ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด ISSR และความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงในประเทศไทย

ISSR DNA FINGERPRINTS AND GENETIC DIVERSITY OF TAM-LUENG (*Coccinia grandis*) IN THAILAND

จริยา งามวงษ์

จิรภัทร์ ขันนอก

ฐิตินันท์ เรืองรอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISSR DNA FINGERPRINTS AND GENETIC DIVERSITY OF TAM-LUENG (*Coccinia grandis*) IN THAILAND

JARIYA NGAMWONG

CHIRAPAT KANNOK

THITINAN RUANGRONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด ISSR และความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงในประเทศไทย ISSR DNA fingerprints and genetic diversity of Tam-Leung (*Coccinia grandis*) in Thailand
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจริยา งามวงษ์ รหัสนักศึกษา 58050719 นางสาวจิรภัทร์ ขันนอก รหัสนักศึกษา 58050724 นางสาวฐิตินันท์ เรืองรอง รหัสนักศึกษา 58050742
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ กรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด ISSR และ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงในประเทศไทย

ชื่อนักศึกษา นางสาวจริยา งามวงษ์ รหัสนักศึกษา 58050719
นางสาวจิรภัทร์ ขันนอก รหัสนักศึกษา 58050724
นางสาวฐิตินันท์ เรืองรอง รหัสนักศึกษา 58050742

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2561
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

ตำลึง (*Coccinia grandis*) เป็นพืชที่มีการแพร่กระจายอยู่ในประเทศไทย เนื่องจากตำลึงเป็นพืชไม้เลื้อย สืบพันธุ์แบบผสมข้ามเพศทำให้ตำลึงแต่ละตัวอย่างอาจมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในระดับสูง โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคเครื่องหมาย ISSR ในการจัดกลุ่มและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตำลึงว่าดีเอ็นเอของตำลึงมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือแหล่งที่มาของตำลึงหรือไม่ โดยเก็บรวบรวมตำลึงทั่วประเทศไทยทั้งหมด 16 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเชิงคุณภาพ 3 ลักษณะ ได้แก่ ขอบใบ ผิวใบ และรูปร่างใบของตำลึง และการใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR 21 ไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 21 เส้น ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 211 ชิ้น มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 160 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 75.82% และมีค่าดัชนีความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.22 ถึง 0.48 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.35 เมื่อวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR โดยนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มตำลึงตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งแผนภูมินี้มีความสอดคล้องระดับปานกลางกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่มาของตำลึง ผลการทดลองจากโครงงานพิเศษนี้แสดงให้เห็นว่า การจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถสะท้อนให้เห็นว่าดีเอ็นเอของตำลึงมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่มาได้

คำสำคัญ : ตำลึง *Coccinia grandis*, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เฉพาะการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title ISSR DNA fingerprints and genetic diversity of Tam-Leung (*Coccinia grandis*) in Thailand

Students Miss Jariya Ngamwong Student ID 58050719
Miss Chirapat Kannok Student ID 58050724
Miss Thitinan Ruangrong Student ID 58050742

Degree Bachelor of Science

Department Biology

Faculty Science

University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2561

Advisor Asst.Prof.Dr.Chokchai Kittiwongwattana

Abstract

Coccinia grandis is a plant which spread abundantly in Thailand. It is a climber and heterogeneous sexual. Hence, the difference in heredity has a high level. The purposes of this special project were: 1) to examine the genetic diversity of *Coccinia grandis* by morphological and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) marker technique and 2) to cluster and analysis genetic relationship of *Coccinia grandis* that DNA was consistent with morphological characteristics or origin of the sample. A total of 11 samples were collected from many provinces in Thailand and 5 samples were collected from the market in Bangkok and Samut Prakan. All samples were analyzed using 21 ISSR primers and qualitative morphological analysis in 3 types; leaf edge, leaf surface, and leaf shape. The result of 21 ISSR primers produced a total of 211 bands, which 160 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 75.82% and dissimilarity index was between 0.22 to 0.48 with an average of 0.35. Using DNA fingerprint to create a phylogenetic tree in DARwin program version 6 with the UPGMA method and clustering in 4 groups. The phylogenetic tree had moderate consistency with morphological and origin of the sample. In conclusion, ISSR showed DNA of *Coccinia grandis* was consistent with morphological and origin of the sample.

Keywords : Ivy Gourd *Coccinia grandis*, Genetic diversity, DNA fingerprints, ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิด และเสนอแนวทางของการแก้ปัญหาต่างๆ ในระหว่างการทำโครงงานพิเศษ อีกทั้งยังตรวจทานโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ ด้วย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล และ ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ ประธานกรรมการ และ กรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาเพื่อให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่คอยอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ และให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ ขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้คำแนะนำต่างๆ รวมถึงให้กำลังใจตลอดการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยสนับสนุน ชี้แนะแนวทางที่ดี คอยช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งยังให้ความรักและกำลังใจเสมอมา

จริยา งามวงษ์
จิรภัทร์ ขันนอก
ฐิตินันท์ เรืองรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... ข

กิตติกรรมประกาศ .... ค

สารบัญ .... ง

สารบัญตาราง .... ฉ

สารบัญรูป .... ช

คำย่อ/สัญลักษณ์ .... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ลักษณะทั่วไปของตำลึง (*Coccinia grandis)* 3

2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic marker) 4

2.2.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) 4

2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) 5

2.3 เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) 5

2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 6

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 10

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา 10

3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิด ISSR 10

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง 11

3.4 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 12

3.5 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม 12

3.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR 13

3.7 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 14

3.8 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 15
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 15
4.2 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 23
4.3 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม 24
4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR 24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 33
5.1 สรุปผลการทดลอง 33
5.2 ข้อเสนอแนะ 33
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 59 เส้น 10
3.2 องค์ประกอบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR 13
3.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 13
4.1 ตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย 15
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง.. 21
4.3 ค่าความเข้มข้นและค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่างในเขตพื้นที่ประเทศไทย 23
4.4 ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่างในพื้นที่ประเทศไทย ใช้ไพรเมอร์ ISSR 21 เส้น 25
4.5 การจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR เทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่มาของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ดอกและผลของตำลึง 3

2.2 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่เข้าจับระหว่างบริเวณ SSR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
โดยใช้เทคนิค ISSR 6

4.1 แผนภูมิ phylogenetic tree ระหว่างตำลึงตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง
โดยใช้วิธี UPGMA 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
UBC	University of British Columbia
No.	Number
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
mM	Millimolar
µM	Micromolar
Kb	Kilobase
dNTP	Deoxynucleotides
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
ISSR	Inter-simple Sequence Repeat
TBE	Tris-Borate EDTA
$MgCl_2$	Magnesium chloride

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ตำลึง มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์คือ *Coccinia grandis* และจัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ตำลึงเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ตำลึงแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยมีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกัน เช่น ใบหยัก ใบรูปหัวใจ ขอบใบเรียบ ขอบใบลักษณะเป็นฟันเลื่อย ผิวใบเรียบ ลักษณะดอกเดี่ยว ลักษณะดอกเป็นกลุ่ม เป็นต้น ตำลึงเป็นพืชผสมข้ามทำให้การผสมพันธุ์ต้องอาศัยปัจจัยภายนอกเป็นตัวช่วยพาละอองเรณูจากดอกตำลึงเพศผู้ไปยังดอกตำลึงเพศเมีย จึงมีความเป็นไปได้ว่าตำลึงที่พบในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูง ความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม ซึ่งมีด้วยกัน 3 ประเภท ได้แก่ 1) เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) 2) เครื่องหมายทางชีวเคมี (Biochemical marker) และ 3) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับตำลึงและความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงในประเทศไทยค่อนข้างน้อย จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำตำลึงที่มีอยู่ในประเทศไทยมาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ลักษณะที่พบภายนอกของพืชเพื่อใช้จำแนกประเภทได้ เช่น ลักษณะของใบ ลักษณะของลำต้น เป็นต้น และอีกวิธีหนึ่งคือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างจากลำดับเบสซ้ำกันสายสั้นๆ เครื่องหมาย ISSR จะจับกับเบสคู่สมระหว่างบริเวณ Simple Sequence Repeat (SSR) ข้อดีของการใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR คือ ใช้ระยะเวลาในการทำสั้น ต้นทุนต่ำ และไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของพืชนั้นๆ ทำให้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการประยุกต์ใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นเพื่อจัดกลุ่มของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่างในแต่ละพื้นที่ในประเทศไทยว่า การจัดกลุ่มด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ISSR ในตำลึงสามารถสะท้อนถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่มาได้หรือไม่

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *C. grandis* โดยการใช้เครื่องหมาย ISSR

1.2.2 เพื่อจัดกลุ่มของ *C. grandis* ที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นจะได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากเจ้าของเอกสาร

1.2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่มาของตำลึง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เก็บรวบรวมตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่างในเขตพื้นที่ประเทศไทย ได้แก่ จ.นครนายก จ.ปทุมธานี จ.ลำปาง จ.กาญจนบุรี จ.ฉะเชิงเทรา จ.กรุงเทพมหานคร จ.เพชรบูรณ์ จ.ระยอง และ จ.สมุทรปราการ

