช้เจล ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อตรวจสอบผลในผักโขม (Levi and Rowland. 1997, Chan and Sun.1997, Binelli and Bucci.1994) raspberry (Parent and Page.1998) มะม่วง (Valenzuela *et al.* 1997) ข้าวพันธ์ U.S. rice (Cao and Oard.1997) common bean (Schneider *et al.* 1997) แตงกวา (Kennard *et al.* 1994) ส่วนเจลความเข้มข้น 2.0เปอร์เซ็นต์ มีใช้ในข้าว (Mackill. 1995) แอปเปิล (Autio *et al.* 1998) องุ่น (Xu and Bakalinsky.1996) แตงโม (Baudracco-Arnas and Pitrat.1996) *Picea abies* Karst. (Orozco-Castillo *et al.* 1994) ส่วนการใช้เจลความเข้มข้นสูงมีใช้ในงานวิจัยของ Hansen *et al.* (1997) ใช้ความเข้มข้นของเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน ดีเอ็นเอของ *Brassica napus*

2.3.5.2 กระแสไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

Levi and Rowland (1997) ใช้ ความต่างศักย์ 110 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสในผักโขม เพื่อตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของมันฝรั่ง Demeke *et al.* (1996) ใช้กระแสไฟฟ้าในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสตรวจสอบผลของเทคนิคอาร์เอพีดี 5 โวลต์ต่อเซ็นติเมตร เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ส่วน Mackill (1995) ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของ ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ด้วยกระแสไฟฟ้า 70 - 90 โวลต์ เป็นระยะเวลา 3 - 4 ชั่วโมง ในการตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจลในข้าว Huang *et al.* (1997) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 5 โวลต์ต่อเซ็นติเมตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5.3 ความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์

Hernandez *et al.* (1999) ตรวจสอบผลจากการจำแนกพันธุ์ข้าวสาลี โดยใช้เอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการย้อมเจลตรวจสอบผลจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเช่นเดี่ยวกับ กุหลาบ (Debener *et al.* 1996) common bean (Schneider *et al.* 1997) แตงกวา (Kennard *et al.* 1997) นอกจากนี้ Valenzuela *et al.* (1997) ใช่เอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาทีในการย้อมเจลตรวจสอบผลจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสในดีเอ็นเอของมะม่วง และ MacNally and Mutschler (1997) ใช้เอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 3.0 นาโนกรัมต่อลิตรในการย้อมเจลตรวจสอบผลจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างใบอ่อนปาล์มน้ำมัน

ใบอ่อนปาล์มน้ำมันมันอายุ 5 ปี จำนวน 10 กรัม จากปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง คือ พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ดูร่า 588 , ดูร่า589 , ดูร่า 671 พิซิเฟร่า 425 , พิซิเฟร่า 427 , ลูกผสม F 62 และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

3.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่

1) โกร่งบดสาร
2) หลอดพลาสติก (eppendorf) ขนาด 2.5 มิลลิลิตร
3) ช้อนตักสารขนาดเล็ก (spatulas)
4) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centifuge) ได้แก่ Hettich Mikro 20, Hettich EBA 12R และ Hettich Universal 32R
6) pipette tip ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
7) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (freezer)
8) เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (รุ่น Satorius Ba 4100S) และ4 ตำแหน่ง (รุ่น Chyo JL-200)
9) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น Mettler Toledo 340 pH meter
10) เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ รุ่น Thermolyne cimarec 2 และแท่งแม่เหล็ก
11) เครื่องตวงสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ (micropipet) ขนาด 2, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร รุ่น Gilson pipetman

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (องค์ประกอบแสดงในภาคผนวก 1.1) ได้แก่

1) ไนโตรเจนเหลว
2) สารละลาย tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0
3) สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0
4) สารละลาย extraction buffer (EB)
5) สารละลาย cethyltrimethylammonium bromide (CTAB)

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) สารละลาย sodiumdodicylsulphate (SDS) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

7) สารละลาย chloroform - isoamyl alcohol

8) polyvinylpyrolydone - 4000 (PVP-40)

9) β – mercaptoethanol

10) สารละลาย potassium acetate (KAC) เข้มข้น 5 โมลาร์

11) สารละลาย TE buffer pH 8.0

12) ethanol เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์

13) isopropanol (ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส)

14) สารละลาย RNase

15) น้ำกลั่น

3.1.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่

1) เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส แบบแนวนอน รุ่น Easycast Model # B2

2) เครื่องตวงสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ (micropipet) ขนาด 2, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร รุ่น Gilson pipetman

3) pipette tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

4) เตาไมโครเวฟ (microwave oven)

5) เครื่องถ่ายภาพจาก UV รุ่น Vilber lourmat

6) เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (รุ่น Satorius Ba 4100S) และ 4 ตำแหน่ง (รุ่น Chyo JL-200)

7) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น Mettler Toledo 340 pH meter

8) เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ รุ่น Thermolyne cimarec 2 และแท่งแม่เหล็ก

9) ถาดสำหรับเตรียมอะกาโรสเจล

3.1.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (องค์ประกอบแสดงในภาคผนวก 1.2) ได้แก่

1) ผงอะกาโรส (agarose)

2) สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3) สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

4) สารละลาย TBE buffer

5) สารละลาย ethidium bromide เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

6) สารละลาย dye เข้มข้น 10 เท่า

7) สารละลาย loading dye

8) สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน เข้มข้น 10,100 และ 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำเทคนิคอาร์เอพีดี

3.1.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แก่

1) หลอดพลาสติกผนังบางขนาด 0.5 มิลลิลิตร

2) เครื่อง DNA thermal cycler รุ่น PTC 100

3) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centifuge) ได้แก่ Hettich Mikro 20

4) เครื่องวัดสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ (micropipette) ขนาด 2, 20, และ 200 ไมโครลิตร รุ่น Gilson pipetman

3.1.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (องค์ประกอบแสดงในภาคผนวก 1.3)

1) PCR buffer (10 X buffer) DyNAzyme ของบริษัท Finnzyme เข้มข้น 10 เท่า

2) สารละลาย $MgCl_2$ ของบริษัท Finnzyme เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

3) *Taq* DNA polymerase DyNAzyme ของบริษัท Finnzyme เข้มข้น 2 ยูนิต

4) arbitary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ของบริษัท Operon Technology

5) dNTPs เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 (ประกอบด้วย dATP dCTP dTTP และ dGTP แต่ละตัวเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์) ของบริษัท SibNzyme

6) ดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมัน เข้มข้น 100 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร

7) น้ำกลั่น

3.1.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลพีซีอาร์

1) เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส รุ่น Easycast Model # B2

2) เครื่องวัดสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ (micropipette) ขนาด 2, 20, และ 200 ไมโครลิตร รุ่น Gilson pipetman

3) ถาดสำหรับเตรียมอะกาโรสเจล

3.1.3.4 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลพีซีอาร์ (องค์ประกอบแสดงในภาคผนวก 1.2 และ1.3)

1) ผงอะกาโรส (agarose)

2) สารละลาย TBE buffer

3) สารละลาย ethidium bromide เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4) สารละลาย loading dye

5) สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

3.1.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ผลเทคนิคอาร์เอพีดี

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS - pc รุ่น 2.02j

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืชจำนวน 32 ตัวอย่าง พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ดูร่า 588 , ดูร่า 589 , ดูร่า 671 พิซิเฟร่า 425 , พิซิเฟร่า 427 , ลูกผสม F 62 และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่างโดยเลือกเก็บเฉพาะใบอ่อนที่มีสีเขียวอ่อนปนขาว หรือเป็นใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ออกเป็นทางใบ ซึ่งจะเป็นใบที่สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ง่าย

3.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอ ใช้บัฟเฟอร์ 3 ชนิด ได้แก่

3.2.2.1 CTAB buffer (Doyles and Doyles. 1987)

3.2.2.2 salt buffer (Ying *et al.* 1990)

3.2.2.3 SDS buffer (Dellaporta *et al.* 1983)

(วิธีการสกัดดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์แต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก 1.4)

3.2.3 การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ (วิธีการแสดงในภาคผนวก 1.5)

การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอทำโดยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแล้วเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Sambrook *et al.* 1989)

3.2.4 วิธีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

3.2.4.1 การเตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (วิธีการแสดงในภาคผนวก 1.6)

องค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำกลั่น PCR buffer เข้มข้น 10 เท่า dNTPs เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 2 ยูนิต และดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน เข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

3.2.4.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำด้วยเครื่อง DNA thermal cycler รุ่น PTC100 โดยตั้งโปรแกรม พีซีอาร์ ตามขั้นตอนต่อไปนี้ (วิธีการแสดงในภาคผนวก 1.7)

1) ตั้งค่าจำนวนรอบที่เหมาะสมกับชนิดของดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา
2) ตั้งค่าระดับอุณหภูมิ และเวลาสำหรับขั้นตอน predenaturation
3) ตั้งค่าระดับอุณหภูมิ และเวลาสำหรับขั้นตอน denaturation
4) ตั้งค่าระดับอุณหภูมิ และเวลาสำหรับขั้นตอน annealing
5) ตั้งค่าระดับอุณหภูมิ และเวลาสำหรับขั้นตอน primer extension
6) ตั้งค่าระดับอุณหภูมิและเวลาที่รอบสุดท้ายสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (วิธีการแสดงในภาคผนวก 1.8)

หลังจากทำพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจล แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์

3.2.6 การวิเคราะห์ผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี

วิเคราะห์ข้อมูลการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc รุ่น 2.02j

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1 การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกสกัดดีเอ็นเอ (วิธีการสกัดของบัฟเฟอร์แต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก 1.4)

3.3.1.1 เปรียบเทียบบัฟเฟอร์ 3 ชนิดที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ ได้แก่

1) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ CTAB

2) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ salt

3) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS

3.3.1.2 การศึกษาความเร็วในการหมุนเหวี่ยง

ทำการปรับเปลี่ยนจำนวนรอบที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงแยกสกัดดีเอ็นเอเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 6,000 8,000 10,000 และ 12,000 รอบต่อนาที

3.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.3.2.1 ความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แก่

1) ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 1.5, 2.5, 3.0, และ 4.0 มิลลิโมลาร์

2) ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 100, 150, 200, และ 250 ไมโครโมลาร์

3) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0.2, 0.3, 0.4, และ 1.0 ไมโครโมลาร์

4) ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0.2, 0.4, 0.8, และ 1.0 ยูนิต

5) ความเข้มข้นขอดีเอ็นเอแม่แบบที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 10 20 40 และ 50 นาโนกรัม

3.3.2.2 ขั้นตอนการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ประกอบด้วย

ทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็น 3 ระดับ ดังนี้ คือ 36, 40, และ 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.3.3.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลซึ่งมีผลต่อการตรวจสอบผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 0.8, 1.0, 1.5, และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

3.3.3.2 ระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ได้แก่ ที่ระดับความต่างศักย์ไฟฟ้า 4 ระดับ ได้แก่ 70, 80, 90, และ 100โวลต์

3.3.3.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10, 20, 30, และ 40 นาที

ตารางที่ 3.1 แสดงไพรเมอร์100 ชนิดของบริษัท Operon Technologies ที่ใช้ในการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่หมาะสมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขลำดับของไพรเมอร์
OPA	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPC	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPD	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPE	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20
OPF	1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16, 17, 18,19 และ 20

3.3.4 การคัดเลือกชนิดไพรเมอร์ที่หมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน

ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ของบริษัท Operon Technology จำนวน 100 ชนิด (ตารางที่ 3.1) คัดเลือกไพรเมอร์แต่ละชนิดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วทำการตรวจสอบผลว่าแถบดีเอ็นที่ได้จากปฏิกิริยาในไพรเมอร์แต่ละชนิดให้ polymorphism ที่เหมาะสมสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้

3.3.5 การตรวจสอบผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี

3.3.5.1 หลังจากทำพีซีอาร์นำสารละลายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ 5 ไมโครลิตรมาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจล ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า ที่เหมาะสมจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลอง ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกผลว่าไพรเมอร์ชนิดใดให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มากหรือก่อให้เกิดความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอซึ่งเหมาะสมที่จะใช้กับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน

3.3.5.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วมาใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์เป็นต้นแบบด้วยวิธีพีซีอาร์โดยมีส่วนผสมและวิธีการเช่นเดียวกับที่อธิบายในข้อ 3.2.4.1 เทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วย 100 base pair DNA ladder marker ขนาด ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยการย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์และถ่ายภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพรุ่น Vilberlourmat TCX-20.M และ SONY Video graphic printer Up-895 MD ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผลเขียน polymorphism วิเคราะห์ ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยอ่านจากแถบ polymorphism แล้วบันทึกข้อมูลโดยจะกำหนดเลขสัญลักษณ์ “1” กับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น วิเคราะห์ข้อมูลการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc รุ่น 2.02j ในขั้นตอนการทำ similarity ใช้โปรแกรม SIMQUAL คำนวณโดยวิธีการของ Jaccard (1908) แสดงเป็นค่าสมการได้ดังนี้

$$\text{coefficient} = a/(n-d)$$

แล้วทำ cluster analysis เพื่อสร้าง phylogenic tree ในขั้นตอนนี้ใช้ SAHN เพื่อแปลผลข้อมูลที่เป็นตัวเลขโดยใช้ โปรแกรม UPGMA (Unweighted pair-group method, arithmetic average) แล้วทำการหาค่าจาก tree โดยใช้ FIND

3.4 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.5 ระยะเวลาดำเนินงาน

เดือนพฤษภาคม 2544 – พฤศจิกายน 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

4.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน

จากการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช่ในการสกัดดีเอ็นเอ 3 ชนิดได้แก่ บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ CTAB (Castiglione *et al.* 1993; Heun *et al.* 1994; Hoey *et al.* 1996; Karihaloo *et al.* 1995; Kresavich *et al.* 1992; Pillay and Kenny. 1996; Ratnaparkhe *et al.* 1995; Schnell *et al.* 1995; Spooner *et al.*1997; Warburton *et al.* 1996) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของเกลือ (Freqene *et al.* 1994; Divaret *et al.* 1999; Lange. 1998; Cernet *et al.* 1996) บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS (Kazan *et al.* 1992; Koller *et al.* 1993; Stiles *et al.* 1993; Susan *et al.* 1993; Talbert *et al.* 1996 Wilde *et al.* 1992; Nozaki *et al.* 2000) พบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันที่ให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ สะอาดบริสุทธิ์ เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนเทคนิค อื่นๆ ต่อไป คือ บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS ตามวิธีการดัดแปลงของ Dellaporta *et al.* (1983) โดยดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 300 - 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นวุ้นใสและมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากพอ ที่จะสามารถเก็บเป็น stock สำหรับใช้ในขั้นตอนในการทำเทคนิคอาร์เอพีดีต่อไป บัฟเฟอร์ชนิดดังกล่าวจึงเหมาะที่จะใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 4.1)

4.1.2 ผลการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างกัน

ในการเปรียบเทียบการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4 ระดับได้แก่ 6,000 รอบต่อนาที (Fabbri *et al.*1995; Mackill. 1995) 8,000 รอบต่อนาที (Cao and Oard 1997; Orozco-Castillo *et al.* 1994) 10,000 รอบต่อนาที (Ratnaparkhe *et al.* 1995; Autio *et al.* 1998) และ 12,000 รอบต่อนาที (Kazan *et al.* 1992; Stiles *et al.* 1993; Tinker *et al.*1993) พบว่าการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที สามารถแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากสารละลายบัฟเฟอร์ ได้ปริมาณของดีเอ็นเอมากที่สุด และดีเอ็นที่ได้มีคุณภาพดีไม่ขาดเสียหาย (รูปที่ 4.2)

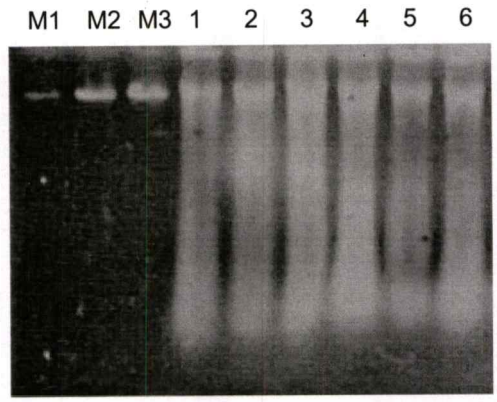
4.2 สภาวะที่เหมาะสมของการใช้เทคนิค

4.2.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์

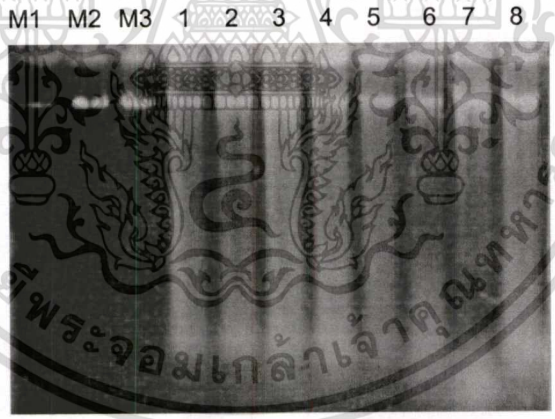
4.2.1.1 ผลการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 4 ระดับได้แก่ 1.5 มิลลิโมลาร์ (Castagna *et al.* 1997; Devos and Gale. 1992 ; Heun *et al.* 1994; Mailer *et al.* 1994; Pillay and Kenny. 1996; Ratnaparkhe *et al.* 1995) 2.5 มิลลิโมลาร์ (Bai *et al.* 1995; Benet *et al.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากบัฟเฟอร์ที่องค์ประกอบต่างกัน
M1, M2 และ M3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 10, 100 และ200 นาโนกรัม ตามลำดับ
1 และ 2 คือ ดีเอ็นเอ ที่สกัดโดยใช้ บัฟเฟอร์ ที่มีองค์ประกอบ ของ CTAB
3 และ 4 คือ ดีเอ็นเอ ที่สกัดโดยใช้ บัฟเฟอร์ ที่มีองค์ประกอบ ของ salt
5 และ 6 คือ ดีเอ็นเอ ที่สกัดโดยใช้ บัฟเฟอร์ ที่มีองค์ประกอบ ของ SDS



รูปที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่างกัน 4 ระดับ
M1, M2 และ M3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 10, 100 และ200 นาโนกรัม ตามลำดับ
1 และ 2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้การหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที
3 และ 4 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้การหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที
5 และ 6 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้การหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ10,000 รอบต่อนาที
7 และ 8 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้การหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ12,000 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1995;Hoey *et al.* 1996; Koller *et al.* 1993; Lanza *et al.* 1997) 3.0 มิลลิโมลาร์ (Chan and Sun. 1997; Karihaloo *et al.* 1995; Schnell *et al.* 1995) และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (Kazan *et al.* 1992; Tao *et al.* 1993) พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 2.5 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.3)

4.2.1.2 ผลการปรับความเข้มข้นของ dNTPs

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ dNTPs 4 ระดับได้แก่ 100 ไมโครโมลาร์ (Campos *et al.* 1994; Devos and Gale. 1992; Heun *et al.* 1994; Koller *et al.* 1993; Kresavich *et al.* 1992; Ratnaparkhe *et al.* 1995; Schnell *et al.* 1995; Scholten *et al.* 1997) 150 ไมโครโมลาร์ (Maab and Klaas. 1995; Stiles *et al.* 1993) 200 ไมโครโมลาร์ (Bai *et al.* 1995; Benet *et al.* 1995; Castagna *et al.* 1997; Karihaloo *et al.* 1995; Kazan *et al.* 1992; Mailer *et al.* 1994; Susan *et al.* 1993; Nozaki *et al.* 2000) และ 250 ไมโครโมลาร์ (Autio *et al.* 1998) พบว่า ความเข้มข้นของ dNTPs ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 200 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.4)

4.2.1.3 ผลการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ primer 4 ระดับได้แก่ 0.2 ไมโครโมลาร์ (Castagna *et al.* 1997; Hoey *et al.* 1996; Kazan *et al.* 1992; Kresavich *et al.* 1992; Lanza *et al.* 1997; Stiles *et al.* 1993; Susan *et al.* 1993) 0.3 ไมโครโมลาร์ (Schnell *et al.* 1995; Arcade *et al.* 2000) 0.4 ไมโครโมลาร์ (Maab and Klaas. 1995) และ 1.0 ไมโครโมลาร์ (Pillay and Kenny. 1996) พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 0.2 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.5)