1.3.2 สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์จัดกลุ่มตำลึงตัวอย่าง เพื่อสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม DARwin version 6

1.3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงที่ใช้วิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ ขอบใบ ผิวใบ รูปร่างใบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบตำลึงตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้และทราบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของตำลึง (*Coccinia gransdis*)

ตำลึง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Coccinia grandis* และจัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae มีต้นกำเนิดจากทวีปแอฟริกาและมีการแพร่กระจายไปยังทวีปต่างๆ ทั่วโลก เช่น ทวีปเอเชีย ทวีปอเมริกากลาง ทวีปอเมริกาใต้ ทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Reddy et al., 2009) ตำลึงเป็นพืชเถาล้มลุก มักขึ้นเองตามธรรมชาติ เถาตำลึงมีลักษณะกลม สีเขียว ตามข้อมีหนวดเอาไว้ยึดเกาะหลักหรือต้นไม้อื่นๆ ลำเถามีสีเขียวแตกกิ่งก้านสาขาออกไปมากมาย ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวออกสลับกันไปตามลำเถา ใบเป็นรูปห้าเหลี่ยม ฐานใบรูปหัวใจ ปลายใบแหลม ขอบใบเว้าเข้าเล็กน้อยแบบฟันเลื่อยตื้นๆ บางครั้งจะเว้ามากเป็นหยักเว้าห้าแฉก ใบสีเขียวเรียบไม่มีขน เส้นใบแยกจากโคนใบที่จุดเดียวกัน 5 ถึง 7 เส้น ใบกว้าง 3 ถึง 4 เซนติเมตร (ชาญชัย, 2552)

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ดอกและผลของตำลึง

ที่มา: บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน) (2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำลึงเป็นพืชผสมข้าม ดอกตำลึงเป็นแบบไม่สมบูรณ์เพศ (Chun et al., 2001) ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกจากบริเวณซอกใบ ดอกเพศผู้และเมียอยู่คนละต้นกัน ซึ่งสังเกตได้จากใบ ถ้าใบหยักมากจะเป็นต้นเพศผู้ ทั้งดอกเพศผู้และเมียมีลักษณะที่เหมือนกันคือ กลีบดอกสีขาว ทรงกระบอกหัวแฉก ปลายดอกแยกออกเป็นห้าแฉก โคนติดกันเป็นกรวย ดอกเพศผู้มีลักษณะเป็นดอกเดี่ยวหรืออาจอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ซึ่งแต่ละดอกมีเกสรตัวผู้ 3 อัน ดอกเพศเมียมีลักษณะเป็นดอกเดี่ยว มีเกสรตัวเมีย 1 อัน ผลตำลึงมีลักษณะรูปทรงรี ผลอ่อนมีสีเขียวและลายสีขาว เนื้อแข็งกรอบ นิยมนำมารับประทาน เมื่อผลสุกจะกลายเป็นสีแดงสด เนื้อมีสีแดง นิ่ม (Pekamwar et al., 2013 ; ชาญชัย, 2552) การขยายพันธุ์ตำลึงนั้นทำได้ 2 วิธี คือ เพาะเมล็ด และปักชำ ตำลึงเป็นพืชที่ปลูกได้ตลอดปี และมีคุณสมบัติทนแล้งทนฝนได้ดี ตำลึงมีชื่อเรียกอื่นๆ แตกต่างกันตามแต่ละภูมิภาค เช่น ภาคกลางเรียกว่า สี่บาท ภาคอีสานเรียกว่า ตำนิน ภาคเหนือเรียกว่า ผักแคบ เป็นต้น ตำลึงมีสรรพคุณทางยามากมาย ได้แก่ 1) ใบสามารถดับพิษร้อน ถอนพิษไข้ ถอนพิษของตำแย 2) ดอกใช้แก้อาการคัน 3) น้ำจากเถาตำลึงนำมาหยอดตาเพื่อแก้ตาฟาง ตาแดง ตาแฉะ 4) ราก ลดไข้ แก้อาเจียน 5) น้ำคั้นจากผลดิบ ช่วยลดน้ำตาลในเลือด เหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน 6) ใบและก้าน มีวิตามินเอและอีสูง ช่วยบำรุงสายตา (ระพีพรรณ, 2545 และ สุภัคภิรมย์, 2550)

2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Marker)

เครื่องหมายทางพันธุกรรมเป็นเครื่องหมายที่นำมาใช้ในการแยกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต โดยแยกความแตกต่างได้ทั้งฟีโนไทป์และจีโนไทป์ ซึ่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกรุ่นหลานได้ (ศุภมิตร, 2555) เครื่องหมายทางพันธุกรรมมี 3 ประเภท คือ 1) เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) 2) เครื่องหมายทางชีวเคมี (Biochemical marker) และ 3) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) (Payel et al., 2015) เครื่องหมายแต่ละประเภทมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันในการแยกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การเลือกใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับการทดลอง

2.2.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายที่ใช้แยกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตโดยการวิเคราะห์ลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะใบ ขนาดและรูปร่างของเมล็ด เป็นต้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะภายนอก (phenotype) ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า Singh and Parab (2015) กล่าวว่า การใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาสามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็วในการจำแนกความหลากหลายของพืช แต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดในการแยกความหลากหลายเนื่องจากลักษณะภายนอกที่สังเกตได้นั้นได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม เช่น สภาพภูมิอากาศ แร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธาตุอาหารในดิน ปริมาณแสงแดดที่พืชได้รับ เป็นต้น ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งคือเครื่องหมายชนิดนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมได้ (สุรีพร, 2546) นอกจากนี้การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตบางชนิดจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญที่มีความชำนาญในการวิเคราะห์เพื่อให้ผลที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำที่สุด

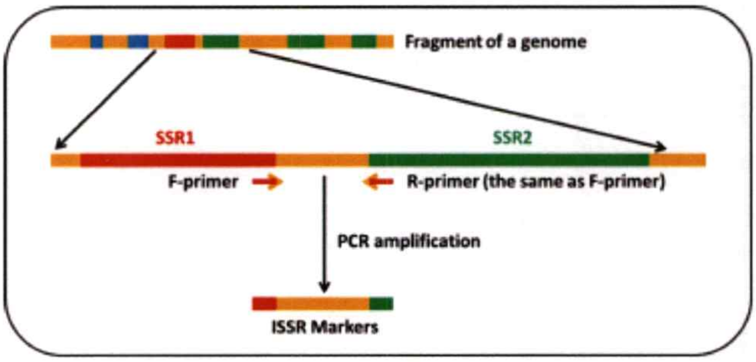
2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแยกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตซึ่งทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่มีลำดับเบสนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน (polymorphism) จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความหลากหลาย (สุรีพร, 2546) ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ละเอียดที่สุดโดยไม่มีการรบกวนจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ และยังสามารถแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ในระดับสูง (Ehsan et al., 2015) สามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ถูกเก็บไว้นานและตรวจสอบดีเอ็นเอในส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนได้ (สุรินทร์, 2552)

2.3 เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

เครื่องหมาย ISSR ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง Simple Sequence Repeat (SSR) 2 บริเวณซึ่งมีลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เหมือนกันแต่อยู่ในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากนี้บริเวณ SSR ต้องอยู่ใกล้กันเพียงพอเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ เมื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้ว นำดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอ และถ่ายภาพใต้แสงยูวี จะได้ภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอออกมา ในการวิเคราะห์รูปแบบของ ISSR นั้นทำได้โดยนับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ โดยตำแหน่งของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขึ้นแถบดีเอ็นเอให้แทนสัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ขึ้นแถบดีเอ็นเอให้แทนสัญลักษณ์เป็น “0” (สุรินทร์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่เข้าจับระหว่างบริเวณ SSR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค ISSR
ที่มา : Plant Molecular Biology Lab (2013)

ข้อดีของการใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำแล้วยังคงได้ผลคงเดิม เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่ยาวถึง 16-25 คู่เบส (Lakshmanan et al., 2007) ข้อดีอีกประการหนึ่งคือ ไม่ต้องทราบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่ขนาบข้างส่วนที่เป็นบริเวณซ้ำ แต่ข้อจำกัดคือ ISSR เป็นเครื่องหมายประเภท dominant marker (Reddy et al. 2002) จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygote กับ heterozygote ได้ นอกจากนี้เครื่องหมาย ISSR ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างเพื่อ 1) ทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) 2) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) ซึ่งเป็นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม 3) สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogeny) เป็นการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่มีประวัติของการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตในอดีตจนถึงปัจจุบัน และ 4) ชีววิทยาวิวัฒนาการ (evolutionary biology) คือ การศึกษากระบวนการวิวัฒนาการที่ได้สร้างความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตบนโลก (Reddy et al., 2009)

2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การแบ่งกลุ่มหรือการจัดกลุ่มต่างๆของพืชนั้นทำได้ยาก หากใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวเนื่องจากพืชมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เช่น สีของใบ สีของดอก ลักษณะใบ ลักษณะดอก เป็นต้น ซึ่งลักษณะข้างต้นไม่สามารถแยกความแตกต่างและนำมาจัดกลุ่มพืชได้อย่างชัดเจน เนื่องจากลักษณะดังกล่าวเป็นปัจจัยภายนอกที่สามารถแปรผันตามสภาพแวดล้อมได้ง่ายส่งผลให้การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้ผลที่ไม่ถูกต้องในบางกรณี เช่นงานวิจัยของ Warnakula et al. (2017) ประเมินหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ป่า 3 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับมะละกอพันธุ์ปลูก 18 ตัวอย่างในประเทศศรีลังกา โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ผลการทดลองพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรกมีมะละกอพันธุ์ป่าทั้ง 3 ตัวอย่าง และมีมะละกอพันธุ์ปลูกรวมอยู่ด้วยอีก 3 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่า มะละกอพันธุ์ปลูกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางส่วนคล้ายกับมะละกอพันธุ์ป่า และกลุ่มที่สองเป็นการรวมกลุ่มของมะละกอพันธุ์ปลูกอีก 15 ตัวอย่าง ในขณะเดียวกัน การใช้เครื่องหมาย SSR และ ISSR นั้นเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่เช่นเดียวกัน กลุ่มแรกนั้นประกอบไปด้วยมะละกอพันธุ์ปลูกทั้งหมด 18 ตัวอย่าง และกลุ่มที่สองประกอบไปด้วยมะละกอพันธุ์ป่าทั้งหมด 3 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณากลุ่มแรกนั้นพบว่ามะละกอพันธุ์ปลูก 3 ตัวอย่างที่มีแหล่งที่มาต่างกันจากจังหวัด Kurunagala ในประเทศศรีลังกา ถูกจัดแยกเป็นอีกกลุ่มย่อยหนึ่ง ซึ่งการจัดกลุ่มย่อยนี้ไม่พบในการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แสดงให้เห็นว่า การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่มีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มระหว่างมะละกอพันธุ์ป่าและมะละกอพันธุ์ปลูก ดังนั้นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เพื่อช่วยในการจัดกลุ่มพืชให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น โดยนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชนิดนั้นมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดรแกรมด้วยวิธี UPGMA แผนภูมิที่ได้มีลักษณะแยกเป็นเส้นสาย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของพืช

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึง เช่น งานวิจัยของ Singh and Parab (2015) ที่วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงตัวอย่างต่างๆที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศอินเดีย จำนวน 30 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมาย ISSR ผลการทดลองพบว่า การใช้เครื่องหมาย ISSR สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 204 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวน 105 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 51.38% ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดระหว่าง 300 ถึง 1,500 คู่เบส และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.4 ชิ้น เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ phylogenetic analysis โดยใช้วิธี UPGMA พบว่า ตำลึงตัวอย่างถูกจัดเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR สามารถแบ่งกลุ่มตำลึงตัวอย่างสอดคล้องกับสภาพแวดล้อมและแหล่งที่อยู่อาศัยของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งโดย Payel et al. (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงและพืชวงศ์ Cucurbitaceae ชนิดอื่นอีก 7 ชนิด โดยใช้เครื่องหมาย ISSR ผลการทดลองพบว่าจากไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 20 เส้น มีไพรเมอร์ 5 เส้น ที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนและได้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 117 ชิ้น จากชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด มี 57 ชิ้นที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 48.72% ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ระหว่าง 100 ถึง 1,400 คู่เบส และค่าเฉลี่ยของชิ้นดีเอ็นเอต่อ 1 ไพรเมอร์ มีค่าเท่ากับ 23 ชิ้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ phylogenetic analysis พบว่า ตำลึงมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับแตงกวา (*Cucumis sativas*)

เครื่องหมาย ISSR ยังถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดอื่นๆด้วย เช่น การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะระขี้นกในประเทศอินเดียในงานวิจัยของ Singh et al. (2007) ซึ่งเก็บรวบรวมตัวอย่างของมะระขี้นกที่ได้จากพื้นที่ที่แตกต่างกัน จำนวน 38 ตัวอย่าง ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR 15 เส้น ผลการทดลองพบว่า ได้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 125 ชิ้น จากชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดมีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย 94 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอคิดเป็น 74.75% ค่าเฉลี่ยของจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ 1 เส้นมีค่าเท่ากับ 6.27 ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 150 ถึง 2,700 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า Marker Index (MI) สัมพันธ์กับค่า PIC คือ เมื่อค่า PIC มีค่าสูง ค่า MI จะมีค่าสูงขึ้นเช่นกัน เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard และใช้วิธีการ UPGMA ในการวิเคราะห์แผนภาพเดนโดแกรมแล้ว พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ซึ่งรูปแบบของการจัดกลุ่มที่ได้นั้นไม่สอดคล้องกับการกระจายทางภูมิศาสตร์

งานวิจัยของ Esmailnia et al. (2015) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ Cucurbitaceae จำนวน 30 ชนิดในประเทศอิหร่านโดยใช้เครื่องหมาย ISSR ผลการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 17 เส้น มีไพรเมอร์ ISSR 11 เส้น ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพและทำซ้ำแล้วให้ผลดังเดิม ซึ่งให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 283 ชิ้น ชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างพืชตัวอย่างจำนวน 263 ชิ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 92.93% และค่าเฉลี่ยของ PIC อยู่ที่ประมาณ 0.327 ต่อไพรเมอร์ 1 เส้น การจัดกลุ่มโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดแกรมโดยใช้วิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มของพืชวงศ์ Cucurbitacae ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม และผลการจัดกลุ่มตัวอย่างแสดงให้เห็นถึงความแปรผันทางพันธุกรรมที่หลากหลายของพืชสกุล *Cucumis* และ *Cucurbita* ในประเทศอิหร่าน ผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าเทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถนำมาใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างเพื่อใช้จัดกลุ่มให้สอดคล้องกับชนิดของพืชตัวอย่างได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชวงศ์แตง 3 ชนิด จำนวน 14 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR ในงานวิจัยของ Heikal et al. (2008) ผลการทดลองพบว่า ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RAPD 6 เส้น ได้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 463 ชิ้น และมีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายจำนวน 405 ชิ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย 87.5% และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR 7 เส้น ได้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 263 ชิ้น จากชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดมีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายจำนวน 243 ชิ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย 92.4% เมื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในพืชชนิดนั้นๆ พบว่า *C. pepo* มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 168 ชิ้น พบชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย 155 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายคิดเป็น 92.3% *C. maxima* มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 77 ชิ้น ชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายมีจำนวน 70 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายคิดเป็น 90.9% และ *C. moschata* มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 18 ชิ้น และชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดแตกต่างกัน เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายคิดเป็น 100% เมื่อนำข้อมูลที่รวบรวมได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกัน แสดงให้เห็นว่า *C. pepo* ทั้ง 9 ตัวอย่างไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันถึงแม้ว่ามีลักษณะจีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกัน ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า *C. pepo* นั้นมีความหลากหลายในระดับพันธุกรรม และ พบว่า *C. maxima* ทั้ง 4 ตัวอย่างมีการแปรผันในระดับพันธุกรรมเช่นกัน

เครื่องหมาย ISSR ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของแตงโมในงานวิจัยของ Dje et al. (2010) ซึ่งเก็บรวบรวมแตงโมจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน 4 พื้นที่ในทวีปแอฟริกา ได้แก่ บริเวณสภาพภูมิอากาศทุ่งหญ้าสะวันนา 2 บริเวณในประเทศโกตดิวัวร์ ซึ่งเป็นภูมิภาคที่มีปริมาณน้ำฝนปานกลาง (1200-1400 มม.) ลักษณะเป็นดินปนทราย และ พื้นที่ป่าไม้ที่มีปริมาณน้ำฝนสูง 2 บริเวณ ซึ่งเป็นบริเวณที่ดินร่วนอุดมไปด้วยอินทรียวัตถุ บริเวณละ 20 เมล็ด รวมจำนวนทั้งหมด 80 เมล็ด และนำมาปลูกในโรงเรือน ทดสอบด้วยไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 20 เส้น ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า ได้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 258 ชิ้น และชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายระหว่างแตงโมตัวอย่างจำนวน 252 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายคิดเป็น 97.67% ค่าเฉลี่ยของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 12.9 ชิ้นต่อไพร์เมอร์ 1 เส้น และค่าเฉลี่ยของ PIC มีค่าประมาณ 0.18 ต่อไพรเมอร์ 1 เส้น ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดแกรมด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 3 กลุ่มนี้ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR มีความรวดเร็ว สามารถทำซ้ำโดยให้ผลคงเดิม สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและแสดงความหลากหลายของแตงโมได้ ดังนั้นเทคนิคเครื่องหมาย ISSR จึงเป็นอีกเทคโนโลยีหนึ่งที่มีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้กับแตงโมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