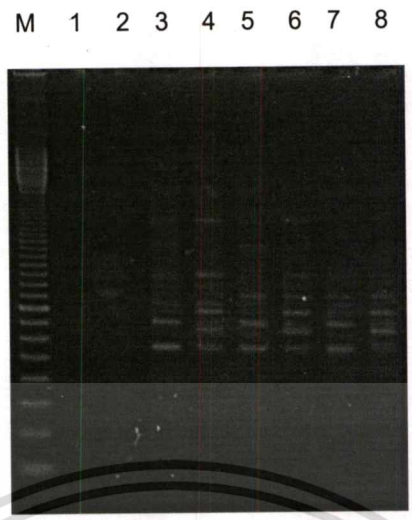
4.2.1.4 ผลการปรับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมเปรียบเทียบ 4 ระดับได้แก่ 0.2 ยูนิต (Ratnaparkhe *et al.* 1995) 0.4 ยูนิต (Kresavich *et al.* 1992; Schnell *et al.* 1995; Nozaki *et al.* 2000) 0.8 ยูนิต (Devos and Gale. 1992; Mailer *et al.* 1994; Stiles *et al.* 1993) และ 1.0 ยูนิต (Campos *et al.* 1994; Castagna *et al.* 1997; Karihaloo *et al.* 1995; Koller *et al.* 1993; Landry *et al.* 1994; Poulsen *et al.* 1995; Susan *et al.* 1993) พบว่าความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 0.4 ยูนิต (รูปที่ 4.6)

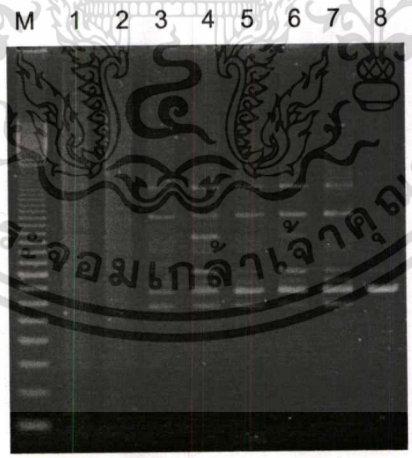
4.2.1.5 ผลการปรับความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอแม่แบบ

ในการเปรียบเทียบเพื่อหาความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมในปฏิกิริยาโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นใน 4 ระดับได้แก่ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Ratnaparkhe *et al.* 1995; Scholten *et al.* 1997; Stiles *et al.* 1993; Arcade *et al.* 2000) 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Campos *et al.* 1994;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ หรือในเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

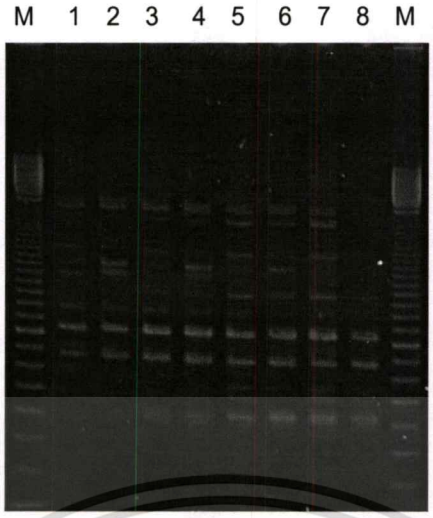


รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair
1 และ 2 ใช้ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า
3 และ 4 ใช้ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า
5 และ 6 ใช้ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า
7 และ 8 ใช้ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า



รูปที่ 4.4 แสดงผลการเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker
1 และ 2 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า
3 และ 4 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า
5 และ 6 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า
7 และ 8 ใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่า และพิซิเฟร่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker
1 และ 2 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
3 และ 4 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
5 และ 6 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
7 และ 8 ใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

รูปที่ 4.6 แสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่ระดับ ต่าง ๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker
1 และ 2 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 0.2 ยูนิต ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
3 และ 4 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 0.4 ยูนิต ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
5 และ 6 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 0.8 ยูนิต ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
7 และ 8 ใช้ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้น 1.0 ยูนิต ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Castiglione *et al.* 1993; Devos and Gale. 1992; Tinker *et al.*1993) 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (McNally and Mutschler. 1995; Hernandez *et al.* 1999) และ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Maab and Klaas. 1995; Poulsen *et al.* 1995; Susan *et al.* 1993; Talbert *et al.* 1996; Tao *et al.* 1993) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบอ่อนปาล์มน้ำมันคือ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.7)

4.2.2 ผลจากการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

จากการเปรียบเทียบอุณหภูมิ annealing 3 ระดับได้แก่ 36 องศาเซลเซียส (Castagna *et al.* 1997; Devos and Gale. 1992; Ratnaparkhe *et al.* 1995) 40 องศาเซลเซียส (Pillay and Kenny. 1996; Nozaki *et al.* 2000) และ 45 องศาเซลเซียส (Kazan *et al.* 1992; Lerceteau *et al.* 1997) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน คือ อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (รูปที่ 4.8)

4.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์

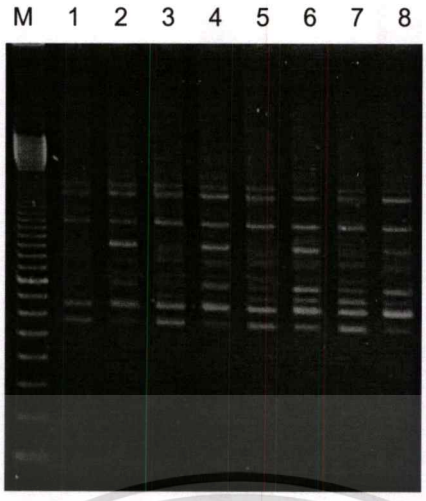
4.3.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของเจลในขั้นตอนการตรวจสอบผล

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นอะกาโรสเจล 4 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Hu and Quiros. 1991) 1.0 เปอร์เซ็นต์ (Campos *et al.* 1994; Kazan *et al.* 1992; Lerceteau *et al.* 1997) 1.5 เปอร์เซ็นต์ (Devos and Gale. 1992; Heun *et al.* 1994; Karihaloo *et al.* 1995; Lanza *et al.* 1997; Maab and Klaas. 1995; Pillay and Kenny. 1996; Poulsen *et al.* 1995; Scholten *et al.* 1997; Stiles *et al.* 1993; Arcade *et al.* 2000) และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (Paran and Michelmore. 1993; Sharma *et al.* 1995; Warburton *et al.* 1996; Nozaki *et al.* 2000) พบว่าการใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นความข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นชัดเจนสามารถตรวจสอบผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.9)

4.3.2 ผลการปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

จากการเปรียบเทียบความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสใน 4 ระดับได้แก่ 70, 80, 90, และ 100 โวลต์ พบว่า ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส เพื่อตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปาล์มน้ำมัน ควมต่างศักย์ที่เหมาะสม คือ 80 โวลต์ เนื่องจากให้ความชัดเจนและระยะห่างระหว่างแถบของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างดีที่สุด (รูปที่ 4.10)

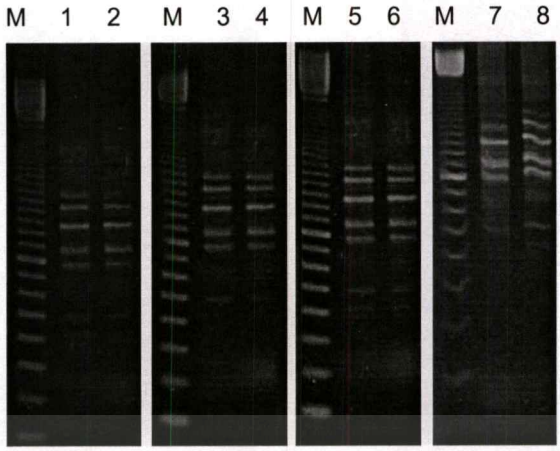
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4. 7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมันที่ระดับความเข้มข้น ต่างๆ
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker
1 และ 2 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
3 และ 4 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
5 และ 6 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 30 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
7 และ 8 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความเข้มข้น 40 นาโนกรัม ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

รูปที่ 4.8 ผลจากการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker
1 และ 2 ใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
3 และ 4 ใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 40 องศาเซลเซียส ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า
5 และ 6 ใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 45 องศาเซลเซียส ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงผลการตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจลระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

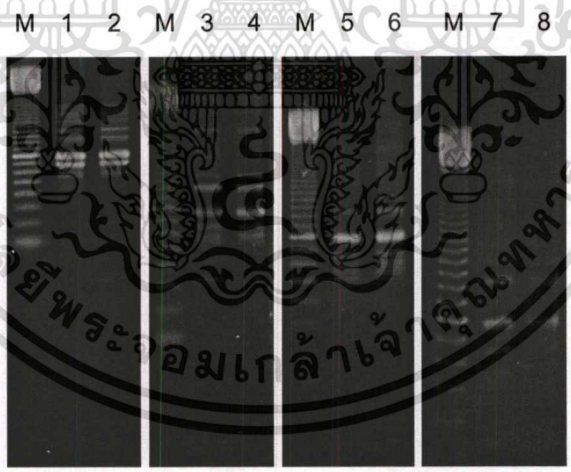
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

1 และ 2 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

3 และ 4 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

5 และ 6 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

7 และ 8 ใช้อะกาโรสเจล เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า



รูปที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบความต่างศักย์ของไฟฟ้าระดับต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair ladder marker

1 และ 2 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 70 โวลต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

3 และ 4 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

5 และ 6 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

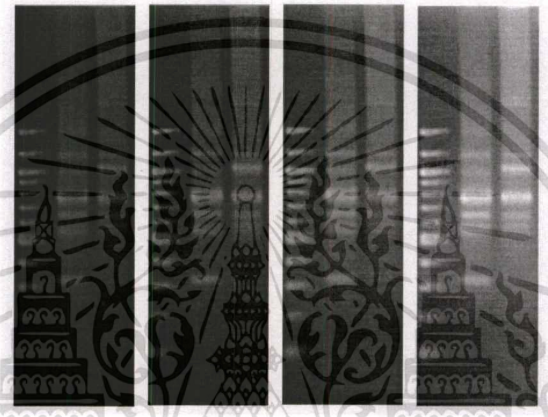
7 และ 8 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการปรับความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ในการย้อมตรวจสอบผล

จากการเปรียบเทียบระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนที่สุด 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 10 นาที (Mailer *et. al.* 1994) 20 นาที (Hu and Quiros. 1991) 30 นาที (Dweikat *et. al.* 1997) และ 40 นาที (Devos and gale. 1992) พบว่าความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ที่เหมาะสมในการใช้ย้อมเจลเพื่อตรวจสอบผล คือ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากทำให้มองเห็นแถบสว่างของดีเอ็นเอ ได้ชัดเจนที่สุด (รูปที่ 4.11)

M 1 2 M 3 4 M 5 6 M 7 8



รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 base pair DNA ladder marker

1 และ 2 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 10 นาทีในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

3 และ 4 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 20 นาทีในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

5 และ 6 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 30 นาทีในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

7 และ 8 ใช้ระยะเวลาในการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ 40 นาทีในพันธุ์ดูร่าและพิซิเฟร่า

4.4 ผลการคัดเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ จากไพรเมอร์ทั้งหมด 100 ชนิด ใน 5 ชุด ได้แก่ OPA OPC OPD OPE และ OPF ของบริษัท Operon Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ดูร่า 588 , ดูร่า 589 , ดูร่า 671, พิซิเฟร่า 425, พิซิเฟร่า 427, ลูกผสม F 62 และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม พบว่ามีไพรเมอร์ 14 ชนิด (ตารางที่ 4.1) ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนของแถบแบน (major band) และแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบจาง (minor band) โดยเมื่อพิจารณาเฉพาะแถบดีเอ็นเอ ที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากไพรเมอร์แต่ละชนิดจะให้

ตารางที่ 4.1 แสดงชนิดของไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ทำการคัดเลือกเพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับเบส
1.OPA11	5'CAATCGCCGT3'
2.OPA17	5'GACCGCTTGT3'
3.OPC07	5'GTCCCGACGA3'
4.OPC08	5'TGGACCGGTG3'
5.OPC15	5'GGCGGATCAG3'
6. OPD01	5'ACCGCGAAGG3'
7. OPD03	5'GTGGCCGTCA3'
8. OPD12	5'CACCGTATCC3'
9. OPE01	5'CCCAAGGTCC3'
10. OPE16	5'GGTTACTGTG3'
11. OPE17	5'CTACTGCCGT3'
12. OPE19	5'ACGGCGTATG3'
13.OPF07	5'CCGATATCCC3'
14.OPF08	5'GGGATATCGG3'

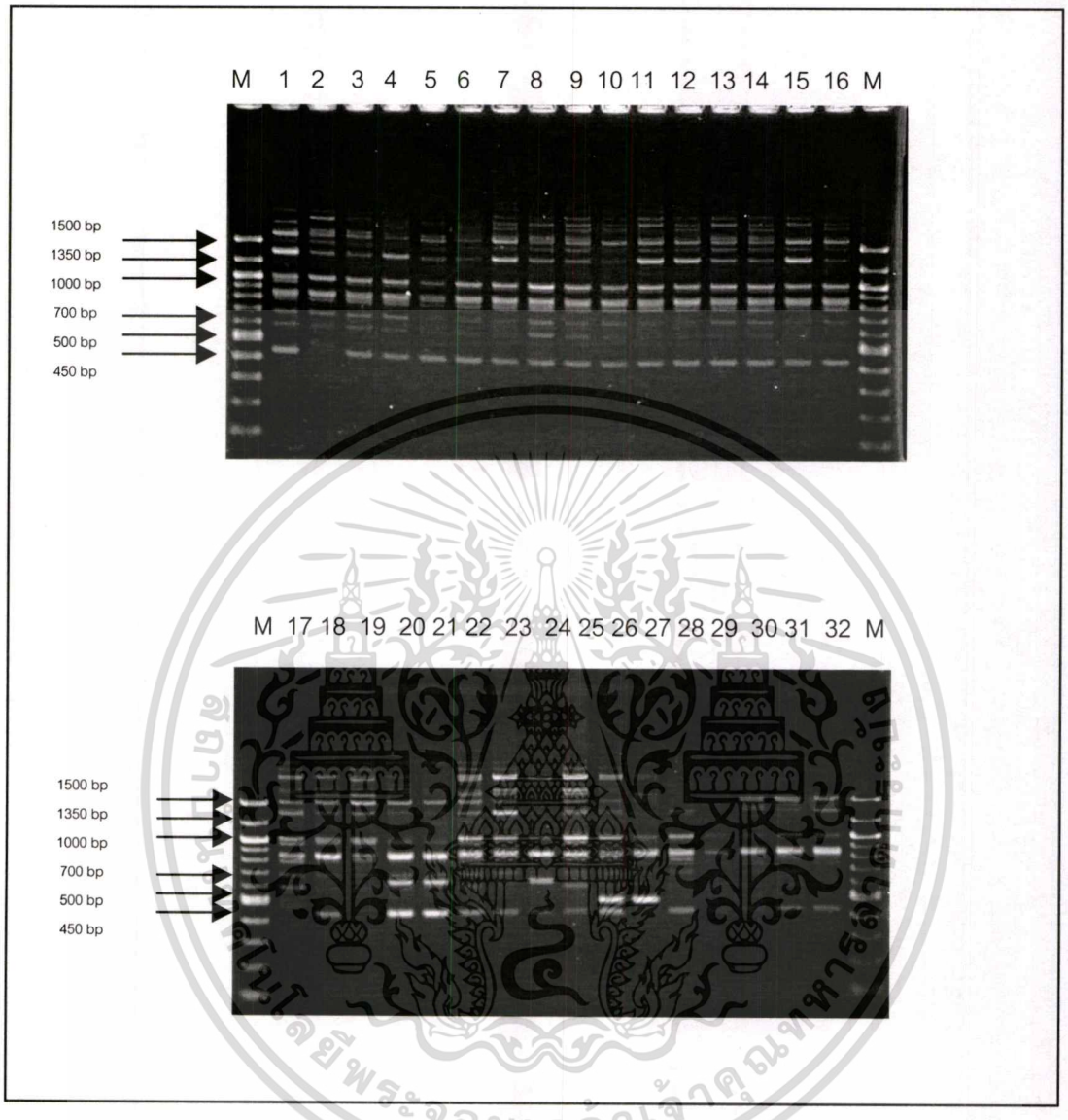
จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันในปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าสามารถเห็นความแตกต่างจนเกิดรูปแบบเฉพาะพันธุ์ และระหว่างพันธุ์ซึ่งเรียกว่าเกิด polymophism โดยที่แถบดีเอ็นเอจะมีจำนวนระหว่าง 3 - 9 แถบ เฉลี่ย 6 แถบต่อ 1 ไพรเมอร์ ขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35 – 1.7 กิโลเบส จำนวนทั้งหมด 81 แถบ (ตารางที่ 4.2) จำนวนแถบและขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในบางแถบเมื่อเปรียบเทียบกันภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่ม จากการทดลองนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีความจำเพาะในแต่ละพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ดูร่า พิซิเฟร่า และพันธุ์ลูกผสม เทเนร่า ก็จะมีแถบดีเอ็นเอที่เป็นแบบร่วมระหว่างต้นพ่อพิซิเฟอร่า และต้นแม่ดูร่าเสมอ (รูปที่ 4.12 – 4.25)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงลำดับเบสจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 14 ชนิด กับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง

ลำดับ	ชนิดไพรเมอร์	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (base pair)
1	OPA11	7	450 - 1500
2	OPA17	5	680 - 1500
3	OPC07	6	550 - 1700
4	OPC08	3	750 - 1200
5	OPC15	5	600 - 1800
6	OPD01	5	600 - 1400
7	OPD03	9	380 - 1250
8	OPD12	6	600 - 1450
9	OPE01	7	500 - 1100
10	OPE16	5	650 - 1350
11	OPE17	6	550 - 1500
12	OPE19	6	400 - 1400
13	OPF07	5	350 - 1000
14	OPF08	6	450 - 1200
รวม		81	อยู่ในช่วง 350 - 1700

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

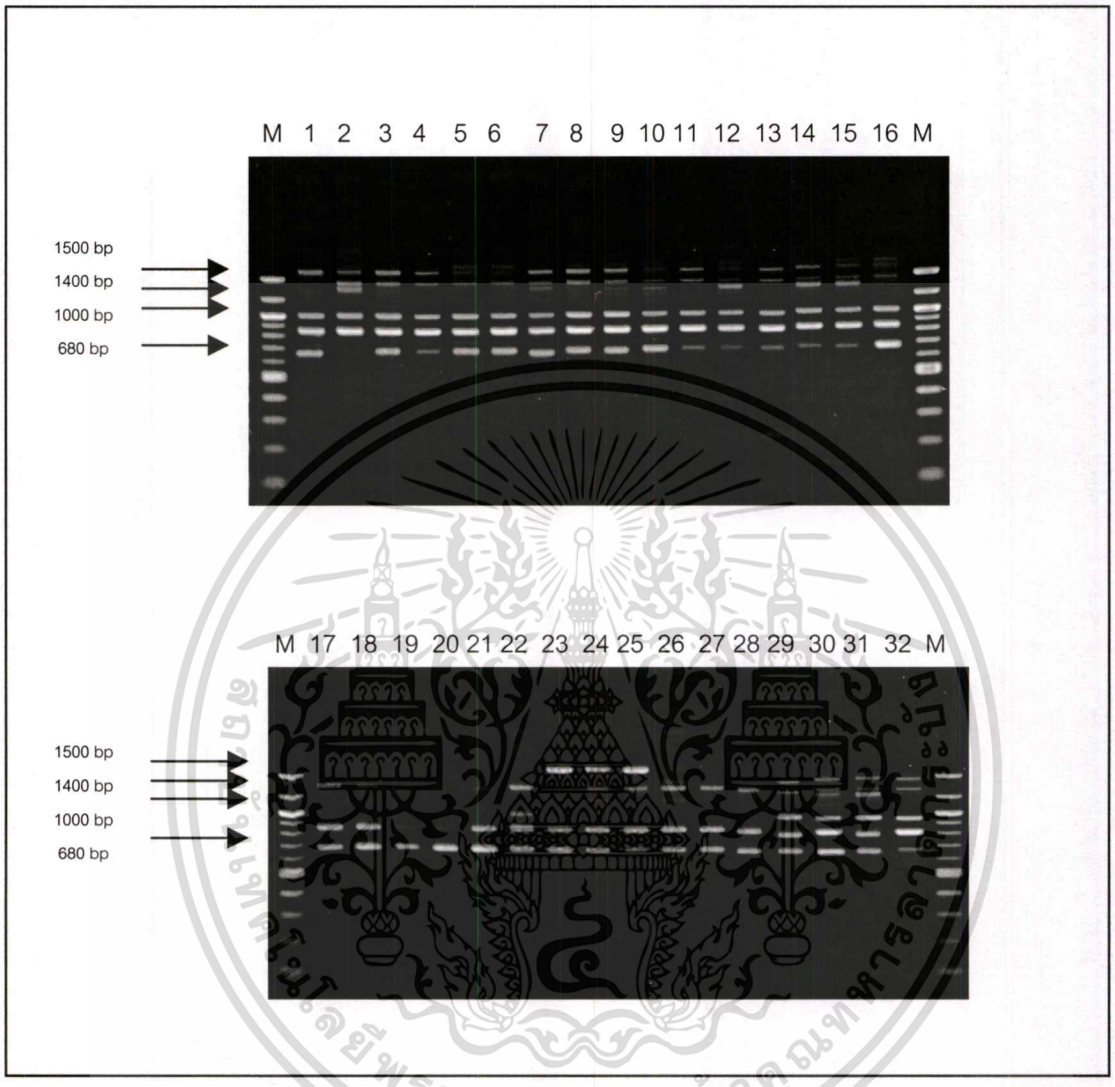


รูปที่ 4.12 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA11 ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