เก็บรวบรวมตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ในเขตพื้นที่ประเทศไทย ได้แก่ จ.นครนายก จ.ปทุมธานี จ.ลำปาง จ.กาญจนบุรี จ.ฉะเชิงเทรา จ.กรุงเทพมหานคร จ.เพชรบูรณ์ จ.ระยอง และ จ.สมุทรปราการ โดยแบ่งการเก็บรวบรวมตำลึงตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) ตำลึงที่เก็บมาจากธรรมชาติ 11 ตัวอย่าง และ 2) ตำลึงที่มาจากตลาด 5 ตัวอย่าง

3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิด ISSR

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 59 ไพรเมอร์ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจาก UBC Primer Set no.9 (Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Canada) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 59 เส้น

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶3')	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶3')
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	UBC819	GTG TGT GTG TGT GTG TA
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	UBC820	GTG TGT GTG TGT GTG TC
UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	UBC821	GTG TGT GTG TGT GTG TT
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	UBC828	TGT GTG TGT GTG TGT GA
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	UBC829	TGT GTG TGT GTG TGT GC
UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	UBC830	TGT GTG TGT GTG TGT GG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶3')	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶3')
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GTT	UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CTT
UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GTC	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CTA
UBC836	AGA GAG AGA GAG AGA GTA	UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CTG
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG ATT	UBC858	TGT GTG TGT GTG TGT GTT
UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG ATC	UBC859	TGT GTG TGT GTG TGT GTC
UBC842	GAG AGA GAG AGA GAG ATG	UBC860	TGT GTG TGT GTG TGT GTA
UBC843	CTC TCT CTC TCT CTC TTA	UBC861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TTC	UBC862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
UBC845	CTC TCT CTC TCT CTC TTG	UBC866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC846	CAC ACA CAC ACA CAC ATT	UBC870	TGC TGC TGC TGC TGC TGC
UBC847	CAC ACA CAC ACA CAC ATC	UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A
UBC848	CAC ACA CAC ACA CAC ATG	UBC874	CCC TCC CTC CCT CCC T
UBC849	GTG TGT GTG TGT GTG TTA	UBC875	CTA GCT AGC TAG CTA G
UBC850	GTG TGT GTG TGT GTG TTC	UBC877	TGC ATG CAT GCA TGC A
UBC851	GTG TGT GTG TGT GTG TTG	UBC878	GGA TGG ATG GAT GGA T
UBC852	TCT CTC TCT CTC TCT CTA	UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC853	TCT CTC TCT CTC TCT CTT	UBC881	GGG TGG GGT GGG GTG
UBC854	TCT CTC TCT CTC TCT CTG		

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง

นำใบพืชมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit โดยตัดใบตำลึงตัวอย่างเพศเมียเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักให้ได้ ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 2 มิลลิลิตร เทไนโตรเจนเหลวลงไปให้ท่วม บดใบพืชให้เป็นผงละเอียด เติม FAPG1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงไปทันที ปล่อยให้ละลายแล้วเติม RNase A ปริมาตร 8 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในระหว่างที่บ่ม ให้กลับหลอดทดลองไปมา 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม FAPG2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวาง Filter column ใน Collection tube ใส่สารผสมลงไปใน Filter column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที ย้าย Lysate ใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้ง Filter column และ Collection tube จากนั้นเติม FAPG3 buffer ปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lysate ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายขึ้นลง จากนั้นวาง FAPG column ใน Collection tube ใหม่ ใส่สารผสมลงไปใน FAPG column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้ววาง FAPG column ลง Collection tube เดิม เติม Wash Buffer W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใน FAPG column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้ววาง FAPG column ลง Collection tube เดิม เติม Wash Buffer W2 ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใน FAPG column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้ววาง FAPG column ลง Collection tube เดิม และเติม Wash Buffer W2 ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อปั่นให้สารละลายออกจาก FAPG column ให้หมด จากนั้นนำ FAPG column ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่นกรองของ FAPG column วางทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

3.4 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะต้องไม่มีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอหรือโปรตีน และชิ้นดีเอ็นเอไม่มีการแตกหัก วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากใบพืช ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ดีเอ็นเอที่ดีควรมีค่าความเข้มข้นตั้งแต่ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ขึ้นไป และค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ควรอยู่ระหว่าง 1.8 ถึง 2.0 จากนั้นเตรียมสารละลายดีเอ็นเอโดยเจือจางด้วย Sterilized Milli-Q Water ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.5 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

นำ UBC Primer Set ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ แล้วใช้วิธีการรวมดีเอ็นเอของตำลึงเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR-PCR โดยเตรียมองค์ประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
1. Water	5.95
2. 10X buffer	1.0
3. 2 mM dNTP	1.0
4. 25 µM $MgCl_2$	0.5
5. 5 µM Primer	0.5
6. DNA polymerase	0.05
7. DNA template	1.00
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00

ผสมส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร และปั่นในเครื่อง Spin Down เพื่อให้สารผสมตกมาอยู่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal Cycler ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาในแต่ละขั้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	50	45 วินาที	40
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Final Extension	72	20 นาที	1

และทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส การคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะนำไปใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอควรเป็นไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน

3.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

หลังจากคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้แล้ว จึงนำไพรเมอร์เหล่านั้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตำลึงโดยการทำปฏิกิริยา PCR แสดงในตารางที่ 3.2 ของขั้นตอนการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากนั้นผสมส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร และปั่นในเครื่อง Spin

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Down เพื่อให้สารผสมตกมาอยู่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal Cycler ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน แสดงในตารางที่ 3.3 ของขั้นตอนการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

3.7 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ชั่งผงอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.15 กรัม หรือ 0.3 กรัม นำมาละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หรือ 20 มิลลิลิตร ด้วยไมโครเวฟ เมื่อผงอะกาโรสละลายหมดแล้ว ทิ้งไว้ให้พออุ่นจึงใส่สีย้อมเจล NEO green ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรต่อเจล 10 มิลลิลิตรหรือ 1 ไมโครลิตรต่อเจล 20 มิลลิลิตร เทเจลลงในถาดเจลแล้วเสียบหวีเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ วางถาดเจลไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อแผ่นเจลแข็งตัวให้ดึงหวีออกแล้วนำถาดเจลใส่ลงใน Electrophoresis Chamber ที่มี 1X TBE buffer นำดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (loading dye) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยอดลงไปในหลุมเจล และนำ DNA Marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงไปในหลุมแรกของเจล จากนั้นต่อ Electrophoresis Chamber เข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า ปล่อยกระแสไฟฟ้าจากตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ต่อเจล 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หรือ 130 โวลต์ต่อเจล 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.8 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

นับชิ้นดีเอ็นเอแล้วให้คะแนนในระบบ 1 และ 0 คือ เมื่อปรากฏชิ้นดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และเมื่อไม่ปรากฏชิ้นดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ในโปรแกรม DARwin version 6 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บรวบรวมตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ในเขตพื้นที่ประเทศไทย ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) ตำลึงที่เก็บมาจากธรรมชาติ 11 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5, TLG6, TLG7, TLG8, TLG9, TLG10, TLG11 และ 2) ตำลึงที่มาจากตลาด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ TLGM12, TLGM13, TLGM14, TLGM15, TLGM16 ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย

ตัวอย่าง	ลักษณะลำต้นและใบของตำลึง	พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง
TLG1		ต.บึงศาล อ.องครักษ์ จ.นครนายก 14°01'35.2"N 100°54'54.0"E
TLG2		ต.คูคต อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี 13°57'06.7"N 100°39'29.8"E

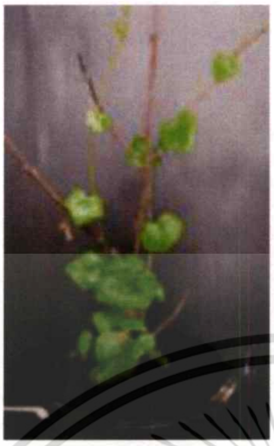
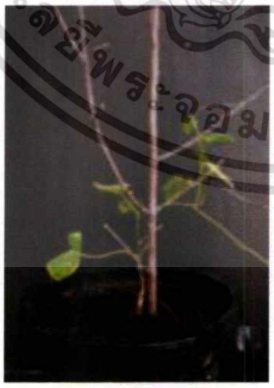
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ลักษณะลำต้นและใบของตำลึง	พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง
TLG3		ต.ลาดหญ้า อ.เมืองกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี 14°05‘59.8"N 99°24’52.4"E
TLG4		ต.เขาดิน อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา 13°32'31.9"N 101°00'23.9"E
TLG5		แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา จ.กรุงเทพ 3°54'04.9"N 100°44'29.2"E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ลักษณะลำต้นและใบของตำลึง	พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง
TLG6		ต.เวียงเหนือ อ.เมืองลำปาง จ.ลำปาง 18°17'41.7"N 99°30'13.0"E
TLG7		ต.บุญนาคพัฒนา อ.เมืองลำปาง จ.ลำปาง 18°23'34.9"N 99°35'43.6"E
TLG8		ต.สะเดาะพง อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ 16°34'37.2"N 100°57'43.9"E