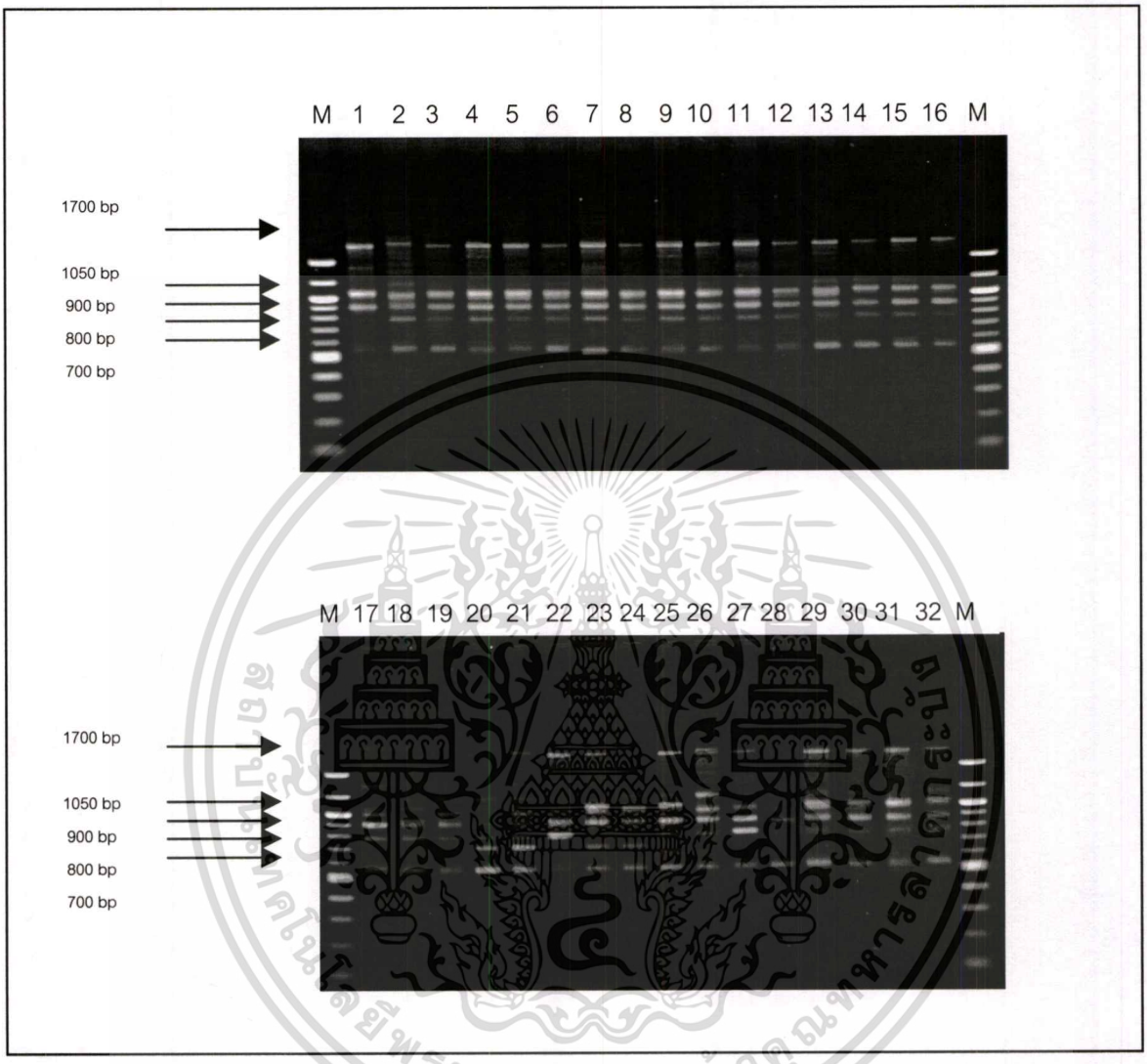


รูปที่ 4.13 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPA17 ในปาล์มน้ำมัน32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

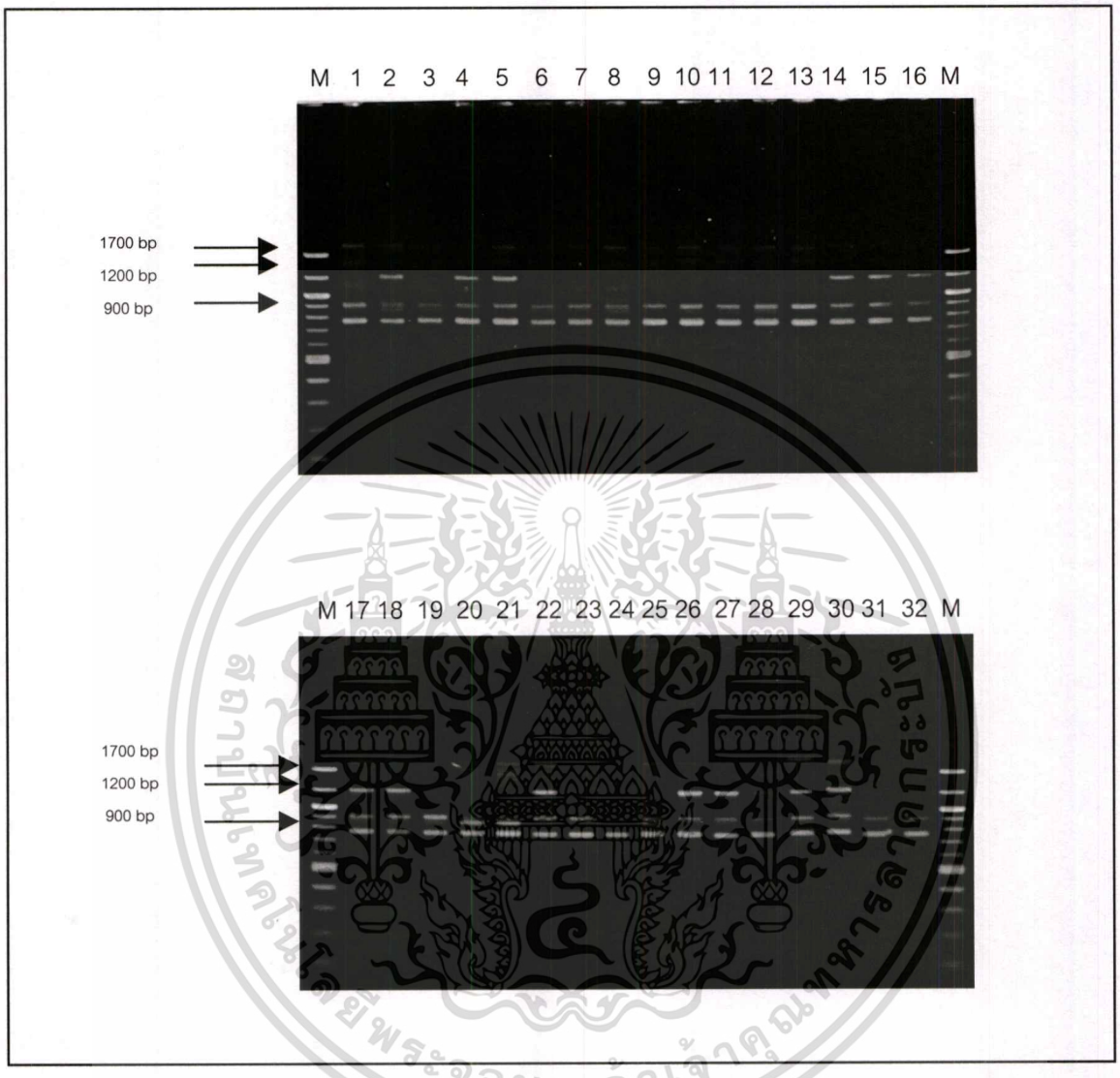


รูปที่ 4.14 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC07 ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

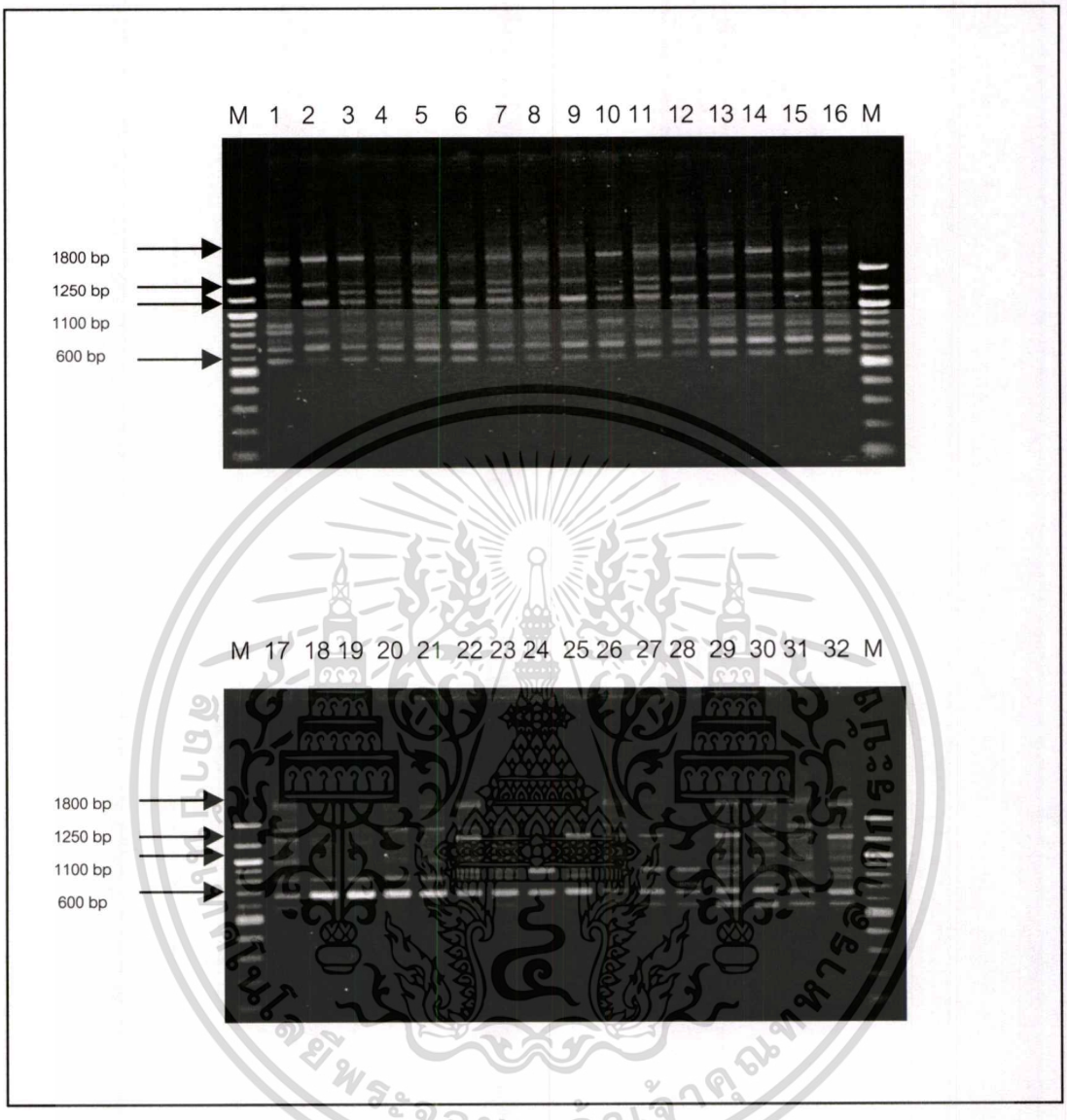


รูปที่ 4.15 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC08 ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

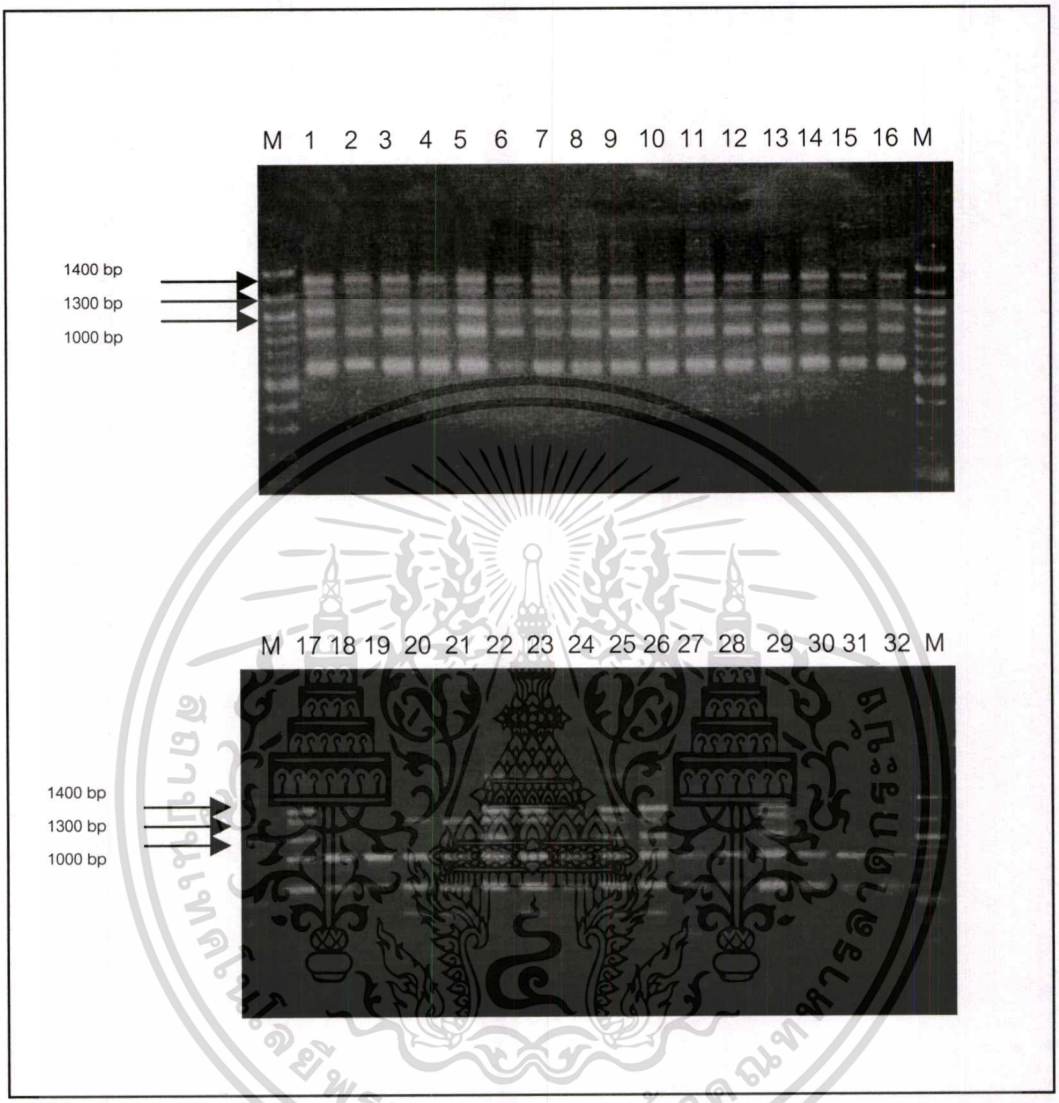


รูปที่ 4.16 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC15 ในปาล์มน้ำมัน32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

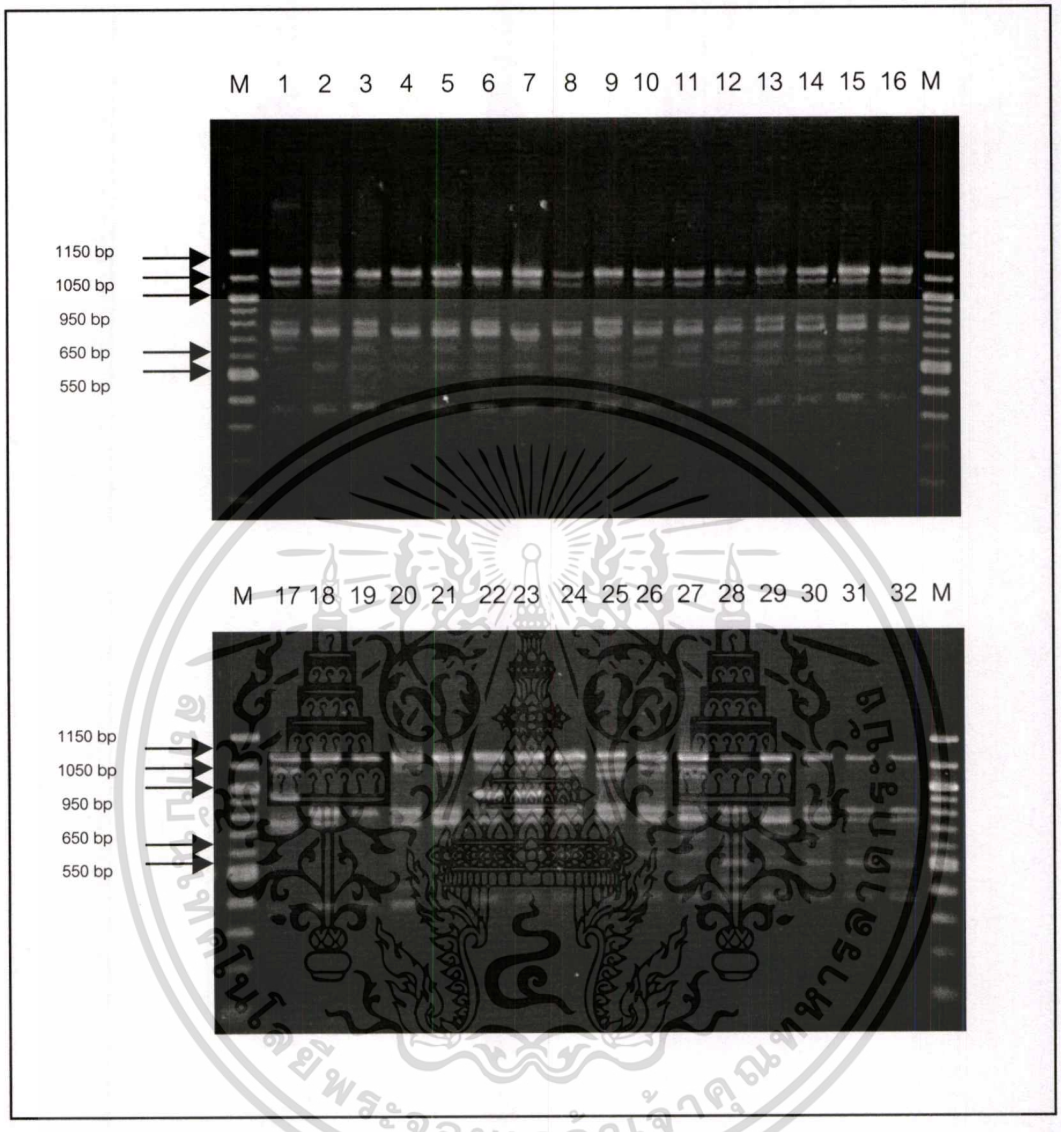


รูปที่ 4.17 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD01 ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

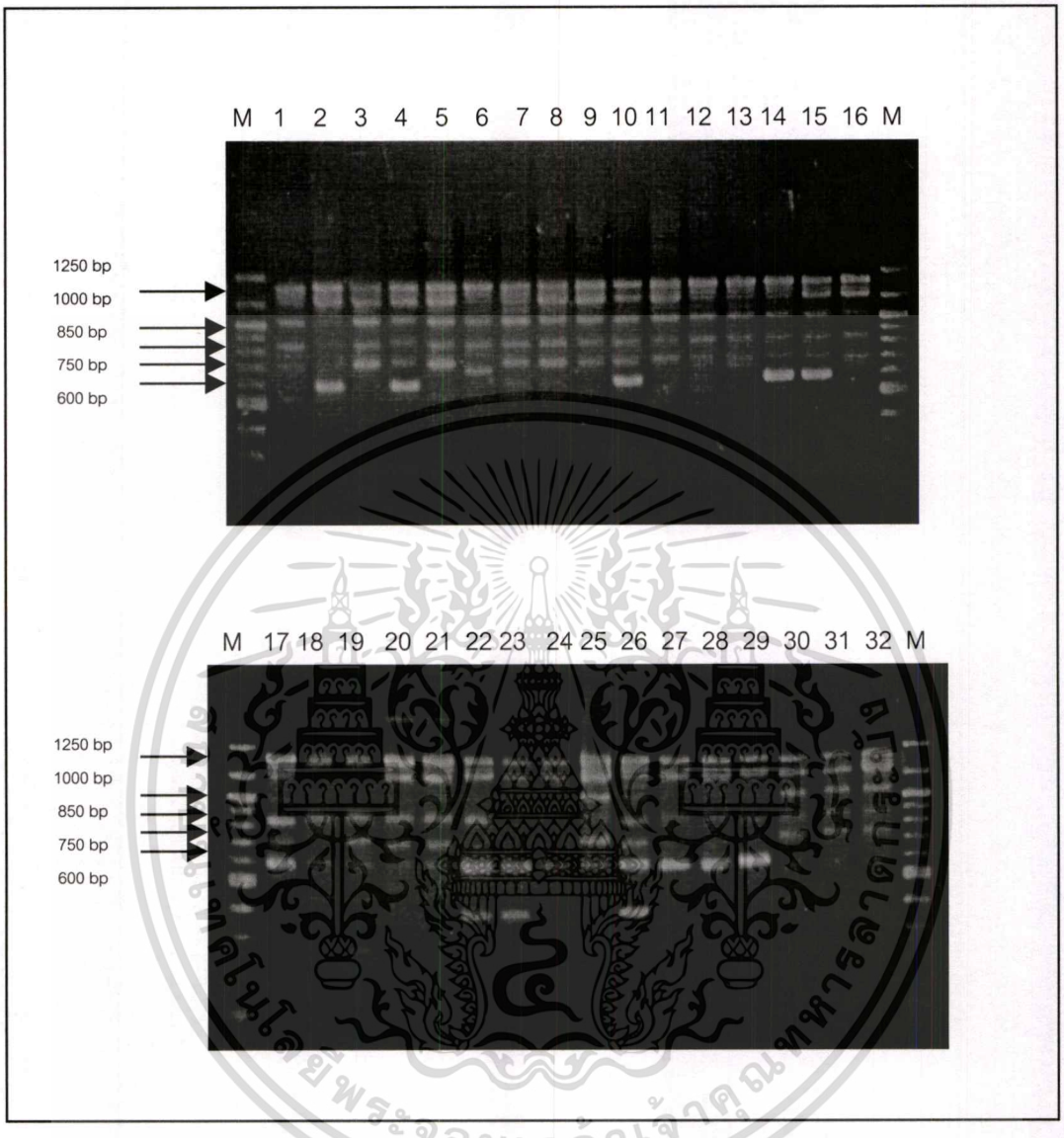


รูปที่ 4.18 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD03 ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

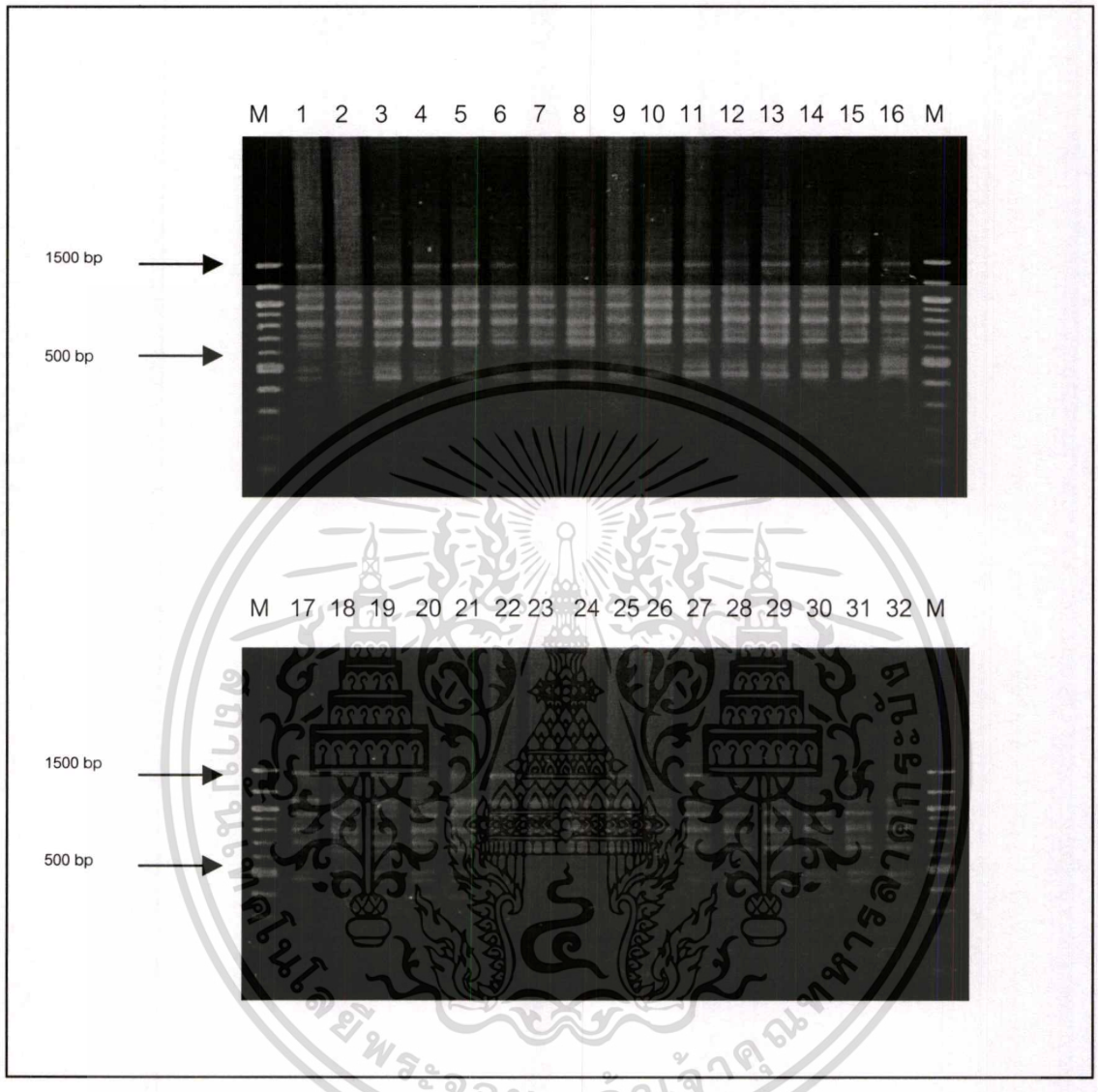


รูปที่ 4.19 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPD12 ในปาล์มน้ำมัน32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

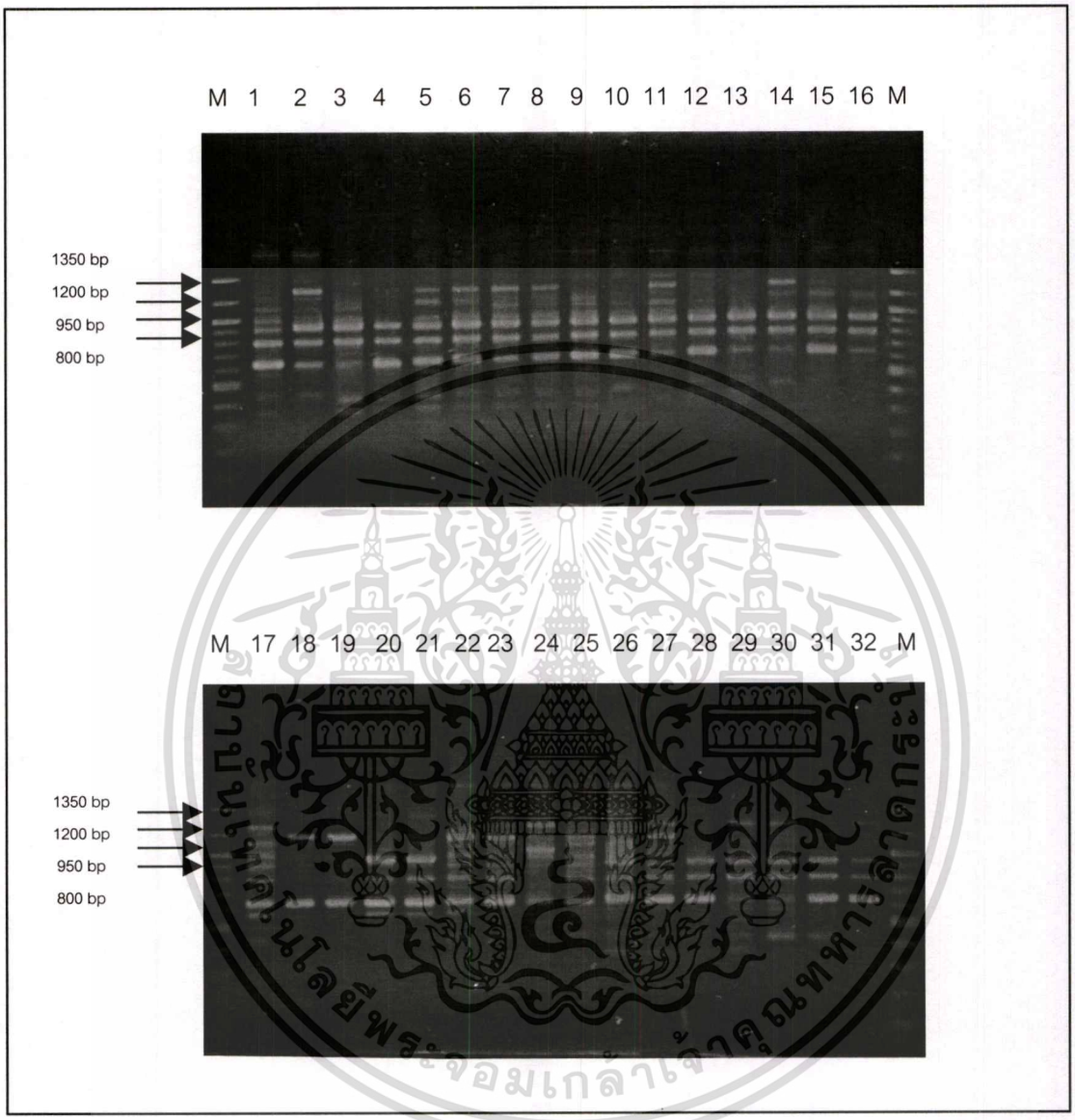


รูปที่ 4.20 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE01 ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

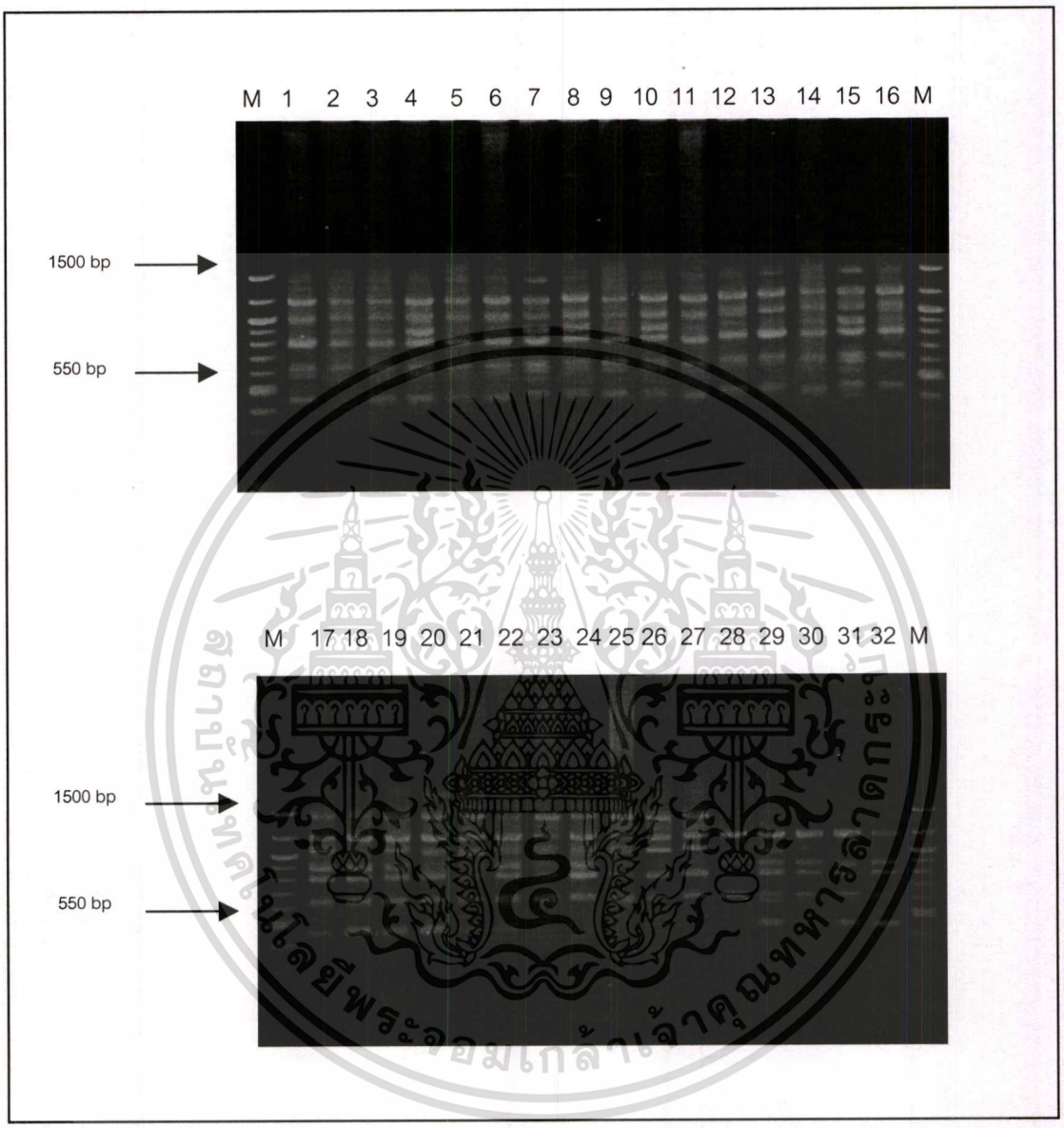


รูปที่ 4.21 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE16 ในปาล์มน้ำมัน32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

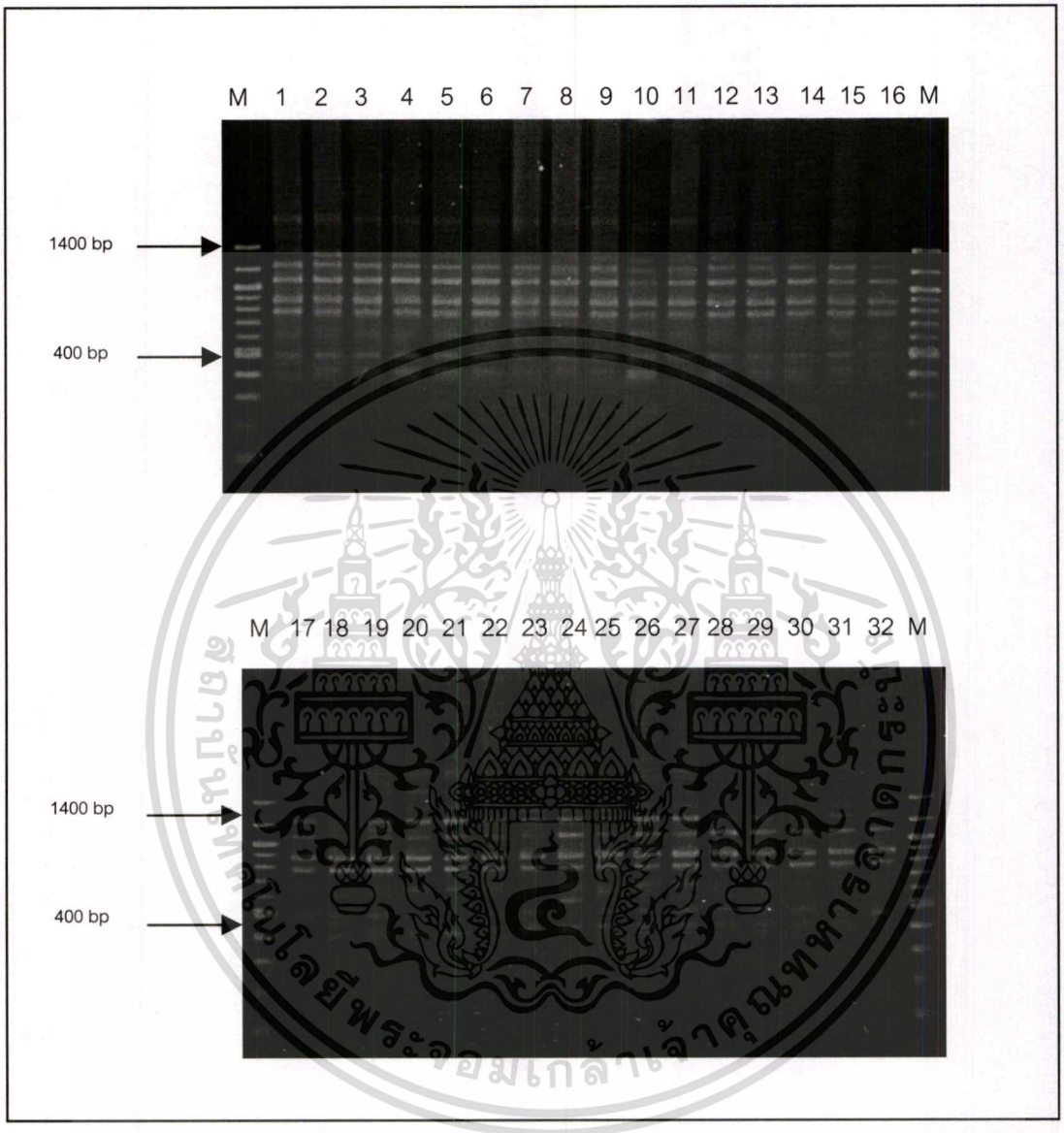


รูปที่ 4.22 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE17 ในปาล์มน้ำมัน32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