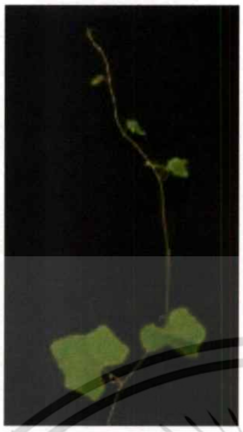
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ลักษณะลำต้นและใบของตำลึง	พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง
TLG9		ต.มะขามคู่ อ.นิคมพัฒนา จ.ระยอง 12°49'54.8"N 101°04'01.2"E
TLG10		แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ 13°43'32.2"N 100°47'14.7"E
TLG11		ต.บึงคำพร้อย อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี 13°56'27.8"N 100°44'05.1"E

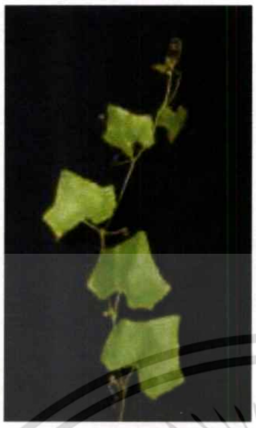
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ลักษณะลำต้นและใบของตำลึง	พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง
TLGM12		แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ 13°43'21.4"N 100°47'19.4"E
TLGM13		ต.บางพลีใหญ่ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 13°38'04.2"N 100°42'38.2"E
TLGM14		แขวงทับยาว เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ 13°43'15.0"N 100°47'43.9"E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ลักษณะลำต้นและใบของตำลึง	พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง
TLGM15		ต.บางพลีใหญ่ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 13°38'07.0"N 100°42'36.3"E
TLGM16		แขวงลำปลาทิว เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพ 13°45'24.1"N 100°47'52.8"E

เมื่อนำตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวิเคราะห์จากลักษณะใบ ได้แก่ ขอบใบ ผิวใบ รูปร่างใบ ได้ข้อมูลดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา		
	ขอบใบ	ผิวใบ	รูปร่างใบ
TLG1	เรียบ	เรียบ	รูปหัวใจ
TLG2	เรียบ	เรียบ	รูปหัวใจ
TLG3	เรียบ	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม
TLG4	เรียบ	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม
TLG5	เรียบ	เรียบ	ห้าเหลี่ยม
TLG6	เรียบ	เรียบ	ห้าเหลี่ยม
TLG7	เลื่อย	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม
TLG8	เรียบ	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม
TLG9	เลื่อย	เรียบ	ห้าเหลี่ยม
TLG10	เรียบ	เรียบ	ห้าเหลี่ยม
TLG11	เรียบ	ขรุขระ	รูปหัวใจ
TLGM12	เลื่อย	เรียบ	ห้าเหลี่ยม
TLGM13	เรียบ	เรียบ	รูปหัวใจ
TLGM14	เรียบ	เรียบ	ห้าเหลี่ยม
TLGM15	เลื่อย	เรียบ	ห้าเหลี่ยม
TLGM16	เลื่อย	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม

จากตารางที่ 4.2 พบว่า การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ได้แก่ ขอบใบ ผิวใบ รูปร่างใบ มีความแปรผันทางพันธุกรรม เนื่องจากสามารถคัดแยกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงตัวอย่างได้อย่างชัดเจน เช่น ลักษณะที่ 1 ขอบใบ แบ่งได้เป็น ขอบใบเรียบ ขอบใบเลื่อย โดยตำลึงที่มีขอบใบเรียบมี 11 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5, TLG6, TLG8, TLG10, TLG11, TLGM13 และ TLGM14 ตำลึงที่มีขอบใบเลื่อยมี 5 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG7, TLG9, TLGM12, TLGM15 และ TLGM16 ลักษณะที่ 2 ผิวใบ แบ่งได้เป็น ผิวใบเรียบ ผิวใบขรุขระ โดยตำลึงที่มีผิวใบเรียบมี 10 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG1, TLG2, TLG5, TLG6, TLG9, TLG10, TLGM12, TlGM13, TLGM14 และ TLGM15 ตำลึงที่มีผิวใบขรุขระมี 6 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG3, TLG4, TLG7, TLG8, TLG11 และ TLGM16 ลักษณะที่ 3 รูปร่างใบ แบ่งได้เป็น รูปหัวใจ รูปห้าเหลี่ยม โดยตำลึงที่มีรูปร่างใบเป็นรูปหัวใจมี 4 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG1, TLG2,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับเอกสารใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TLG11 และ TLGM13 ตำลึงที่มีรูปร่างใบเป็นรูปห้าเหลี่ยมมี 12 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG3, TLG4, TLG5, TLG6, TLG7, TLG8, TLG9, TLG10, TLGM12, TLGM14, TLGM15 และ TLGM16 เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 3 ลักษณะ มาวิเคราะห์จัดกลุ่มร่วมกันจะแบ่งกลุ่มได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเลื่อย ผิวใบขรุขระ ใบห้าเหลี่ยม มี 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง TLG7, TLGM16 กลุ่มที่ 2 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเลื่อย ผิวใบเรียบ ใบห้าเหลี่ยม มี 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง TLG9, TLGM12, TLGM15 กลุ่มที่ 3 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบ ใบห้าเหลี่ยม มี 4 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง TLG5, TLG6, TLG10, TLGM14 กลุ่มที่ 4 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบ ใบรูปหัวใจ มี 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง TLG1, TLG2, TLGM13 กลุ่มที่ 5 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบขรุขระ ใบรูปหัวใจ มี 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง TLG11 กลุ่มที่ 6 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบขรุขระ ใบห้าเหลี่ยม มี 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง TLG3, TLG4, TLG8

จากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 3 ลักษณะ พบว่า ผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Singh and Parab (2015) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงจำนวน 30 ตัวอย่าง ในประเทศอินเดีย โดยใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 18 ลักษณะ ซึ่งแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน คือ การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ โดยวิเคราะห์จากน้ำหนักผล, ความยาวก้านดอก, ความยาวผล, เส้นรอบวง, ความยาวและความกว้างของเมล็ด, น้ำหนักเมล็ด, ความยาวใบ, ความกว้างใบ, ความยาวก้านใบ และการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพ โดยวิเคราะห์จากรูปร่างผล, เนื้อผล, สีผล, เส้นใบ, สีและรูปร่างของเมล็ด, รูปร่างใบ, ขอบใบ, สีใบ, เนื้อใบ จะเห็นว่า สามารถจัดกลุ่มตำลึงทั้งหมด 30 ตัวอย่างเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตำลึงพันธุ์ปลูก และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มตำลึงพันธุ์ต่างถิ่นรวมกับตำลึงพันธุ์ป่า ซึ่งการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดกลุ่มตำลึงพันธุ์ปลูกแยกออกจากตำลึงพันธุ์ต่างถิ่นและตำลึงพันธุ์ป่าได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้ที่ศึกษาจากลักษณะของใบเพียงอย่างเดียว พบว่า สามารถจัดกลุ่มตำลึงตัวอย่างได้ 6 กลุ่ม โดยตำลึงตัวอย่างที่เก็บได้จากตลาดไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน จะเห็นว่า ในโครงงานพิเศษนี้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาน้อยเกินไปในการจัดกลุ่มพืชตัวอย่างทำให้การจัดกลุ่มพืชตัวอย่างนั้นไม่มีความน่าเชื่อถือ ตรงกันข้ามกับงานวิจัยที่นำมาเปรียบเทียบนั้นใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณอย่างละเอียดและครอบคลุม ทั้งยังมีการวิเคราะห์ทางสถิติ เช่น ค่าเฉลี่ยความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าความแปรปรวน เป็นต้น ซึ่งค่าการวิเคราะห์ทางสถิติเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงแต่ละตัวอย่างนั้นมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง ในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่ละเอียดและครอบคลุมเพื่อให้ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการจัดกลุ่มพืชตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบตำลึงด้วยชุด FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบหาค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000c โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.3 พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 48.9 ถึง 179.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 1.40 ถึง 1.89 โดยดีเอ็นเอของตำลึงตัวอย่าง TLG6 และ TLG7 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.40 และ 1.75 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอของตำลึงทั้งสองตัวอย่างมีการปนเปื้อนของโปรตีน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมนั้นควรอยู่ในช่วง 1.8 ถึง 2.0 บ่งบอกว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนของโปรตีนต่ำและดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปใช้ จากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพด้วยการทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี ได้ชิ้นดีเอ็นเอชัดเจน

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นและค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ในเขตพื้นที่ประเทศไทย

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280})
TLG1	50.5	1.87
TLG2	108.7	1.87
TLG3	48.9	1.86
TLG4	67.2	1.89
TLG5	97.0	1.85
TLG6	179.6	1.40
TLG7	62.7	1.75
TLG8	51.9	1.86
TLG9	56.7	1.87
TLG10	124.1	1.86
TLG11	72.8	1.91
TLGM12	137.3	1.86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280})
TLGM13	277.1	1.84
TLGM14	69.5	1.80
TLGM15	149.0	1.85
TLGM16	186.8	1.85