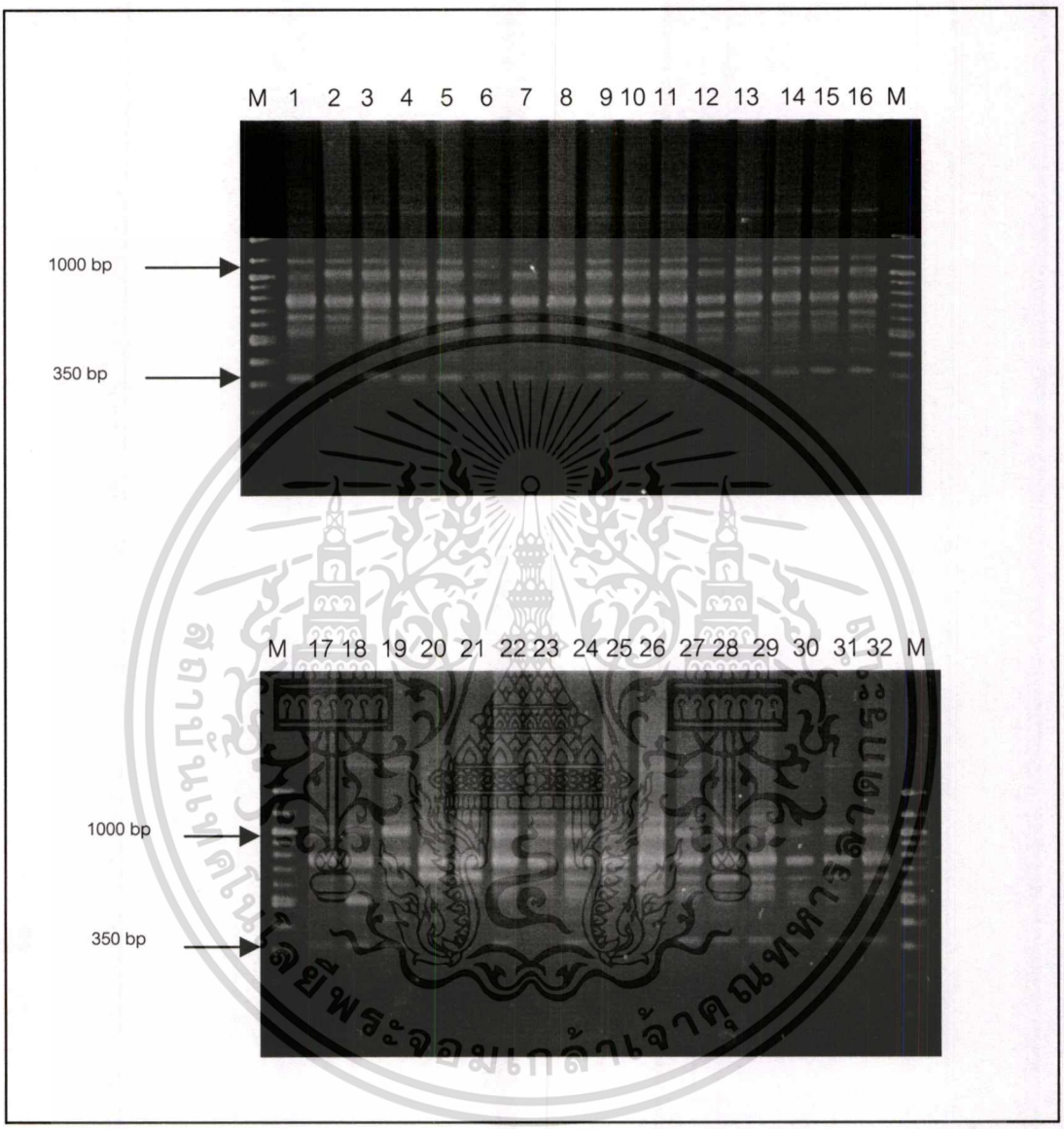


รูปที่ 4.23 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPE19 ในปาล์มน้ำมัน32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

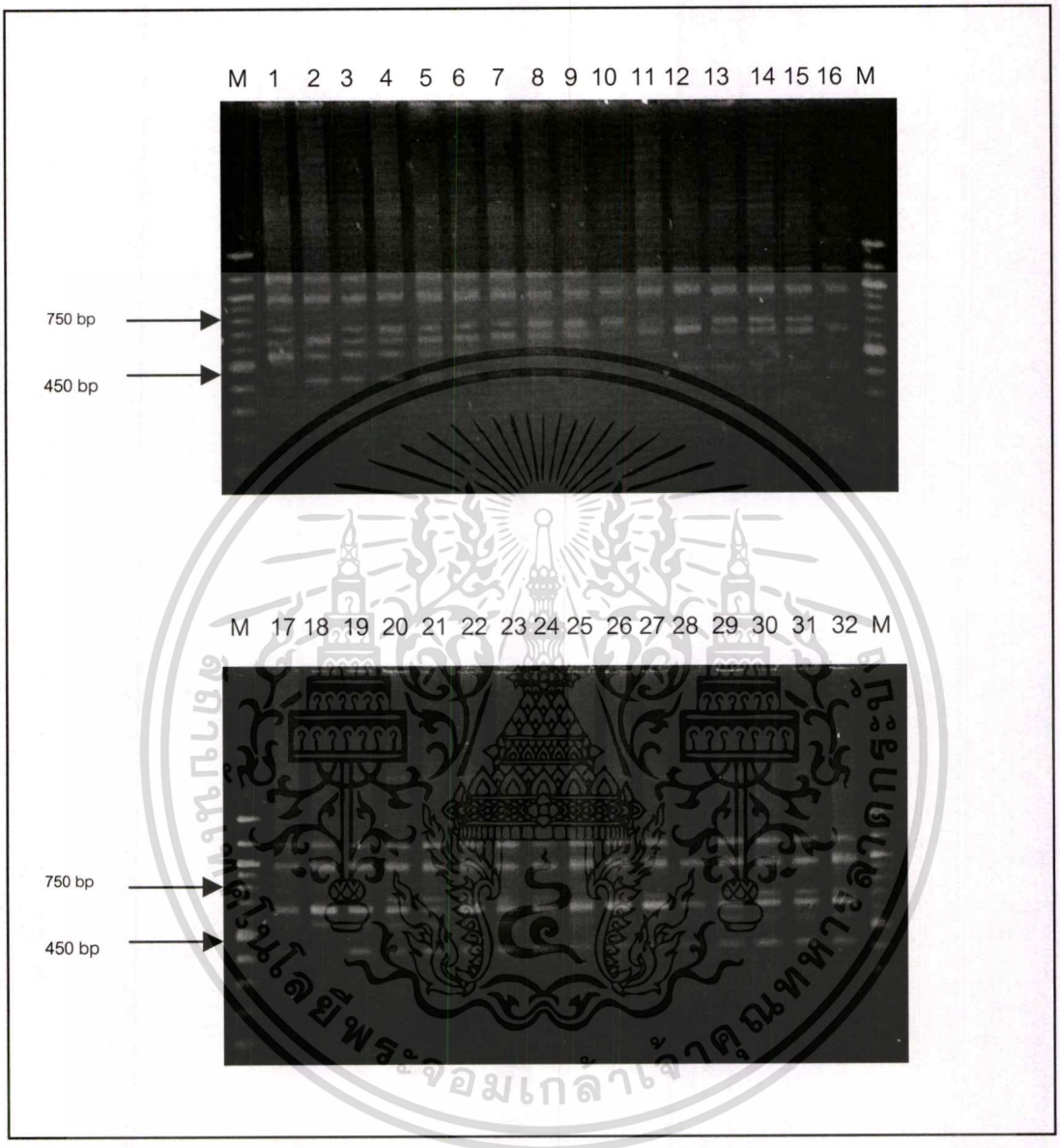


รูปที่ 4.24 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF07 ในปาล์มน้ำมัน32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

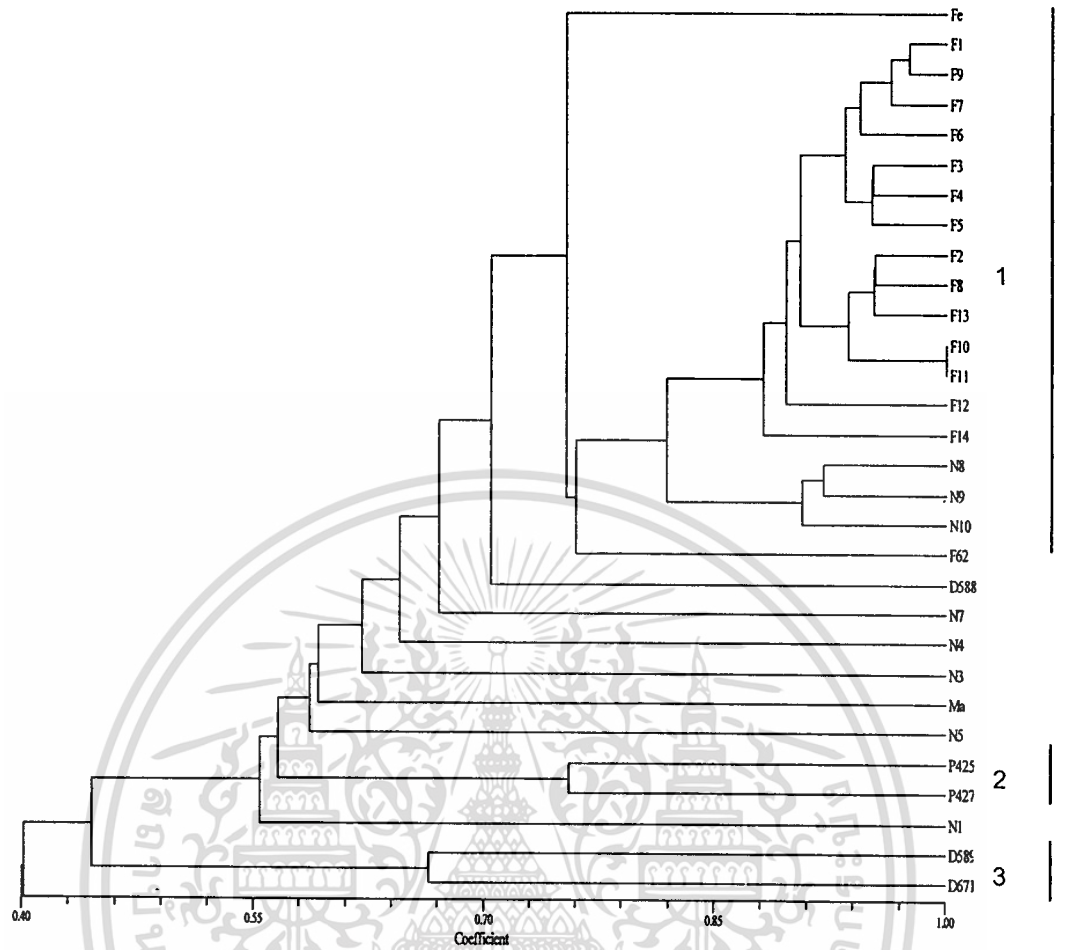


รูปที่ 4.25 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPF 08 ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง (1) พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, (2) พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, (3–16) ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, (17) ดูร่า 588, (18) ดูร่า 589, (19) ดูร่า 671, (20) พิซิเฟร่า 425, (21) พิซิเฟร่า 427, (22) ลูกผสม F62, (23 - 32) ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair DNA ladder marker

ลูกศรชี้แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.26 แสดง phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.02 j ของ ของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง ที่เกิดจากแถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism กัน

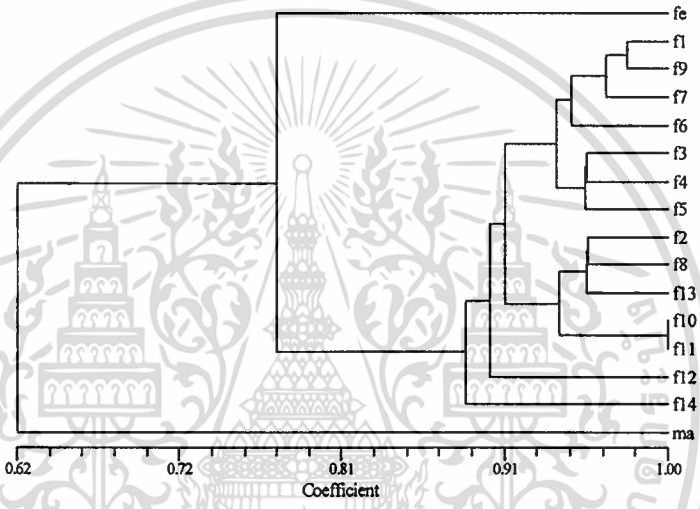
Fe (พันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33) Ma (พันธุ์พ่อพิซิเฟอร่า 116 เบอร์ 339) F1 – F14 (ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 14 ตัวอย่าง) D588 (พันธุ์ดูร่า 588) D589 (พันธุ์ดูร่า 589) D671 (พันธุ์ดูร่า 671) P425 (พันธุ์พิซิเฟร่า 425) P427 (พันธุ์พิซิเฟร่า 427) F62 (พันธุ์ลูกผสม F62) และ N1 – N10 (พันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง)

4.5 ผลจากการวิเคราะห์ผลเทคนนิคอาร์เอพีดี

จากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.02 j โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนด้วยวิธีการของ Jaccard (1908) แล้วใช้โปรแกรม UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) จัดกลุ่มตัวอย่างและแสดงผลในรูปของ phylogenetic tree จากแถบดีเอ็นเอทั้ง 81 แถบ มีค่าดัชนีความเหมือน ดังตารางที่ 4.2 และ phylogenetic tree (รูปที่ 4.26) จากผลดังกล่าวสามารถแบ่ง

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ที่ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มปาล์มน้ำมันได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33, ลูกผสม F1 ระหว่าง ดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339จำนวน 14 ตัวอย่าง, ลูกผสม F62, และ ลูกผสมไม่ทราบพ่อแม่ อีก 3 ตัวอย่าง ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.76 – 0.97; กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ พันธุ์ พิซิเฟร่า 425, และพันธุ์ พิซิเฟร่า 427 ซึ่งมีดัชนีความเหมือนในกลุ่ม 0.76; กลุ่มที่ 3 คือ พันธุ์ดูร่า 589, และ ดูร่า 671 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่มเป็น 0.67, และในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, พันธ์แม่ดูร่า 588, และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 7 ตัวอย่าง ซึ่งมีดัชนีความเหมือนแตกต่างกันจึงไม่สามารถจัดเข้ากลับกลุ่มใด ๆได้



รูปที่ 4.27 แสดง phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.02 j ของ ของปาล์มน้ำมัน 16 ตัวอย่าง ที่เกิดจากแถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism กัน fe (พันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33), Ma (พันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339), f1 – f14 (ลูกผสม F_1 ระหว่าง พันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 14 ตัวอย่าง)

ในการนำพันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33, พันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, และลูกผสม F1 เทเนร่าระหว่าง พันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33 กับพันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 ทั้ง 14 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์เปรียบเทียบภายในกลุ่ม พบว่า phylogenetic tree ลูกผสม F_1 เทเนร่า มีดัชนีความเหมือนใกล้เคียงกับพันธุ์แม่ดูร่า คือ อยู่ในช่วง 0.78 – 0.98 แต่มีความแตกต่างกับพันธุ์พ่อพิซิเฟร่า ภายในกลุ่มลูกผสม F_1 เทเนร่า มีดัชนีความเหมือนใกล้เคียงกันมาก คืออยู่ในช่วง 0.89 – 0.98 (รูปที่ 4.27)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

5.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน

เทคนิคทางชีวโมเลกุลจะเป็นต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ และบริสุทธิ์ การใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมีผลทำให้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันได้ (Aichitte *et al.* 1993) เนื่องจากความสามารถในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์จะแปรเปลี่ยนไปถ้ามีองค์ประกอบอื่นปนเปื้อนมากับดีเอ็นเอ ทำให้การแปรผลในเทคนิคอาร์เอพีดีผิดพลาดได้ (Weeden *et al.* 1992) จากผลการทดลองพบว่า บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS ตามวิธีการดัดแปลงของ Dellaporta *et al.*(1983) ให้ผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นวุ้นใส มีความเข้มข้นประมาณ 300 - 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งสามารถเก็บเป็น stock สำหรับใช้ในขั้นตอนการทำเทคนิคอาร์เอพีดีต่อไป บัฟเฟอร์ชนิดดังกล่าวจึงเหมาะที่จะใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนปาล์มน้ำมัน โดยดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้น สอดคล้องกับผลการทดลองสกัดดีเอ็นเอในใบของ โกโก้ (Wilde *et al.* 1992) หญ้าสไตโล (Kazan *et al.* 1992) แอปเปิล (Koller *et al.* 1993) หอมกระเทียม (Susan *et al.* 1993) มะละกอ (Stiles *et al.* 1993) อ้อย (Freqene *et al.* 1994) ปาล์มน้ำมัน (Shah *et al.* 1994) พิทูเนีย (Petunia) (Cerny *et al.* 1996) มะเขือเทศ (Chague *et al.* 1996) ข้าวสาลี (Talbert *et al.* 1996) ถั่วเหลือง (Lange *et al.* 1998) พืชในตระกูล *Brassica olearacea* L.(Divaret *et al.* 1999) และ กะหล่ำ (Nozaki *et al.* 2000)

5.1.2 ผลการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่างกัน

ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยงมีผลต่อความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีผลต่อความสำเร็จของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยในการสกัดดีเอ็นเอมักจะมีการปนเปื้อนของ polyphenolic compound โพลีแซคคาไรด์ และ/หรือ โปรตีนซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญที่ทำให้ประสิทธิภาพของงาน molecular analysis ลดลง (Murray and Thompson. 1980) ฉะนั้นการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเหมาะสมย่อมเป็นสิ่งจำเป็น จากผลการทดลองพบว่าการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที สามารถแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากสารละลายบัฟเฟอร์ ได้ปริมาณของดีเอ็นเอมากที่สุดและดีเอ็นที่ได้มีคุณภาพดีไม่ขาดเสียหายสอดคล้องกับการศึกษาในใบของ มะเขือเทศ (Chague *et al.* 1996) หญ้าสไตโล (Kazan *et al.* 1992) มะละกอ (Stiles *et al.* 1993) ข้าวบาร์เล่ย์ Tinker *et al.*1993) ยูคาลิปตัส (Keil and Griffin. 1994) และพืชในตระกูล malus (Ur- Rahman *et al.* 1997) จากการตรวจสอบผลโดยนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้น 300 – 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีคุณภาพดีไม่ขาดเสียหาย

เอกสารนี้ ... ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษา ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 สภาวะที่เหมาะสมของการใช้เทคนิค

5.2.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาพีซีอาร์

5.2.1.1 ผลการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$

ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ถ้ามีความเข้มข้นในปฏิกิริยามากเกินไป จะทำให้มีการเพิ่มขยายผลิตผลที่ไม่จำเพาะ (nonspecific product) เกิดการสะสมมาก แต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไป จะลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อการเกิด primer annealing อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์และผลผลิตจากพีซีอาร์แยกออกจากกัน ความจำเพาะของผลผลิตจากดีเอ็นเอแม่แบบ การเกิด primer – dimer artifact และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ (Saiki. 1989) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 2.5 มิลลิโมลาร์ สอดคล้องกับการจำแนกพันธุ์ของ แอปเปิล (Koller *et al.* 1993) ยาสูบ (Bai *et al.* 1995) Chinese elm (Benet *et al.* 1995) ถั่วลันเตา (Hoey *et al.* 1996) blueberry (Levi and Rowland. 1997) และ ข้าวโพด (Lanza *et al.* 1997)

5.2.1.2 ผลการปรับความเข้มข้นของ dNTPs

deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ปกติมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 50 – 200 ไมโครโมลาร์ โดยต้องปรับให้เป็นกลาง (neutralized) ที่ pH 7.0 และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ควรจะเตรียมเป็น primary stock solution มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แล้วเจือจาง เป็น working stock เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับ แมกนีเซียมอิออน ดังนั้นปริมาณ dNTPs ในปฏิกิริยาจึงเป็นตัวกำหนดปริมาณ free Mg^{2+} ในปฏิกิริยามาตรฐานควรมีความเข้มข้นสุดท้ายของ dNTPs ทั้ง 4 ชนิดรวม 0.8 มิลลิโมลาร์ ทำให้มีความเข้มข้นของ free Mg^{2+} เหลืออยู่ 0.7 มิลลิโมลาร์ จาก 1.5 มิลลิโมลาร์ ที่ไม่ได้จับกับ dNTPs ฉะนั้น ถ้าเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น dNTPs มากๆ ควรจะต้องปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ แมกนีเซี่ยมอิออน ให้พอเหมาะด้วย dNTPs ทั้ง 4 ชนิด ที่มีอยู่ในปฏิกิริยา ควรมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดได้สัดส่วนกันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เกิดขึ้นอย่างจำเพาะถูกต้องได้ปริมาณผลผลิตสูงและลดความผิดพลาดในการเรียงลำดับของเบสคู่สม (minicorporation errors) (Saiki. 1989) ผลการทดลองพบว่า พบว่า ความเข้มข้นของ dNTPs ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 200 ไมโครโมลาร์ สอดคล้องกับการศึกษาใน หญ้าสไตโล (Kazan *et al.* 1992) หอมกระเทียม (Susan *et al.* 1993) ผักกาด (Mailer *et al.* 1994) ข้าว (Makill. 1995) ยาสูบ (Bai *et al.* 1995) มันฝรั่ง (Karihaloo *et al.* 1995) Chinese elm (Benet *et al.* 1995) ท้อ (Lu *et al.* 1996) blueberry (Levi and Rowland.1997) พืชตระกูล *Brassica napus* Hansen *et al.* (1997) ข้าวสาลี (Castagna *et al.* 1997) และ กะหล่ำ (Nozaki *et al.* 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.1.3 ผลการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์

ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่พอเหมาะอยู่ระหว่าง 0.1 – 0.5 ไมโครโมลาร์ ถ้าให้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งผลให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) และมีการสะสมของผลผลิตที่ไม่จำเพาะมากขึ้น (วัชรี อัตตทิพยหลคุณ. 2536) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 0.2 ไมโครโมลาร์ สอดคล้องกับการศึกษาใน หญ้าสไตโล (Kazan *et al.* 1992) กะหล่ำ (Kresavich *et al.* 1992) มะละกอ (Stiles *et al.* 1993) หอมกระเทียม (Susan *et al.* 1993) ท้อ (Lu *et al.* 1996) องุ่น (Xu and Bakalinsky. 1996) มันฝรั่ง (Demeke *et al.* 1996) ถั่วลันเตา (Hoey *et al.* 1996) ข้าวสาลี (Castagna *et al.* 1997) ข้าวโพด (Lanza *et al.* 1997) และข้าวสาลี (Hernandez. 1999)

5.2.1.4 ผลการปรับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ผลิตโดยบริษัทแต่ละบริษัทอาจมีความแตกต่างกันในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสม (assay condition) และคำนิยามกำหนดหน่วยวัดปฏิกิริยา (unit difiniton) ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบความเข้มข้นที่พอเหมาะในการใช้เอ็นไซม์ และตรวจสอบผลโดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเกินไปจะเป็นผลให้เกิดการสะสมของผลิตผลที่เป็น nonspecific back ground เกิดขึ้นมาก แต่หากใช้ในปริมาณที่ต่ำเกินไปจะทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่ำเกินไป ทำให้แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไม่ชัดเจน (Saiki and Gelfand. 1989) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 0.4 ยูนิต สอดคล้องกับการศึกษาใน มะม่วง (Schnell *et. al.* 1995) blueberry (Levi and Rowland. 1997) และ กะหล่ำ (Kresavich *et. al.* 1992; Nozaki *et. al.* 2000)

5.1.1.5 ผลการปรับความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอแม่แบบ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบมีความจำเป็นต่อผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาโดยทั่วไป ดีเอ็นเอที่ใช้จะมีความเข้มข้นระหว่าง 5 – 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในกรณีที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอสูงมากเกินไปจะทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาด ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาไม่ชัดเจนพอ เนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่สามารถเกิดได้ในสภาพดีเอ็นเอมีความเข้มข้นสูงเกินไป (Saiki.1989) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของใบปาล์มน้ำมันคือ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สอดคล้องกับการศึกษาใน ข้าวสาลี (Devos and Gale. 1992) popla (Castiglione *et al.* 1993) ข้าวบาร์เล่ย์ (Tinker *et al.*1993) ดอกบัว (Campos *et al.* 1994) กุหลาบ (Debener *et al.* 1996) และ ข้าว (Huang *et al.*1997)

5.2.2 ผลจากการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต้องการสำหรับ primer annealing ขึ้นกับลำดับเบส เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 20 – 85 องศาเซลเซียส ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ให้ผลดีที่สุด อยู่ในช่วง 55 – 72 องศาเซลเซียส การเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนดังกล่าวช่วยลดการจับคู่ผิดพลาด และลดการเกิด misextension ของนิวคลีโอไทด์ ที่ไม่ถูกต้องที่ 3' – end ของไพรเมอร์ ฉะนั้นอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ค่อนข้างสูงจะช่วยเพิ่มความจะเพาะ (Saiki. 1989) ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมัน ควรใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากการตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสพบว่าอุณหภูมิดังกล่าวให้แถบของดีเอ็นเอชัดเจนและเห็นความแตกต่างของ polymorphism สอดคล้องกับการทดลองในข้าวสาลี (Devos and Gale. 1992; Castagna *et al.* 1997) pigeon pea (Ratnaparkhe *et al.* 1995) ท้อ (peach) (Lu *et al.* 1996) มันฝรั่ง (Demeke *et al.* 1996) ryegrass (Huff. 1997) ฝ้าย (Igbal. 1997) ข้าว (Huang *et al.* 1997) และ มะม่วง (Valenzuela *et al.* 1997)

5.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลปฏิกิริยาพีซีอาร์

5.3.1 ผลจากการปรับความเข้มข้นของเจลในขั้นตอนการตรวจสอบผล

ความเข้มข้นของเจลมีผลต่อความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เนื่องจากความสัมพันธ์ของขนาดดีเอ็นเอ และความเข้มข้นเจลจะเป็นไปตามสมการ $\log\mu = \log\mu_0 - K_r\tau$ โดย μ คือ ระยะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ τ คือ ความเข้มข้นของเจล โดยทั่วไป ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะเหมาะกับขนาดดีเอ็นเอ 1 – 20 กิโลเบส 1.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะกับ 0.5 – 7 กิโลเบส 1.5 เปอร์เซ็นต์ เหมาะกับ 0.2 – 3 กิโลเบส และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะกับ 0.1 – 2 กิโลเบส (Sambrook *et al.* 1989) จากผลการทดลองพบว่าการใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นความข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นชัดเจนสามารถตรวจสอบผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ง่ายที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาในข้าวสาลี (Devos and Gale. 1992) มะละกอ (Stiles *et al.* 1993) ข้าวโอ๊ต (Heun *et al.* 1994) มันฝรั่ง (Karihaloo *et al.* 1995) หอมกระเทียม (Maab and Klaas. 1995) ข้าวบาร์เล่ย์ (Poulsen *et al.* 1995) ไม้เลื้อย (Pillay and Kenny. 1996) องุ่น (Debener *et al.* 1996) ท้อ (Lu *et al.* 1996) หัวผักกาดแดง (Scholten *et al.* 1997) ข้าวโพด (Lanza *et al.* 1997) พืชในตะกูล malus (Ur-Rahman *et al.* 1997) ข้าวโพด (Lanza *et al.* 1997) ข้าว (Huang *et al.* 1997) และ larch (Arcade *et al.* 2000)

5.3.2 ผลจากการปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสด้วยระดับความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ จะช่วยลดความเสียหายของแถบดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามในการใช้กระแสไฟฟ้าต้องคำนึงถึงขนาดและน้ำหนักของแถบดีเอ็นเอด้วย โดยประสิทธิภาพของการแยกแถบดีเอ็นเอของอะกาโรสเจลจะลดลงในขณะที่กระแสไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มสูงขึ้น (Sambrook *et al.* 1989) จากการทดลองใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่ระดับต่าง ๆ พบว่าความต่างศักย์ที่เหมาะสม คือ 80 โวลต์ เนื่องจากให้ความชัดเจนและระยะห่างระหว่างแถบของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่าง สอดคล้องกับการศึกษาใน ข้าว Japonica (Mackill. 1995)

5.3.3 ผลการปรับความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ในการย้อมตรวจสอบผล

วิธีการใช้เอธิเดียมโบรไมด์ในการย้อมดีเอ็นเอตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจลอธิบายโดย Sharp *et al.* (1973) โดยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ใช้ฉายลงบนเจล ขนาดความยาวคลื่น 204 นาโนเมตร จะถูกดูดซับได้โดยดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเรืองแสงมองเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอได้ โดยความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ที่ใช้ คือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sambrook *et al.* 1989) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเอธิเดียมโบรไมด์ ดังกล่าวใช้ย้อมอะกาโรสเจล เป็นเวลา 30 นาที ทำให้มองเห็นแถบสว่างของดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาใน แตงกวา (Kennard *et al.* 1994) องุ่น (Debener *et al.* 1996) ถั่ว (Schneider *et al.* 1997) และ ข้าวสาลี (Dweikat *et al.* 1997)

5.4 ผลการคัดเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส จากการพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากไพรเมอร์แต่ละชนิดให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันในปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ นำมาเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างจนเกิดรูปแบบเฉพาะในแต่ละพันธุ์ และระหว่างพันธุ์ซึ่งเรียกว่าเกิด polymophism โดยที่แถบดีเอ็นเอจะมีจำนวนระหว่าง 3 - 9 แถบ เฉลี่ย 6 แถบต่อ 1 ไพรเมอร์ ขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35 – 1.7 กิโลเบส จำนวนทั้งหมด 81 แถบ จำนวนแถบและขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอแม่แบบของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในบางแถบเมื่อเปรียบเทียบกันภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่ม จะสามารถใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงต่อการจัดกลุ่มของปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลองนี้ และใช้ระบุพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้

จากการทดลองพบว่าเทคนิคอาร์เอพีดีทำให้เกิดความหลากหลายของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างกันอาจเกิดจากสาเหตุดังนี้คือ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบสใดเบสหนึ่งซึ่งไพรเมอร์จะเข้าไปจับ หรือเกิดจากมีการเพิ่มหรือขาดหายไปของลำดับชิ้นดีเอ็นเอตรงบริเวณระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะ (Caetano-Anolles *et al.* 1991; Gellet. 1991; William *et al.* 1990) รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ arbitary primer ในการทำ อาร์เอพีดี สามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ (William *et al.* 1990) ตัวอย่างเช่น Valenzuela *et al.* 1997 ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อดูความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในมะม่วงจำนวน 15

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ เพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการระบุพันธุ์มะม่วงเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและทำได้รวดเร็ว Thompson *et al.* 1998 ได้รายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้ arbitary pirimer พบว่าแถบดีเอ็นเอบางแถบจะจำเพาะต่อพืชในแต่ละพันธุ์ และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการจำแนกพันธุ์ได้ซึ่งสอดคล้องกับการใช้เทคนิคนี้ในปาล์มน้ำมัน

5.5 ผลจากการวิเคราะห์ผลเทคนิคอาร์เอพีดี

จากผลการทดลองสามารถจัดกลุ่มปาล์มน้ำมันได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33, ลูกผสม F_1 เทเนร่าระหว่าง ดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ลูกผสม F62, และ ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ อีก 3 ตัวอย่าง ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.76 – 0.97; กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ พันธุ์พิซิเฟร่า 425, และพันธุ์ พิซิเฟร่า 427 ซึ่งมีดัชนีความเหมือนในกลุ่ม 0.76; กลุ่มที่ 3 คือ พันธุ์ดูร่า 589, และ ดูร่า 671 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่มเป็น 0.67; และในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 พันธ์ดูร่า 588 และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 7 ตัวอย่าง ซึ่งมีดัชนีความเหมือนแตกต่างกันจึงไม่สามารถจัดเข้ากลับกลุ่มใด ๆ ได้ ภายในกลุ่มที่ 1 นอกจากจะประกอบด้วย ลูกผสม F_1 เทเนร่า ทั้ง 14 ตัวอย่าง รวมทั้งพันธุ์แม่ดูร่าแล้ว ยังประกอบด้วย ลูกผสม F62 และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 3 ตัวอย่าง (N8, N9, และ N10) ซึ่งการจัดกลุ่มดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ทั้ง 3 มีลักษณะพันธุกรรมใกล้เคียงกับลูกผสม F1 เทเนร่า โดยมีดัชนีความเหมือนในช่วง 0.82 – 0.97 จึงมีแนวโน้มว่า การนำลูกผสมทั้ง 3 ตัวอย่างไปใช้ในการเพาะปลูก ก็น่าจะได้ผลผลิตที่มีความใกล้เคียงกับลูกผสม F_1 เทเนร่า ซึ่งจากผลการทเดลองดังกล่าวจำเป็นจะต้องมีการศึกต่อไป เพื่อดูความใกล้เคียงของลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งผลผลิตโดยการนำลูกผสมทั้ง 3 ตัวอย่างไปเพาะปลูกเปรียบเทียบกับลูกผสม F_1 เทเนร่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

6.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อนปาล์มน้ำมันใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการดัดแปลงของ Dellaporta *et al.* (1983) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS สกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมัน และใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ในการหมุนเหวี่ยงแยกสกัด ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นประมาณ 300 – 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

6.2 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นได้สมบูรณ์ ใช้องค์ประกอบของสารในแต่ละปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร โดยประกอบด้วย น้ำกลั่น 3.8 ไมโครลิตร 10 × บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร (1X) $MgCl_2$ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร (2.5 มิลลิโมลาร์) dNTPs เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์จำนวน 1 ไมโครลิตร (200 ไมโครโมลาร์) primer เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร (0.2 ไมโครโมลาร์) *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 2 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 0.2 ไมโครลิตร (0.4 ยูนิต) และ ดีเอ็นเอแม่แบบ เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร (20 นาโนกรัม) ส่วนขั้นตอนการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 45 cycles และการอุณหภูมิ terminate ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.3 ขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเพื่อตรวจสอบผลใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ และการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ เวลา 30 นาที จะให้ดีเอ็นเอที่ชัดเจนสมบูรณ์ที่สุด

6.4 จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10-mer oligonucleotide ที่มีลำดับเบสแบบสุ่มจำนวน 100 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 14 ชนิดจาก 5 ชุด (OPA OPC OPD OPE และ OPF ของบริษัท Operon Technologies สหรัฐอเมริกา) ได้แก่ OPA11 OPA17 OPC07 OPC08 OPC15 OPD01 OPD03 OPD12 OPE01 OPE16 OPE17 OPE19 OPF07 และ OPF08 ทำให้เกิดการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism กันจำนวนทั้งหมด 81 แถบ โดยขนาดของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.35 – 1.7 กิโลเบส

6.5 เทคนิคอาร์เอพีดีใช้ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มได้เป็นอย่างดี โดยจากการนำแถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism ของปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ดูร่า 064 เบอร์ 33, พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ดูร่า 588 , ดูร่า589 , ดูร่า 671 พิซิเฟร่า 425 , พิซิเฟร่า 427 , ลูกผสม F 62 และพันธุ์ลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่ 10 ตัวอย่าง สามารถสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม และลำดับความสัมพันธ์ได้ในรูปของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

phylogenetic tree โดยสามารถจัดแบ่งปาล์มน้ำมันได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์แม่ดูร่า 064 เบอร์ 33, ลูกผสม F_1 ระหว่างดูร่า 064 เบอร์ 33 กับ พันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339 จำนวน 14 ตัวอย่าง, ลูกผสม F62, และ ลูกผสมไม่ทราบพ่อแม่ อีก 3 ตัวอย่าง ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.76 – 0.97; กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ พันธุ์ พิซิเฟร่า 425, และพันธุ์ พิซิเฟร่า 427 ซึ่งมีดัชนีความเหมือนในกลุ่ม 0.76; กลุ่มที่ 3 คือ พันธุ์ดูร่า 589, และ ดูร่า 671 มีดัชนีความเหมือนในกลุ่มเป็น 0.67; และในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์พ่อพิซิเฟร่า 116 เบอร์ 339, พันธุ์แม่ดูร่า 588, และลูกผสมที่ไม่ทราบพ่อแม่อีก 7 ตัวอย่าง ซึ่งมีดัชนีความเหมือนแตกต่างกันจึงไม่สามารถจัดเข้ากลับกลุ่มใด ๆ ได้ เทคนิคอาร์เอพีดีจึงจัดเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถจะนำมาใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่สะดวก ให้ผลรวดเร็ว เพื่อให้เกษตรกรสามารถเลือกใช้ปาล์มน้ำมันในการเพาะปลูกได้ถูกต้องตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2523. **ปาล์มน้ำมัน.** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. **ปาล์มน้ำมัน.** กรุงเทพฯ : กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529. "ปาล์มน้ำมัน." หน้า 436-513. ใน **พืชน้ำมัน.** กรุงเทพฯ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุรชัย สนธยานนท์. 2536. "การวิเคราะห์ DNA โดยดูจาก RFLP และ RAPD." หน้า. 18.28-18.42. ในคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ ; เทคนนิคทางอณูพันธุศาสตร์และวิศวกรรม, **เล่มที่ 2.** นครปฐม : สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยมหิดลศาลายา.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523. **ปาล์มน้ำมัน.** สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พรพันธุ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2537. "การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรม." หน้า 24–28. ใน **การฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่อง "การควบคุมและการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์พืช".** นครปฐม : ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน.

พรรณราย ขันธรักษา. 2541. "ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระหว่างกลุ่มของข้าวเหนียวเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มลิวรรณ นาคขุนทด. 2542. "การศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุลมังคุดบางชนิดโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรี อัตตทิพพยหลคุณ และ มนตรี อัตตทิพพยหลคุณ (ผู้รวบรวม). 2536. **ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

วินิตชาญ รื่นใจชน. 2540. "การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจัดจำแนกและตรวจหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์หญ้าแฝกในประเทศไทย." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2541. **สถิติการเกษตรประเทศไทย ปีการเพาะปลูก 2540/41.** กรุงเทพ : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช และคณะ. 2538. "การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* โดยเทคนิคอาร์เอพีดี." **วารสารเกษตรศาสตร์(วิทย.)** 29 : 451–461.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aitchitt, M. *et al.* 1993. "A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.)." **Plant Mol. Biol. Rep.** 11(4) : 317–319.

Arasu, N.T. 1970. "Foliar spiral and yield in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." **Malay. Agric. J. 47 : 409-412.**

Arcade, A. *et al.* 1996." Heterozygosity and hybrid performance in larch." **Theor. Appl. Genet.** 98(8) : 1274–1281.

Arcade, A. *et al.* 2000. "Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch." **Theor. Appl. Genet.** 100 : 299–307.

Arus, P. *et al.* 1994. "Linkage analysis of ten isozyme gene in F1 segregating almond progenies." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 119(2) : 339-344.

Autio, W.R. *et al.* 1998. "Application of RAPDs to DNA extracted from apple root stocks." **Hort. Sci.** 32(2) : 333-335.

Bai, D. *et al.* 1995. "Identification of two RAPD marker tightly linked with the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco." **Theor. Appl. Genet.** 91(8) : 1184–1189.

Baudracco-Arnas, S. and Pitrat, M. 1996. "A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme. Disease resistance and morphological marker." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 57–64.

Bener, M.S. *et al.* 1995. "Detection of DNA polymorphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae)." **Plant Mol. Biol. Rep.** 13 : 147–155.

Benet, H. *et al.* 1995. "Identification of RAPD marker linked to a black leaf spot resistance gene in the chinese elm." **Theor. Appl. Genet.** 90 : 1068–1073.

Binelli, G. and Bucci, G. 1994. "A genetic linkage map of Picea abies Karst. Base on RAPD markers, as atool in population genetics." **Theor. Appl. Genet.** 88 : 283–288.

Campos, L.P. *et al.* 1994. "Genome relationship among *Lotus* species based on random amplified polymorphic DNA (RAPD)." **Theor. Appl. Genet.** 88 : 417–422.

Cao, D. and Oard, J.H. 1997. "Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars." **Crop Sci.** 37 : 1630-1635.

Castagna, R. *et al.* 1997. "Genetic variability of wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers". **Theor. Appl. Genet.** 94 : 424–430.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Castiglione, S. *et al.* 1993. "RAPD fingerprinting for identification and for taxonomy studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones." **Theor. Appl. Genet.** 87 : 54–59.

Cerny, T.A. *et al.* 1996. "Molecular phylogeny and DNA amplification fringerprinting of *Petunia taxa.*" **Theor. Appl. Genet.** 92 : 1009–1016.

Chague, V. *et al.* 1996. "Identification and mapping on Chromosome 9 of RAPD markers linked to Sw – 5 in tomato by bulked segregant analysis." **Theor. Appl. Genet.** 92 : 1045–1051.

Chan, K.F. and Sun, M. 1997. "Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 865-873.

Corley R.H.V. and Gray, B.S. 1976. "Growth and Morphology." 7-12. in Corley R.H.V. *et al.* **Oil palm research.** Amsterdam : Elsivier scientific.