4.3 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 59 เส้น โดยนำดีเอ็นเอของตำลึงที่รวมเข้าด้วยกันไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR-PCR จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามีไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 21 เส้น ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่ให้ชิ้นดีเอ็นเอมาก โดยมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเออยู่ในช่วง 5 ถึง 14 ชิ้น จากนั้นนำมาใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างเพื่อใช้จัดกลุ่ม ได้แก่ UBC811, UBC812, UBC815, UBC817, UBC818, UBC823, UBC824, UBC825, UBC826, UBC828, UBC830, UBC834, UBC835, UBC836, UBC841, UBC842, UBC844, UBC845, UBC849, UBC859, UBC881 โดยไพรเมอร์ UBC881 เป็นไพรเมอร์ที่ให้ชิ้นดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 14 ชิ้น และไพรเมอร์ UBC815 เป็นไพรเมอร์ที่ให้ชิ้นดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 5 ชิ้น

4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR

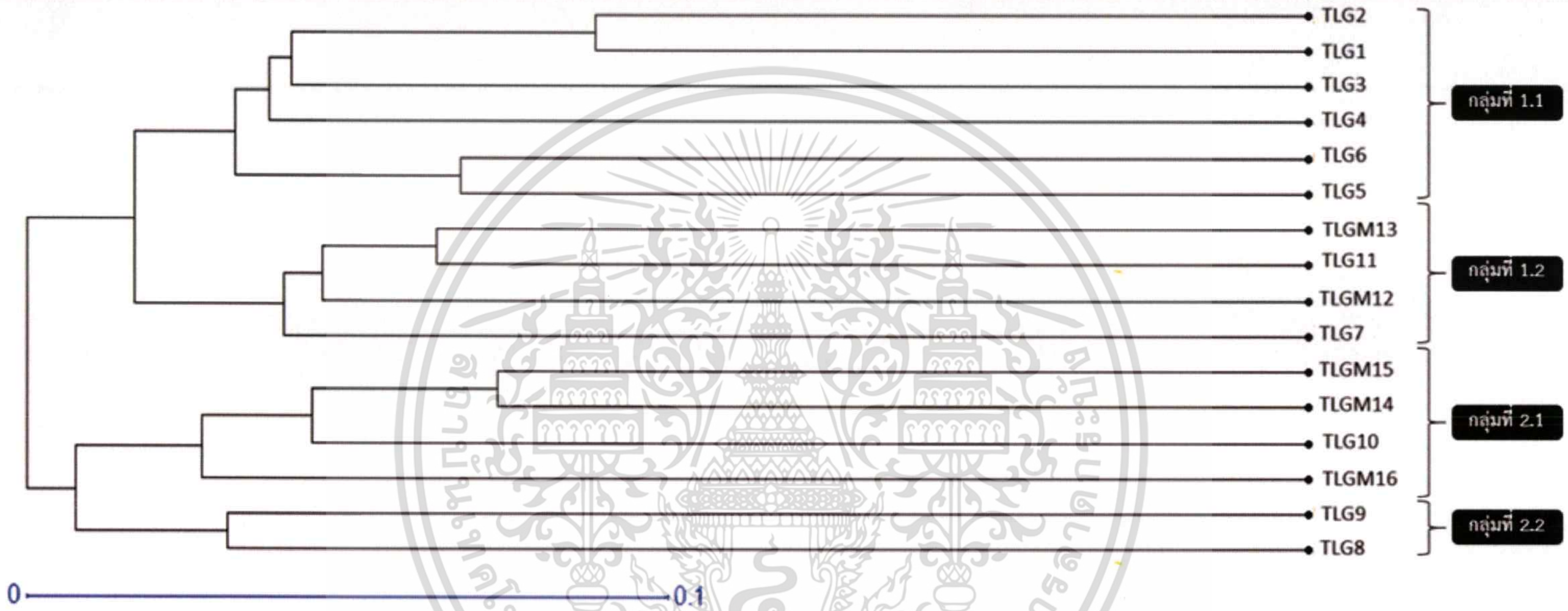
ตำลึงตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศไทยทั้งหมด 16 ตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 21 เส้น ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 21 เส้น ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 211 ชิ้น มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 160 ชิ้น และมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 75.82%

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตำลึงตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA ผ่านโปรแกรม DARwin version 6 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของ Jaccard ในการสร้างตารางค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมของตำลึงดังตารางที่ 4.4 และสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ดังรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ในพื้นที่ประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR 21 เส้น

ตัวอย่าง	TLG1	TLG2	TLG3	TLG4	TLG5	TLG6	TLG7	TLG8	TLG9	TLG10	TLG11	TLGM12	TLGM13	TLGM14	TLGM15
TLG2	0.221429														
TLG3	0.351351	0.280576													
TLG4	0.342466	0.307143	0.318841												
TLG5	0.331126	0.342282	0.353741	0.309859											
TLG6	0.305732	0.305195	0.369427	0.350649	0.263158										
TLG7	0.337748	0.360000	0.435065	0.351724	0.403846	0.303226									
TLG8	0.448052	0.42953	0.463087	0.378571	0.409396	0.401274	0.34965								
TLG9	0.391892	0.414966	0.438356	0.350365	0.426667	0.397436	0.34507	0.335821							
TLG10	0.376623	0.409091	0.461538	0.391892	0.368421	0.372671	0.396104	0.368056	0.375000						
TLG11	0.380645	0.360000	0.445161	0.363014	0.424051	0.345912	0.312925	0.383562	0.401361	0.342282					
TLGM12	0.328947	0.294521	0.405229	0.353741	0.363636	0.305732	0.315436	0.406667	0.402685	0.344371	0.292517				
TLGM13	0.384615	0.364238	0.43871	0.389262	0.417722	0.350000	0.328859	0.365517	0.416107	0.368421	0.270833	0.320000			
TLGM14	0.324138	0.28777	0.370629	0.301471	0.337931	0.333333	0.344828	0.359712	0.366906	0.304965	0.356164	0.324138	0.326389		
TLGM15	0.356164	0.356643	0.435374	0.394366	0.358621	0.320000	0.319149	0.333333	0.340741	0.314286	0.365517	0.297872	0.358621	0.251908	
TLGM16	0.446667	0.438356	0.482993	0.443662	0.460000	0.43949	0.413793	0.431655	0.427536	0.352518	0.402778	0.414966	0.350000	0.355556	0.315385



รูปที่ 4.1 แผนภูมิ phylogenetic tree ระหว่างตำลึงตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี UPGMA

จากตารางที่ 4.4 พบว่า ตำลึงตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.22 ถึง 0.48 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.35 เมื่อวิเคราะห์ค่าดัชนีความแตกต่าง พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตำลึงตัวอย่าง TLG1 กับ TLG2 มีค่าดัชนีความแตกต่างต่ำที่สุด คือ 0.221429 แสดงให้เห็นว่า ตำลึงตัวอย่าง TLG1 กับ TLG2 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูงที่สุด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตำลึงตัวอย่าง TLG3 กับ TLGM16 มีค่าดัชนีความแตกต่างสูงที่สุด คือ 0.482993 แสดงให้เห็นว่า ตำลึงตัวอย่าง TLG3 กับ TLG2 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมต่ำที่สุด

จากรูปที่ 4.1 แผนภูมินี้สามารถจัดกลุ่มตำลึงตัวอย่าง 16 ตัวอย่าง ได้โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มใหญ่ที่ 1 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ 1.1 ประกอบไปด้วยตำลึง 6 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5 และ TLG6 กลุ่มที่ 1.2 ประกอบไปด้วยตำลึง 4 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG7, TLG11, TLGM12 และ TLGM13 กลุ่มใหญ่ที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ 2.1 ประกอบไปด้วยตำลึง 4 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG10, TLGM14, TLGM15 และ TLGM16 กลุ่มที่ 2.2 ประกอบไปด้วยตำลึง 2 ตัวอย่าง ได้แก่ TLG8 และ TLG9

เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยา แหล่งที่มา และการจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR ของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกันจะได้ข้อมูลรวม ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR เทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่มาของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง

กลุ่ม ISSR	ตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			แหล่งที่มา
		ขอบใบ	ผิวใบ	รูปร่างใบ	
1.1	TLG1	เรียบ	เรียบ	รูปหัวใจ	ต.บึงศาล อ.องครักษ์ จ.นครนายก 14°01'35.2"N100°54'54.0"E
	TLG2	เรียบ	เรียบ	รูปหัวใจ	ต.คูคต อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี 13°57'06.7"N 100°39'29.8"E
	TLG3	เรียบ	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม	ต.ลาดหญ้า อ.เมืองกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี 14°05‘59.8"N 99°24’52.4"E
	TLG4	เรียบ	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม	ต.เขาดิน อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา 13°32'31.9"N 101°00'23.9"E
	TLG5	เรียบ	เรียบ	ห้าเหลี่ยม	แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา จ.กรุงเทพ 13°54'04.9"N 100°44'29.2"E
	TLG6	เรียบ	เรียบ	ห้าเหลี่ยม	ต.เวียงเหนือ อ.เมืองลำปาง จ.ลำปาง 18°17'41.7"N 99°30'13.0"E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