Debener, T. *et al.* 1996. "RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species." **Mol. Bred.** 2 : 321-327.

Dellaporta, S.L. et al. 1983. 'A plant DNA mini preparation : version II.' **Plant. Mol. Biol. Rep.** 1 : 19-21.

Demeke, T. *et al.* 1996. "Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis." **Plant Cell Rep.** 15 : 662-667.

Devos, K.M. and Gale, M.D. 1992. "The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat." **Theor. Appl. Genet.** 84 : 567–572.

Divaret, I. *et al.* 1999. "RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of *Brassica oleracea* L. collection." **Theor. Appl. Genet.** 98 : 1029-1035.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. 'A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leave tissues.' **Phytochem. Bull.** 19 : 11-15.

Dweikat, S. *et al.* 1997. "Identification of RAPD marker for Hessian fly resistance gene in wheat." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 419–423.

Fabbri. A. *et al.* 1995. "Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 120(3) : 538-542.

Fernando, D. D. and Cass, D. D. 1996. "Genotypic differentiation in *Butomus umbellatus* (Butomaceae) using isozyme and random amplified polymorphic DNAs." **Can. J. Bot.** 74 : 647–652.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Frello, S. *et al.* 1995. "Inheritance of repaseed (*Brassica napus*) specific RAPD marker and transgene in the cross *B. juncea* x (*B. juncea* x *B. napus*)." **Theor. Appl. Genet.** 91 : 236–241.

Freqene, M.A. *et al.* 1994. "Variability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA in cassava (*Manihot escalenta* Crantz) and it wild relatives." **Theor. Appl. Genet.** 89: 719–727.

Gascon, J.P. *et al.* 1989. **"Fats for the future."** Cambie, R.C. ed. Chichester : Ellis Harwood Pbl.

Haley, S.D. *et al.* 1993. 'Identification RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean.' **Theor. Appl. Genet.** 86 : 505–512.

Hansen, M. *et al.* 1997. "Marker – assisted selection of restored male-fertile *Brassica napus* plants using a set of dominant RAPD markers." **Mol. Bred.** 3 : 449-456.

Hardon, J.J. 1976. "Oil palm breeding-introuction." 89-108. in Corey, R.H.V. *et al.* **Oil palm research.** Netherlands : Elsevier.

Hardon, J.J. 1976. "Oil palm." 225-227. in Simmonds, N.W. **Evaluation of crop plento.** London : Longman.

Hardon, J.J. and Turner, P.D. 1967. ."Observation on natural pollination in commercial planting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." **Expt. Agric.** 3 : 105-108.

Hardon, J.J. *et al.* 1985. **"Progress in plant breeding –1."** Russel, G.E. ed. London : Butterworths.

Harley, C.W.S. 1977. "The botany of the oil palm." 37-76. in **The oil palm.** 2nd Ed. Newyork : Longman.

Hartley, C.W.S. 1977. **The oil palm.** London : Longman.

Hernandez, P. *et al.* 1999. "Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgreession and marker - assisted selection of wheat." **Mol. Bred.** 5 : 245-253.

Heun, M. *et al.* 1994. "A comparison of RAPD and isozyme analysis for determining genetic relationships among Avena sterillis L. accessions." **Theor. Appl. Genet.** 87 : 689–696.

Hoelzel, A. R. and Green, A. 1998. "PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting." 201-235. in **Molecular Genetic Analysis of Population.** London : Oxford Univ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hoey, B.K. *et al.* 1996. "A phylogenetic analysis of Pisum based on morphological characters and allozyme and RAPD markers." **Theor. Appl. Genet.** 92 : 92–100.

Hu, J. and Quiros, C.F. 1991. "Identification of broccoli and cauliflowercultivars with RAPD markers.' **Plant Cell Rep.** 10 : 505–511.

Huang, N. *et al.* 1997. "RFLP mapping of isozymes RAPD and QTLs for grain shape, brown planthoppers ressistance in a doubled haploid rice population." **Mol. Bred.** 3 : 105 - 113.

Huff, D.R. 1997. "RAPD characterization of heterogeneous perennial rygrass cultivars." **Crop Sci.** 37 : 557–564.

Igbal, M.J. 1997. "Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 139–144.

Jaccard, P. 1908. 'Nouvelles rescherches sur la distribution florale.' **Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.** 44 : 223-270.

Jung, C. *et al.* 1993. "Phylogenetic relationships between cultivared and wild species of genus *Beta* revealed by DNA fingerprinting." **Theor. Appl. Genet.** 80 : 449–457.

Karihaloo, J.L. *et al.* 1995. "Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant *Solanum melongena* L. (Solanaceae)." **Theor. Appl. Genet.** 90(6) : 767–770.

Katzir, N. *et al.* 1996. "Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the study of parasite weed *Orobanche*." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 367–372.

Kazan, K. *et al.* 1992. "Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 882–888.

Keil, M. and Griffin, A.R. 1994. "Use of random amplified polymorphic DNA(RAPD) marker in discrimination and verification of genotypes in Eucalyptus." **Theor. Appl. Genet.** 89 : 442–450.

Kennard, W.C. *et al.* 1994. "Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, diseas resistanced morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber." **Theor. Appl. Genet.** 89 : 42–48.

Klein-Lankhorst, R.M. *et al.* 1991. "Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD).' **Theor. Appl. Genet.** 83 : 108–114.

Koller, B. *et al.* 1992. 'Identification of apple cultivars using RAPD markers." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 901–904.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kresavich,S. *et al.* 1992. "Charaterisation of genetic identities and relation ships of *Brassica olevacea* L. via a random amplified poltmorphic DNA assay." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 190 – 196.

Lambrourne, J. 1935. "Note on the root harbit of oil palm." **Malay. Agric. J.** 23 : 582–585.

Landry, S. *et al.* 1994. "Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging." **Theor. Appl. Genet.** 89 : 847–852.

Lange,D.A. *et al.* 1998. "A plant DNA isolation protocal suitable for polymerase chain reaction base marker – assisted breeding.' **Crop. Sci.** 38 : 217-220.

Lanner, C. *et al.* 1996. "Genetic validity of RAPD markers and the intra- and inter-specific level in wild *Brassica* species with n = 9." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 9–14.

Lanza, L.L.B. *et al.* 1997. "Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 1023-1030.

Lawton, D.M. 1981."Pollination and fruit set in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)." 241-242. in **Oil palm in Africa in eighties.** Malaysia oil palm conference.

Lee, S.J. *et al.* 1996. "Detection of grnetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon (*Citrullus lanantus* (Thunb.) Mansf.) germplasm." **Theor. Appl. Genet.** 92 : 719–725.

Lerceteau, E.T. *et al.* 1997. "Evaluation of extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 10–19.

Levi. A. and Rowland, L.J. 1997. "Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationships using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) anchored primers." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 122(1) : 74-78.

Lu, Z.X. *et al.* 1996. "Identification of peach rootstock cultivars by RAPD makers." **Hort. Sci.** 31 : 127–129.

Lu,Z.X. *et al.* 1996. "Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers." **Hort. Sci.** 31 (1) : 127-129.

MaaB, H.I. and Klaas, M. 1995. "Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers." **Theor. Appl. Genet.** 91 : 89–97.

Mackill.D.J. 1995. "Classifying Japonica rice cutivars with RAPD markers." **Crop Sci.** 35 : 889-894.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mailer, R.J. *et al.* 1994. "Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitary primers." **Theor. Appl. Genet.** 87 : 697–704.

Martin, G.B. *et al.* 1991. "Rapid identification of markers linked to *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primer and near –isogenic line." **Genetics.** 88 : 2336–2340.

McNally, K.L. and Mutschler, M.A. 1997. "Use of introgression lines and zonal mapping to identify RAPD markers linked to QTL." **Mol. Bred.** 3 : 203-212.

Menkir, A. *et al.* 1997."RAPD base assesment of genetic diversity in cultivated races of sorghum." **Crop Sci.** 37 : 564-569.

Michelmore, R.W. *et al.* 1991. "Identification of markers linked to desease-resistance genes by bulked segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations." **Genetics.** 88 : 9828–9832.

Millan,T. *et al.* 1996. "Using RAPDs to study phylogenetic relationship in *Rosa*." **Theor. Appl. Genet.** 92(2) : 273–277.

Multani, D.S. and Lyon, B.R. 1995. "Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers." **Genome.** 38(5) : 1005–1008.

Murray, H.G. and Thompson, W.F. 1980. "Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucl. Acids. Res.** 8 : 4321 – 4325.

Nozaki, T. *et al.* 2000. "Construction of synteny groups of *Brassica alboglabra* by RAPD markers and detection of chromosome aberrations and distorted transmission under the genetic background of B. compestris." **Theor. Appl. Genet.** 101 : 538–546.

Nyborn, H. *et al.* 1990. "Genetic variation detected by use of the M13 DNA finerprint probe in Malus Promus and Rubus (Rosaceae)." **Theor. Appl. Genet.** 79 : 153-156.

Orozco-Castillo, C. *et al.* 1994. "Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers." **Theor. Appl. Genet.** 87 : 934–940.

Paran, I. And Michelmore, R.W. 1993. "Development of reliable PCR- base markers linked to downy mildew resistant gene in lettuce." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 985–993.

Parent, J.G. and Page. D. 1998. " Identification of raspbery cultivars by sequence characterized amplified region DNA analysis." **Hort. Sci.** 33(1):140-142.

Parminder, S.V. *et al.* 1994. "Use of RAPD for the study of diversity with in plant germplasm collection." **Hered.** 74 : 170–179.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Parsons, B.J. *et al.* 1997. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. **Mol. Bred.** 3 : 115 – 125.

Peil, A. *et al.* 1997. " RAPDs as molecular markers for the detection of *Aegilops markgrafii* chromatin in addition and euploid introgression lines of hexaploid wheat." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 934-940.

Pillay, M. and Kenny, S.T. 1996. "Random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of genetic variability and segregation in F1 progeny." **Theor. Appl. Genet.** 92 : 334–339.

Porebski, S. *et al.* 1997. "Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components." **Plant Mol. Biol. Rep.** 15(1) : 8–15.

Poulsen, D.M.E. *et al.* 1995. "The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley." **Theor. Appl. Genet.** 91(2) : 270–273.

Prince, J.P. *et al.* 1995. "Survey of DNA polymorphism with the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars." **Genome** 38(2) : 224–231.

Pummi, S. 1994. "Random amplified polymorphic DNA markers in sorghum." **Theor. Appl. Genet.** 89 : 80–88.

Purvis, C. 1957. "The colour of oil palm fruits." **J. W. Afr. Inst. Oil palm Res.** 2 : 142-146.

Ratnaparkhe, M.B. *et al.* 1995. "Genetic fingerprinting of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and its wild relatives using RAPD marker." **Theor. Appl. Genet.** 91 : 893–898.

Rees, A.R. 1963. 'A note on the spines of the oil oalm.' **Principes.** 7 : 30-31.

Ronning, C.M. *et al.* 1995. "Using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker to identify *Annona* cultivars." **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 120(5) : 726–729.

Saiki, R.K. 1989. "The design and optimization of the PCR." 7–16. in Erlich, H.A. **PCR Technology; Principles and Applications for DNA Amplification.** Newyork : Stockton.

Saiki, R.K. *et al.* 1985. "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia." **Science.** 230 : 1350-1354.

Saiki, R.K.And Gelfand, D.H. 1989. "Introducing Ampli*Taq* DNA polymerase." **Amplification.** 1 : 4–6.

Sambrook, J. *et al.* 1989. **Molecular cloning : a laboratory manual.** 2nd ed. NewYork : Cold Spring Harbor.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schnell, R.J. *et al.* 1995. "Identification of cultivars and validation of genetic relatioships in *Mangifera indica* L. using RAPD marker." **Theor. Appl. Genet.** 90 : 269–274.

Schnieider, K.A. *et al.* 1997. "Marker assisted selection to improve drought resistant in common bean." **Crop Sci.** 37 : 51-56.

Scholten, O.E. *et al.* 1997. "Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker and linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta* accession." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 123–130.

Shah, F.H. *et al.* 1994. "The utility of RAPD markers for determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*)." **Theor. Appl. Genet.** 89 : 713–718.

Sharma, S.K. *et al.* 1995. "Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis.' **Theor. Appl. Genet.** 91 : 647–654.

Sharp, P.A. *et al.* 1973. "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose – ethidium bromide electrophoresis. **Biochem.** 12 : 3055-3060.

Smith, E.H.G. 1935. "A note on recent research on empire products." **Bull. Imp. Inst. Lond.** 33 : 370-374.

Soller, M. and Beckman, J.S. 1983. "Genetic polymorphism in varietal identify and genetic improvement." **Theor. Appl. Genet.** 67 : 25-33.

Spooner, D.M. *et al.* 1997. 'Species boundaries and interrelationships of two closely related sympatric diploid wild potato species, *Solanum astleyi* and S. *boliviense*, base on RAPD." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 764–771.

Staub, J. *et al.* 1996. "Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber." **Hort. Sci.** 31(2) : 262-266.

Steiner, J.J. *et al.* 1998. "Germplasm diversity among cultivars and NPGS grimson clover collection." **Crop Sci.** 38 : 263-271.

Stile, J.I. *et al.* 1993. "Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 697–701.

Stiles, J.I. *et al.* 1993. "Using random amplified polymorphism DNA for evaluating genetic relationship among papaya cultivars." **Theor. Appl. Genet.** 85 (6-7) : 697–701.

Susan, E.W. *et al.* 1993. "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*." **Theor. Appl. Genet.** 86 : 497–504.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sweeney, P.M. and Danneberger, T.K. 1994. "Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass : A comparison of bulk sample vs. individuals." **Hort. Sci.** 29 : 624–626.

Talbert, L.E. *et al.* 1996. "Development of PCR markers linked to resistance to wheat streak mosaic virus in wheat." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 463–467.

Tao, Y. *et al.* 1993. "DNA polymorphism in grain sorghum (*Sorghum biccolor* L. Moech)." **Theor. Appl. Genet.** 86 : 679–688.

Thompson, J.A. *et al.* 1998. "Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers." **Crop Sci.** 38 : 1348-1355.

Thormann, C.E. *et al.* 1994. "Comparison of RFLP and RAPD marker to estimation genetic relationships within and among Crucifurous species." **Theor. Appl. Genet.** 88 : 973-980.

Tinker, N.A. *et al.* 1993. "Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships inspring barley." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 976–984.

Torres, A.M. *et al.* 1993. "Identifying rose cultivar using Random amplified polymorphic DNA markers." **Hort. Sci.** 28 (4) : 333–334.

Transue, D.K. *et al.* 1994. "Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources." **Crop Sci.** 34 : 1385–1389.

Trujillo, I. And Rallo,L. 1995. "Identifying olive cultivars by isozyme analysis." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 120(2) : 318-324.

Ur-Rahman, H. *et al.* 1997. "The use of RAPD for verifying the apomatic status of seedling of Malus species." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 1080-1083.

Valenzuela, J.A.L. *et al.* 1997. "Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers." **Hort. Sci.** 32(6) : 1105 - 1108.

Warburton, M.L. *et al.* 1996. "Utility of RAPD marker in identifying genetic linkages to gene of economic interest in peach." **Theor. Appl. Genet.** 93(5 – 6) : 920–925.

Waugh, R. and Powell, W. 1992. "Using RAPD marker for crop improvement." **TIBTECH.** 10 : 186-191.

Weeden, N.F. *et al.* 1992. "Inheritane reliability of RAPD markers." 12–17. in **Proc. of the symp. Application of RAPD Technology to Plant Breeding.** New york : Minneapolis.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. "Fingerprint genome using PCR with arbitrary primers." **Nucl. Acids Res.**18 : 721-7218.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wilde, J. *et al.* 1992. "Genetic fingerprinting of Theobroma clone using amplified polymorphic DNA markers." **Theor. Appl. Genet.** 86(4) : 871–877.

William, J.G.K. *et al.* 1990. "DNA polymorpisms amplified by arbitary primers useful as genetic markers." **Nucleic acids Res.** 18 : 6531- 6535.

Xu, H. and Bakalinsky, A.T. 1996. "Identification of grape (Vitis) rootstocks using sequence charaterized amplified region DNA markers. **Hort. Sci.** 31(2) : 267-268.

Yang, X and Quiros, C. 1993. "Identifying and classification of celery cultivar with RAPD markers." **Theor. Appl. Genet.** 86 : 205–212.

Yu, K. F. *et al.* 1993. "Random ampliffied polymorphic DNA (RAPD) analysis." 287-301. in Glick, B. R. and Thompson, J. E, **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. New York : CRC.

Yu, L.X. and Nguyen, H.T. 1994. "Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice (*Oryza sativar* L.).' **Theor. Appl. Genet.** 87 : 668–672.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1

1.1 การเตรียมสารเคมีในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1.1.1 สารละลาย tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

ชั่ง tris base ปริมาณ 121.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้น ปรับค่า pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ HCl เข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 42 มิลลิลิตร) จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.1.2 สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

ชั่ง disodium ethylene diaminetetra acetate $2H_2O$ 186.1 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปคนด้วย เครื่อง sterrer แล้วปรับ ค่า pH ให้เป็น 8.0 โดยใช้ NaOH (ปริมาณ 20 กรัม) EDTA จะเริ่มละลายเมื่อ pH เท่ากับ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.1.3 สารละลาย extraction buffer (EB) ประกอบด้วย

1.1.3.1 tris-HCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

1.1.3.2 EDTA ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

1.1.3.3 NaCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์

1.1.3.4 β – mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร เติม NaCl 29.22 กรัม แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.1.4 สารละลาย CTAB buffer

ใช้ tris-HCl เข้มข้น 2 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 4 มิลลิลิตร เติม NaCl 8.182 กรัม ผสมกับ CTAB 2 กรัม และ PVP-40 1 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนเติม β – mercaptoethanol 200 ไมโครลิตร

1.1.5 SDS เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง sodiumdodecylsulphate (sodiumlauryl sulphate, Sigma) 100 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อย อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น แล้วทำการปรับ pH ให้ได้ 7.2 โดยหยด HCl เข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.6 สารละลาย potassium acetate เข้มข้น 5 โมลาร์

ละลายผง potassium acetate122.75 กรัม ในน้ำกลั่น 180 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.1.7 isopropanol

เตรียม stock isoproanol เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.1.8 สารละลาย chloroform – isoamyl alcohol

เตรียมผสม คลอโรฟอร์ม และ isoamyl alcohol ในอัตรา 24 : 1 แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.1.9 สารละลาย TE buffer เข้มข้น 5 และ 1 เท่า pH 8.0 ประกอบด้วย

1.1.9.1 tris-HCl เข้มข้น 2 โมลาร์ pH 8.0

1.1.9.2 EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

ผสม tris-HCl เข้มข้น 2 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 200 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 93.3 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.1.10 สารละลาย ethanol เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์

ผสมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และ Ethanol เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.1.11 สารละลาย Rnase

ละลาย Rnase 10 มิลลิกรัม ในบัฟเฟอร์ที่ใช้เตรียม Rnase (Rnase storage buffer) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนเดือด เป็นเวลา 15 นาที เพื่อลดปฏิกิริยาจาก Dnase แล้วให้ความเย็นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติม Rnase T1 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมสารเคมีในขั้นตอน การวิเคราะห์ความเข้มข้นดีเอ็นเอ

1.2.1 EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0

ชั่ง disodium ethylene diaminetetra acetate $2H_2O$ 186.1 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปคนด้วย เครื่อง stirrer แล้วปรับ ค่า pH ให้เป็น 8.0 โดยใช้ NaOH (ปริมาณ 20 กรัม) EDTA จะเริ่มละลายเมื่อ pH เท่ากับ 8 .0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.2.2 TBE buffer เข้มข้น 1 เท่า ประกอบด้วย

1.2.2.1 tris-HCl เข้มข้น 89 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2.2 EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

1.2.2.3 boric acid เข้มข้น 89 มิลลิโมลาร์

ชั่ง จำนวน 242 กรัม เติมน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร ทำการ stirrer จนละลาย แล้วเติมผง boric 57.1 มิลลิกรัม และ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 100 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 ลิตร

1.2.3 ethidium bromide เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปคน เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง นำไปเก็บในขวดสีชา หรือหุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียม นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.2.4 สารละลาย loading dye เข้มข้น 6 เท่า ประกอบด้วย

1.2.4.1 bromophynol blue เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

1.2.4.2 sucrose เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร

ใช้ sucrose เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 4 กรัมและ bromophynol blue เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 25 มิลลิกรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตาให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ต้องการสารละลายขนาด 1 เท่า เติม loading dye 1 ไมโครลิตร ในตัวอย่างทุก 5 ไมโครลิตร)

1.2.5 dye เข้มข้น 10 เท่า (type 2 dye matter) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 4 องศาเซลเซียส

1.2.5.1 bromophenol blue	125 มิลลิกรัม (0.25 เปอร์เซ็นต์)
1.2.5.2 xylene cyanol	125 มิลลิกรัม (0.25 เปอร์เซ็นต์)
1.2.5.3 ficoll (Type 400)	12.5 กรัม (25 เปอร์เซ็นต์)
1.2.5.4 น้ำกลั่น	
รวม	15 มิลลิลิตร

1.2.6 agarose gel เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง ผง agarose เติม TBE buffer 0.4 กรัม เติม TBE buffer 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบในเตาไมโครเวฟ 3 นาที จนเดือดแล้วนำมาคนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เย็นมี อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเทลงบนถาดสำหรับเตรียมเจลแล้ววางหวีลงไปเพื่อทำให้เกิดช่อง (well)

1.3 การเตรียมสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

1.3.1 dNTPs ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ทำการปรับความเข้มข้น (dilute) ให้ได้ 1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้น้ำกลั่น ผสม dATP dCTP dTTP และ dGTP ของบริษัท SibNzyme แต่ละตัวปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.2 ***Taq*** **DNA polymerase DyNAzyme** เข้มข้น 2 ยูนิต ต่อไมโครลิตร (ของบริษัท Finnzyme) เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.3.3 10x buffer ปราศจาก $MgCl_2$ (DyNAzyme ของบริษัท Finnzyme)

เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย

1.3.3.1 tris HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.8

1.3.3.2 KCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

1.3.3.3 Triton X-100 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

1.3.4 สารละลาย $MgCl_2$ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (ของบริษัท Finnzyme)

ใช้ $MgCl_2$ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.3.5 primer เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ (ของบริษัท Operon technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ทำการปรับความเข้มข้น ของไพรเมอร์ให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (ตามคำแนะนำของบริษัท)

1.3.6 100 base pair DNA marker ladder

ทำการปรับความเข้มข้นของ DNA marker ladder ให้เป็น 50 มิลลิโมลาร์ โดยดูด DNA marker ladder ปริมาณ 10 ไมโครลิตร เติม dye 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 50 ไมโครลิตร

1.3.7 agarose gel

ชั่ง ผง agarose เติม TBE buffer (ตามความเข้มข้นที่ต้องการ เช่น ต้องการ 2 เปอร์เซ็นต์ เติม ชั่ง ผง agarose 1 กรัม เติม TBE buffer 50 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปอบในเตาไมโครเวฟ 3 นาที จนเดือดแล้วนำมาคนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เย็นมี อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเทลงบนถาดสำหรับเตรียมเจลแล้ววางหวีลงไปเพื่อทำให้เกิดช่อง (well)

1.4 ขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ

1.4.1 องค์ประกอบของบัฟเฟอร์ 3 ชนิด ได้แก่

1.4.1.1 บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ CTAB ประกอบด้วย CTAB เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ NaCl เข้มข้น 2.8 โมลาร์ EDTA เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 tris - HCl เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และ β – mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

1.4.1.2 บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ salt ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 tris - HCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และ β – mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (เติมก่อนใช้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.1.3 บัฟเฟอร์ที่มีองค์ประกอบของ SDS ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 tris - HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.6 β – mercaptoethanol เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (เติมก่อนใช้) SDS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

1.4.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช่ CTAB buffer (ตามวิธีของ Doyles and Doyles. 1987)

1.4.2.1 เตรียมใบปาล์มน้ำมัน จำนวน 0.5 กรัม หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งที่มี acid wash sand (ทรายละเอียด) อยู่ 0.5 กรัม เติมไนโตรเจนเหลวแล้วทำการบดให้ใบปาล์มเป็นผงละเอียดและไนโตรเจนเหลวระเหยหมด

1.4.2.2 ใส่ extraction buffer ที่มี องค์ประกอบของ CTAB ปริมาณ 7 มิลลิลิตร ลงไปในโกร่งที่มีผงใบปาล์ม ผสมให้เข้ากัน แล้วใช้ ช้อน (spetulas) ตักใส่ลงไปในหลอด eppendorf ขนาด 25 มิลลิลิตร

1.4.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.4.2.4 เติม isoamylalcohol จำนวนเท่าตัวแล้วทำการผสม (gentle mix)

1.4.2.5 นำไปหมุนเหวี่ยง 1 ครั้งด้วยความเร็ว 6,000 g อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.4.2.6 ดูดแยกเอาสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของ isoamylalcohol ที่ผสมอยู่กับดีเอ็นเอใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 2.5 มิลลิลิตร

1.4.2.7 หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.4.2.8 นำไปล้างด้วย cool ethanol เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ อีก 3 รอบ โดยแต่ละรอบนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง (spin down) ด้วย

1.4.2.9 หลังจากนั้นนำไปบ่มแห้งเพื่อ dry alcohol ในตู้ laminar flow

1.4.2.10 ละลาย ดีเอ็นเอใน TE buffer 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ดีเอ็นเออยู่ในสภาพเป็นสารละลายแล้วเติม Rnase ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อหลอด

1.4.2.11 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บทที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมนำไปใช้งาน

1.4.3 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ SDS buffer (ตามวิธีการดัดแปลงจาก Dellaporta. 1983)

1.4.3.1 นำใบพืชปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในโกร่งเติม ทราย (acid wash sand) และ PVP จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลว แล้วบดให้ละเอียดจนไนโตรเจนเหลวระเหยหมด ทำติดต่อกัน 2 ครั้ง แล้วถ่ายใส่หลอด eppendorf ขนาด 2.5 มิลลิลิตรที่มี extraction buffer 1 มิลลิลิตร ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เติม β – mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร และ SDS เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ 15 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว

1.4.3.3 เติม potassiumdidecylsulfate เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเข้ากัน (Gentle mix) แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่งโมง ในขั้นนี้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนรวมกับโปแตสเซียมไดเดซิลซัลเฟต เหลือกรดนิวคลีอิคอยู่ในสารละลาย

1.4.3.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 – 12,000 รอบ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.4.3.5 ดูดสารละลายใสที่ได้แบ่งใส่ใน หลอด eppendorf ขนาด 2.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม isopropanol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะพบว่าเกิดส่วนที่เป็นวุ้นใสลอยอยู่นั่นคือส่วนของ ดีเอ็นเอที่ได้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

1.4.3.6 เทสารละลายทิ้งให้เหลือเฉพาะดีเอ็นเอที่เป็นวุ้นใส แล้วเติม cool ethanol เพื่อล้างดีเอ็นเอ เขย่าเพื่อให้ ดีเอ็นเอสัมผัสกับเอทานอลทั่วถึงแล้วนำไป ปั่นเหวี่ยง (spin down) แล้วเทส่วนของเหลวที่เป็นเอทานอลทิ้ง ทำการล้าง ดีเอ็นเอซ้ำกัน 3 ครั้ง

1.4.3.7 นำดีเอ็นเอที่ล้างเสร็จไปเติม TE buffer ปริมาณ 2 เท่า ของปริมาณ ดีเอ็นเอเขย่าให้ดีเอ็นเอสัมผัสกับ TE buffer แล้วนำไป spin down จากนั้นนำไปเก็บบ่มในตู้แช่เย็น ที่อุณหภูมิ –20 องศา ใช้เป็น stock ดีเอ็นเอ

1.4.4 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ salt buffer (ตามวิธีการประยุกต์ของ Ying *et. al.* 1992)

1.4.4.1 นำใบพืชประมาณ 0.5 กรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายใส่หลอดเซ็นติฟิวก์ขนาด 2.5 มิลลิลิตร ที่มี salt buffer 1.2 มิลลิลิตร

1.4.4.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

1.4.4.3 นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

1.4.4.4 ดูดสารละลายใส 700 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ เติมฟีนอล:คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) 600 ไมโครลิตร ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

1.4.4.5 นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

1.4.4.6 ดูดสารละลายใส 600 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ แล้วสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

1.4.4.7 ดูดสารละลายใส 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.4.4.8 นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.4.4.9 ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 75 เปอร์เซ็นต์ 3 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.4.10 เทส่วนน้ำทิ้ง นำไปล้างด้วย cool ethanol เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ อีก 3 รอบ โดยแต่ละรอบนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง (spin down)

1.4.4.11 หลังจากนั้นนำไปบ่มแห้งเพื่อ dry alcohol ในตู้ laminar flow

1.4.4.12 ละลาย ดีเอ็นเอใน TE buffer 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ดีเอ็นเออยู่ในสภาพเป็นสารละลายแล้วเติม Rnase ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อหลอด

1.4.4.13 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมนำไปใช้งาน

1.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอในการทดลองนี้ใช้การดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์ หลังจากแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส ซึ่งดัดแปลงจาก Sambrook *et. al.* (1989) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1.5.1 เตรียมอะกาโรสเจล เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งผงอะกาโรส 0.64 กรัม ใส่ลงใน TBE buffer (การเตรียมแสดงในภาคผนวก 1.2) 80 มิลลิลิตร ละลายผงอะกาโรสโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ 3 นาที จนเดือดเพื่อให้อะกาโรสหลอมละลาย

1.5.2 ปล่อยให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในพิมพ์ให้เจลมีความหนาประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางหวี (comb) เสียบลงที่ปลายด้านบนของแผ่นเจล เพื่อให้เกิดเป็นหลุม (well) เมื่อเจลแข็งตัว สำหรับหยอดตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ

1.5.3 ปล่อยให้อะกาโรสเจลเย็นตัวลงจนแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 30 - 45 นาที แล้วยกหวีออกอย่างระมัดระวัง

1.5.4 นำแผ่นเจลไปใส่ลงในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส ให้ด้านที่มีช่องอยู่ใกล้ขั้วลบและเติมบัฟเฟอร์ TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจลพอสมควร โดยให้ผิวเจลอยู่ต่ำกว่าระดับ TBE buffer 1-2 มิลลิเมตร

1.5.5 ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ loading dye ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 แล้ว ค่อย ๆ หยอดสารละลายผสมนี้ลงในหลุม (well) โดยใช้ micropipette สารละลายดีเอ็นเอจะจมลง และทำเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ทราบขนาดและความเข้มข้น ในที่นี้ใช้ 10, 100, และ 200 นาโนกรัม

1.5.6 ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 70 - 100 โวลต์ ปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของ loading dye เคลื่อนที่ไปในระยะที่เหมาะสม คือห่างปลายเจลประมาณ 1 เซนติเมตร

1.5.7 นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 - 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.8 นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วบันทึกภาพเปรียบเทียบ ความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอที่ทดลองกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

1.6 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับทำพีซีอาร์

1.6.1 นำ 10x buffer dNTPs เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ primer เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ออกจากที่เก็บรักษานำมาทิ้งให้สารละลายที่แข็งตัวเป็นน้ำแข็งอยู่ ละลายออกให้หมด

1.6.2 เตรียมหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร (PCR tube) โดยเขียนหมายเลขให้เรียบร้อย วางไว้บนโต๊ะที่ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ ใส่ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ลงที่ก้นหลอดแล้วจึงนำไปตั้งไว้ที่ชั้นวาง

1.6.3 นำสารละลายทั้งหมดที่ละลายดีแล้วไปหมุนเหวี่ยง แล้วนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง

1.6.3.1 ผสมส่วนประกอบ (master mix) ที่จะทำปฏิกิริยาในหลอด eppendorf ขนาด 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังต่อไปนี้

1) น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
2) 10x buffer
3) dNTPs เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์
4) $MgCl_2$ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์
5) primer เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
6) *Taq* DNA polymerase 2 ยูนิต ต่อไมโครลิตร

1.6.3.2 ผสมส่วนประกอบ ที่จะทำปฏิกิริยา โดยการหมุนเหวี่ยงแล้วนำมาเขย่าด้วย vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง

1.6.3.3 เติมส่วนประกอบดังกล่าว ปริมาตร 9 ไมโครลิตร ลงในหลอด 0.5 ไมโครลิตร ที่เตรียมใส่ดีเอ็นเอไว้แล้ว

1.6.3.4 นำหลอดที่เตรียมไว้สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำปฏิกิริยา

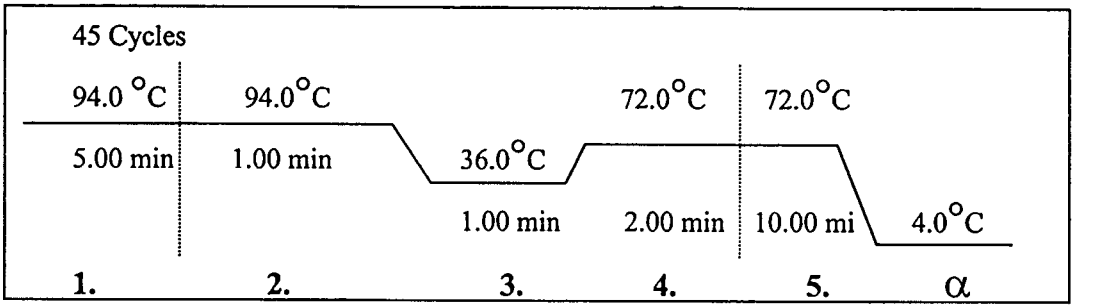
1.6.3.5เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จเรียบร้อยแล้วสามารถนำตัวอย่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจสอบแถบ polymophism ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส บนอะกาโรสเจล

1.7 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. คือขั้นตอน predenaturation **2.** คือขั้นตอน denaturation

3. คือขั้นตอน annealing **4.** คือขั้นตอน extension **5.** คือขั้นตอน **terminate**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1.8 ขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสตรวจสอบผล

1.8.1 เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้นที่เหมาะสม

1.8.2 เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว เตรียมอิเล็กโตรโฟรีซีสบัฟเฟอร์ (electrophoresis bufer) โดยผสม TBE buffer เข้มข้น 5 เท่า ปริมาณ 100 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จะได้ TBE buffer เข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใช้เป็น electrophoresis buffer

1.8.3 เทอิเล็กโตรโฟรีซีสบัฟเฟอร์ลงบนผิวหน้าอะกาโรสเจลที่วางอยู่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส รุ่น Easycast Model # B2 เพื่อให้เจลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์อย่างน้อย 30 นาที

1.8.4 ใช้ micropipet ปรับปริมาตรให้สามารถดูด สารได้ 5 ไมโครลิตร ดูดเอาดีเอ็นที่ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว มารวมกับ loading dye ปริมาณ 5 ไมโครลิตร แล้วใช้ micropipet ที่ปรับปริมาตรให้ดูดสารได้ 10 ไมโครลิตรดูดเอาสารละลายไปหยดลงบนช่อง ของอะกาโรสเจล จนครบตามจำนวนตัวอย่าง จากนั้นนำ 100 base pair DNA marker ladder ซึ่งใช้เป็น marker มาหยดลงในช่องอะกาโรสเจล

1.8.5 ทำอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 70 - 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบ ของ dye เคลื่อนลงมาอยู่ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 เซนติเมตร (1 ชั่วโมง)

1.8.6 นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสแล้ว ไปแช่ใน สารละลาย ethidium bromide เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 - 40 นาที จากนั่นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที

1.8.7 บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูปที่ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตรุ่น Vilberlourmat TCX-20.M และ SONY Video graphic printer Up-895 MD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2

ตารางผนวกที่ 2.1 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA11 ในปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPA11 1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
OPA11 1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
OPA11 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
OPA11 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA11 700	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA11 500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
OPA11 450	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.2 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA17 ในปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPA17 1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
OPA17 1400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA17 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
OPA17 850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA17 680	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.3 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC07 ในปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPC07 1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC07 1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC07 900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC07 800	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC07 700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA07 550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2.4 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC08 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPC08 1200	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
OPC08 900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC08 750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.5 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPC15 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPC15 1800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
OPC15 1250	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
OPC15 1100	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
OPC15 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC15 600	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.6 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD01 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็น

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPD01 1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
OPD01 1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
OPD01 1000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPD01 850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD01 600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.7 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF08 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPF08 1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
OPF08 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF08 450	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้มีไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2.8 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD03 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPD03 1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD03 1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPD03 1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
OPD03 950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD03 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD03 750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD03 650	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
OPD03 550	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
OPD03 380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.9 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPD12 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็น

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPD12 1450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD12 1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD12 1000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
OPD12 850	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD12 750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
OPD12 600	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

ตารางผนวกที่ 2.10 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE01 ในปาล์มน้ำมัน ทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE01 1500	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
OPE01 1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01 500	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2.11 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE16 ในปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE16 1350	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
OPE16 1200	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
OPE16 950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPE16 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE16 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.12 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE17 ในปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE17 1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPE17 1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE17 550	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1

ตารางผนวกที่ 2.13 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPE19 ในปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPE19 1400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPE19 1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE19 400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 2.14 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF07 ในปาล์มน้ำมันทั้ง 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปาล์ม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
OPF07 1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPF07 350	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.15 แสดงค่า similarity index ของ phylogenetic tree ในปาล์มน้ำมัน 32 ตัวอย่าง

Cultivars	Fe	Ma	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	D588	D589	D671	P425	P427	F62	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9
Ma	0.59																														
F1	0.75	0.59																													
F2	0.75	0.59	0.91																												
F3	0.75	0.59	0.93	0.91																											
F4	0.75	0.59	0.93	0.91	0.95																										
F5	0.75	0.59	0.93	0.91	0.95	0.95																									
F6	0.75	0.59	0.94	0.91	0.93	0.93	0.93																								
F7	0.75	0.59	0.96	0.91	0.93	0.93	0.93	0.93																							
F8	0.75	0.59	0.91	0.95	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91																						
F9	0.75	0.59	0.91	0.91	0.93	0.93	0.93	0.93	0.96	0.91																					
F10	0.75	0.59	0.91	0.93	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.93	0.91																				
F11	0.75	0.59	0.91	0.93	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.93	0.91	0.91																			
F12	0.75	0.59	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90																		
F13	0.75	0.59	0.91	0.95	0.91	0.90	0.90	0.91	0.91	0.95	0.91	0.93	0.93	0.90																	
F14	0.75	0.59	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88																
D588	0.70	0.59	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70															
D589	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44														
D671	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.67													
P425	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.44	0.44												
P427	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.44	0.44	0.76											
F62	0.75	0.59	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.44	0.44	0.57	0.57										
N1	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.44	0.44	0.55	0.55	0.55									
N2	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40								
N3	0.65	0.59	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.44	0.44	0.57	0.57	0.63	0.55	0.40							
N4	0.65	0.59	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.44	0.44	0.57	0.57	0.64	0.55	0.40	0.63						
N5	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.44	0.44	0.57	0.57	0.58	0.55	0.40	0.58	0.58					
N6	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40				
N7	0.67	0.59	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.44	0.44	0.57	0.57	0.67	0.55	0.40	0.63	0.64	0.58	0.40			
N8	0.75	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.44	0.44	0.57	0.57	0.77	0.55	0.40	0.63	0.64	0.58	0.40	0.67		
N9	0.75	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.44	0.44	0.57	0.57	0.77	0.55	0.40	0.63	0.64	0.58	0.40	0.67	0.92	
N10	0.75	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.44	0.44	0.57	0.57	0.77	0.55	0.40	0.63	0.64	0.58	0.40	0.67	0.91	0.91

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล : ธนวัฒน์ ชูช่อ

เกิดเมื่อ : วันที่ 27 เดือน กันยายน พ.ศ. 2519

สถานที่เกิด : 77 หมู่ 2 ถ. วิจารณ์รังสรรค์ ต. หนองบัว อ. เมือง จ. หนองบัวลำภู 39000

ที่อยู่ปัจจุบัน : 733 ซ. กรุงธนพัฒนา ถ. จรัญสนิทวงศ์ (89) แขวงบางอ้อ เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700

การศึกษา :

พ.ศ. 2524 – 2530 ระดับอนุบาล ประถมศึกษา โรงเรียนหนองบัววิทยายน อ.เมือง จ. หนองบัวลำภู

พ.ศ. 2531 – 2536 ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนอุดรพิธยานุกูล อ. เมือง จ. อุดรธานี

พ.ศ. 2537 – 2540 ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2541 - กำลังศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้