กลุ่ม ISSR	ตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			แหล่งที่มา
		ขอบใบ	ผิวใบ	รูปร่างใบ	
1.2	TLG7	เลื่อย	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม	ต.บุญนาคพัฒนา อ.เมืองลำปาง จ.ลำปาง 18°23'34.9"N 99°35'43.6"E
	TLG11	เรียบ	ขรุขระ	รูปหัวใจ	ต.บึงคำพร้อย อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี 13°56'27.8"N 100°44'05.1"E
	TLGM12	เลื่อย	เรียบ	ห้าเหลี่ยม	แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ 13°43'21.4"N 100°47'19.4"E
	TLGM13	เรียบ	เรียบ	รูปหัวใจ	ต.บางพลีใหญ่ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 13°38'04.2"N 100°42'38.2"E
2.1	TLG10	เรียบ	เรียบ	ห้าเหลี่ยม	แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ 13°43'32.2"N 100°47'14.7"E
	TLGM14	เรียบ	ขรุขระ	รูปหัวใจ	แขวงทับยาว เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ 13°43'15.0"N 100°47'43.9"E
	TLGM15	เลื่อย	เรียบ	ห้าเหลี่ยม	ต.บางพลีใหญ่ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 13°38'07.0"N 100°42'36.3"E
	TLGM16	เรียบ	เรียบ	รูปหัวใจ	แขวงลำปลาทิว เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพ 13°45'24.1"N100°47'52.8"E
2.2	TLG8	เรียบ	ขรุขระ	ห้าเหลี่ยม	ต.สะเดาะพง อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ 16°34'37.2"N 100°57'43.9"E
	TLG9	เลื่อย	เรียบ	ห้าเหลี่ยม	ต.มะขามคู่ อ.นิคมพัฒนา จ.ระยอง 12°49'54.8"N 101°04'01.2"E

จากตารางที่ 4.5 เป็นการแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตำลึงด้วยการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree จากข้อมูล ISSR โดยแบ่งตำลึงตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า ในกลุ่ม 1.1 ประกอบด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5 และ TLG6 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน คือ ขอบใบเรียบ แต่มีผิวใบและรูปร่างใบแตกต่างกัน คือ ผิวใบ มีทั้งเรียบและขรุขระ รูปร่างใบ มีทั้งรูปหัวใจและห้าเหลี่ยม ในกลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG7, TLG11, TLGM12 และ TLGM13 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน คือ ขอบใบ มีทั้งเรียบและขรุขระ ผิวใบ มีทั้งเรียบและขรุขระ รูปร่างใบ มีทั้งรูปหัวใจและห้าเหลี่ยม ในกลุ่มที่ 2.1 ประกอบด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG10, TLGM14, TLGM15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ TLGM16 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน คือ ขอบใบ มีทั้งเรียบและขรุขระ ผิวใบ มีทั้งเรียบและขรุขระ รูปร่างใบ มีทั้งรูปหัวใจและห้าเหลี่ยม ในกลุ่มที่ 2.2 ประกอบด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG8 และ TLG9 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน คือ ใบห้าเหลี่ยม แต่มีขอบใบและผิวใบแตกต่างกัน คือ ขอบใบ มีทั้งเรียบและเลื่อย ส่วนผิวใบ มีทั้งเรียบและขรุขระ จะเห็นว่า ตำลึงตัวอย่างมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายในทุกกลุ่ม ชี้ให้เห็นว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ศึกษาทั้ง 3 ลักษณะให้ผลสอดคล้องกับแผนภูมิ phylogenetic tree บางส่วน คือ กลุ่มที่ 1.1 ที่ทุกตัวอย่างมีขอบใบเป็นแบบเรียบ และกลุ่มที่ 2.2 ที่ทุกตัวอย่างมีรูปร่างใบเป็นรูปห้าเหลี่ยม ดังนั้น การจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถบอกได้ว่า ดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นอกจากนี้แผนภูมิ phylogenetic tree เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาในการเก็บตำลึงตัวอย่างของทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า ในกลุ่มที่ 1.1 ประกอบด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG1 (นครนายก), TLG2 (ปทุมธานี), TLG3 (กาญจนบุรี), TLG4 (ฉะเชิงเทรา), TLG5 (กรุงเทพ) และ TLG6 (ลำปาง) เป็นตำลึงที่มีแหล่งที่มาอยู่ใกล้กันยกเว้นตำลึงที่มาจากลำปาง ในกลุ่มที่ 1.2 ประกอบไปด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG7 (ลำปาง), TLG11 (ปทุมธานี), TLGM12 (กรุงเทพ) และ TLGM13 (สมุทรปราการ) เป็นตำลึงที่มีแหล่งที่มาอยู่ใกล้กันยกเว้นตำลึงที่มาจากลำปาง ในกลุ่มที่ 2.1 ประกอบไปด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG10 (กรุงเทพ), TLGM14 (กรุงเทพ), TLGM15 (สมุทรปราการ) และ TLGM16 (กรุงเทพ) เป็นตำลึงที่มีแหล่งที่มาอยู่ใกล้กัน ในกลุ่มที่ 2.2 ประกอบไปด้วย ตำลึงตัวอย่าง TLG8 (เพชรบูรณ์) และ TLG9 (ระยอง) เป็นตำลึงที่มีแหล่งที่มาอยู่ไกลกัน จะเห็นว่า กลุ่มตำลึงส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาอยู่ใกล้กัน ชี้ให้เห็นว่า แหล่งที่มาของตำลึงตัวอย่างให้ผลค่อนข้างสอดคล้องกับแผนภูมิ phylogenetic tree ยกเว้นตำลึงตัวอย่าง TLG6 และ TLG7 ที่มาจากลำปาง ซึ่งอยู่ทางภาคเหนือแต่ถูกจัดรวมให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับตำลึงตัวอย่างที่มาจากภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคตะวันตก และยังยกเว้นตำลึงตัวอย่าง TLG8 (เพชรบูรณ์) และ TLG9 (ระยอง) ที่มีแหล่งที่มาไกลกันแต่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้น การจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถบอกได้ว่า ดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มา เนื่องจากตำลึงเป็นพืชที่คนไทยส่วนใหญ่มักนำมาใช้ประกอบอาหารอาจทำให้มีการนำตำลึงในพื้นที่หนึ่งไปปลูกอีกพื้นที่หนึ่งทำให้ดีเอ็นเอของตำลึงจากพื้นที่ที่ต่างกันอาจมีความคล้ายคลึงกัน

เมื่อนำผลการทดลองของโครงงานพิเศษนี้มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kumar and Sharma (2011) ที่ศึกษาการจำแนกลักษณะของงาในประเทศอินเดียจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR ซึ่งการวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยานั้นเมื่อนำมาสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree โดยใช้วิธี UPGMA สามารถแบ่งงาตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มโดยไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มา ส่วนการจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree โดยใช้วิธี UPGMA สามารถแบ่งงาตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งในแต่ละกลุ่มแยกจีโนไทป์ได้ชัดเจนและเมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับแหล่งที่มาของงา สามารถแบ่งกลุ่มงาให้สัมพันธ์กับแหล่งที่มาของงาได้ จะเห็นว่า การใช้เครื่องหมาย

ISSR จัดกลุ่มได้ดีกว่าการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของงาเพียงอย่างเดียว และยังสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอกับแหล่งที่มาของงาได้ในระดับสูงอีกด้วย ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar and Sharma (2011) ทั้งในด้านการใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR ที่พบว่า การใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถจัดกลุ่มได้ดีกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว และในด้านของความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอกับแหล่งที่มาของตัวอย่าง ที่พบว่า ดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มา

ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา งานวิจัยของ Sestili et al. (2011) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Cucumis melo* จำนวน 13 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมได้จากทางตอนใต้ของประเทศอิตาลี โดยใช้เครื่องหมาย ISSR และลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาทั้งหมด 15 ลักษณะ ได้แก่ น้ำหนักผล ลักษณะผล ลักษณะลำต้น ความยาวผล ความกว้างผล ความหนาของเปลือก ความหนาของเนื้อ ความยาวแกนผล ความกว้างแกนผล สีผล เนื้อผล ความสดของสีผล รสชาติ ความหวาน ผลผลิตรวม ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR 39 เส้น มาวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA ในรูปแผนภาพเดนโดรแกรม สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งการจัดกลุ่มขึ้นอยู่กับลักษณะสีผล โดยกลุ่มใหญ่แรกมีกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A และกลุ่ม B เมื่อพิจารณาควบคู่กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า กลุ่ม A เป็นกลุ่มของเมล่อนผลสีเหลืองทั้งหมด กลุ่ม B เป็นกลุ่มของเมล่อนผลสีเขียวและเหลือง กลุ่มใหญ่ที่สองเป็นกลุ่มของเมล่อนผลสีเหลืองทั้งหมด โดยงานวิจัยนี้สามารถจัดกลุ่มเมล่อนผลสีเขียวให้อยู่รวมกันได้ จึงบอกได้ว่า ดีเอ็นเอของเมล่อนมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของโครงงานพิเศษนี้ พบว่า ดีเอ็นเอของตำลึงมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระดับต่ำกว่าเนื่องจากงานวิจัยนี้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 15 ลักษณะ จากลักษณะทั้งหมดมีเพียงหนึ่งลักษณะ คือ สีผล ที่สามารถแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเมล่อนได้ดี ทำให้จัดกลุ่มดีเอ็นเอสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาได้ แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ศึกษาในโครงงานนี้น้อยเกินไปจึงไม่อาจทราบได้ว่า ลักษณะที่ศึกษาอยู่เหมาะสมกับการนำมาใช้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีกว่าการศึกษาในลักษณะอื่นๆหรือไม่ ถ้าศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มากขึ้นหรือศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆเพิ่มเติม อาจทำให้การจัดกลุ่มพืชตัวอย่างมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้มากขึ้น

นอกจากเทคนิคเครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มของพืชตัวอย่างยังมีเทคนิคเครื่องหมายอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้เช่นกัน เช่น ในงานวิจัยของ Singh and Parab (2015) ที่วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง ในประเทศอินเดีย โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 2 แบบ ได้แก่ เทคนิคเครื่องหมาย RAPD และ ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD ทั้งหมด 15 เส้นในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 561 ชิ้น ในจำนวนนี้มี 286 ชิ้น คิดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย 50.98% และใช้ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 10 เส้น ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอและให้ชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 204 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวน 105 ชิ้นคิดเป็น 51.38% ค่าเฉลี่ย polymorphism information content (PIC) สำหรับเครื่องหมาย RAPD มีค่าเท่ากับ 0.45 และสำหรับเครื่องหมาย ISSR มีค่าเท่ากับ 0.62 ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มของตำลึงทั้ง 30 ตัวอย่างในการใช้เทคนิคเครื่องหมาย RAPD และ ISSR ด้วยวิธี UPGMA พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard มีค่าตั้งแต่ 0.06 ถึง 0.82 เมื่อวิเคราะห์ด้วย RAPD และ 0.06 ถึง 0.81 เมื่อวิเคราะห์ด้วย ISSR และเทคนิคเครื่องหมาย RAPD สามารถจัดกลุ่มตำลึงตัวอย่างได้ทั้งหมด 6 กลุ่มและเทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถจัดกลุ่มตำลึงตัวอย่างได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม

งานวิจัยของ Shao et al. (2010) วิเคราะห์เปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมในดอกเบญจมาศ 31 ตัวอย่าง ในประเทศจีน โดยใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR และ SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 22 เส้น พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอและให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 182 ชิ้น มีจำนวน 149 ชิ้นที่แสดงความหลากหลายของตัวอย่างคิดเป็น 81.87% และค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 0.6154 ถึง 0.9835 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดแกรมสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม และใช้เทคนิคเครื่องหมาย SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ 26 คู่ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอและให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 243 ชิ้น มีจำนวน 184 ชิ้น ที่แสดงความหลากหลายคิดเป็น 75.72% และมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.6214 ถึง 0.9959 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดแกรมสามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม เช่นเดียวกับเทคนิคเครื่องหมาย ISSR

งานวิจัยของ Singh et al. (2007) ซึ่งเก็บรวบรวมตัวอย่างของมะระขี้นกที่ได้จากพื้นที่ที่แตกต่างกันในประเทศอินเดียจำนวน 38 ตัวอย่าง ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR 15 เส้น ได้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 125 ชิ้น จากชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดมีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย 94 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอคิดเป็น 74.75% ค่าเฉลี่ยของจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ 1 เส้นมีค่าเท่ากับ 6.27 และตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ RAPD 29 เส้นได้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 208 ชิ้น จากชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดมีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย 76 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอคิดเป็น 36.5% ค่าเฉลี่ยของจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ 1 เส้นมีค่าเท่ากับ 2.6 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard มีค่าตั้งแต่ 0.57 ถึง 0.93วิเคราะห์ด้วย RAPD และ 0.48 ถึง 0.91 เมื่อวิเคราะห์ด้วย ISSR และเทคนิคเครื่องหมาย RAPD เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของ Jaccard และใช้วิธีการ UPGMA ในการวิเคราะห์แผนภาพเดนโดแกรมแล้วสามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม โดยจัดกลุ่มมะระขี้นกตัวอย่างบางชนิดให้แยกกลุ่มกันได้แต่ความใกล้เคียงทางพันธุกรรมของมะระขี้นกแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกัน จากงานวิจัยทั้ง 3 งาน เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายของพืช พบว่า

เทคนิคเครื่องหมาย ISSR มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายของพืชมากกว่าเทคนิคเครื่องหมายชนิดอื่นที่ใช้ในงานวิจัยและช่วงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของ Jaccard ของเทคนิคเครื่องหมาย ISSR เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคเครื่องหมายชนิดอื่น พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของ Jaccard ที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า จากงานวิจัยทั้ง 3 งาน การจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR สามารถแสดงความหลากหลายของตัวอย่างพืชได้ดีกว่าการใช้เทคนิคเครื่องหมายชนิดอื่นๆ ดังนั้นเทคนิคเครื่องหมาย ISSR ที่โครงงานพิเศษนี้เลือกใช้นั้นมีความเหมาะสมในการนำมาใช้จัดกลุ่มพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

โครงงานพิเศษนี้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ในประเทศไทย ผลการทดลองพบว่า การวิเคราะห์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงตัวอย่าง โดยศึกษาจากลักษณะใบ ได้แก่ ขอบใบ ผิวใบ และรูปร่างใบ พบว่า ขอบใบมีลักษณะขอบใบเรียบและขอบใบเลื่อย ผิวใบมีลักษณะผิวใบเรียบและผิวใบขรุขระ และรูปร่างใบมีลักษณะเป็นรูปหัวใจและรูปห้าเหลี่ยม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดกลุ่มได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเลื่อย ผิวใบขรุขระ ใบห้าเหลี่ยม กลุ่มที่ 2 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเลื่อย ผิวใบเรียบ ใบห้าเหลี่ยม กลุ่มที่ 3 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบ ใบห้าเหลี่ยม กลุ่มที่ 4 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบ ใบรูปหัวใจ กลุ่มที่ 5 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบขรุขระ ใบรูปหัวใจ กลุ่มที่ 6 เป็นตำลึงที่มีลักษณะขอบใบเรียบ ผิวใบขรุขระ ใบห้าเหลี่ยม

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำลึง เมื่อนำตำลึงตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR ที่อาศัยปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 21 เส้น ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 211 ชิ้น มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 160 ชิ้น และมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 75.82% เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบแผนภูมิ phylogenetic tree โดยใช้วิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มตำลึงตัวอย่างได้โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1.1 และ 2.2 เป็นการรวมกลุ่มของตำลึงที่เก็บได้จากธรรมชาติเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่ 1.2 และ 2.1 เป็นการรวมกลุ่มของตำลึงที่เก็บได้จากธรรมชาติและตำลึงที่มาจากตลาด เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตำลึงทั้งหมด 16 ตัวอย่าง จากข้อมูล ISSR พบว่า ดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางส่วน กอปรกับแหล่งที่มาของการเก็บตำลึงตัวอย่างมีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอเช่นกัน ดังนั้นการจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR จึงสามารถสะท้อนให้เห็นถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตำลึงตัวอย่างและแหล่งที่มาได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทอื่นๆเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

5.2.2 ควรเก็บรวบรวมพืชตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยสุ่มตัวอย่างจากหลายๆพื้นที่ทั่วประเทศไทยและรวบรวมจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.3 ควรนำไปประยุกต์ใช้ในภาคการเกษตรเกี่ยวกับการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชาญชัย สาดแสงจันทร์. 2552. **เภสัชโภชนา กินผักให้เป็นยา สมุนไพรสามัญประจำบ้าน ป้องกันรักษาและต้านโรคด้วยตนเอง.** กรุงเทพฯ : บุ๊คส์ ทู ยู.

ระพีพรรณ ใจภักดี. 2544. **ผักใบ.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : แสงแดดเพื่อนเด็ก.

สุภัคภิรมย์ 2550. **97 สมุนไพรใกล้ตัวเสริมสุขภาพและความงาม.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : เครือเถา.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. **"เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช."** *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.* 5 : 37-59.

ศุภมิตร เมฆฉาย. 2555. "การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์." *วารสารแก่นเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.* 2 : 51-54.

Ariffin, Z. Sah, M.S.M. Idris, S. and Hashim, N. 2015. "Genetic diversity of selected *Mangifera* Species Revealed by Inter Simple Sequence Repeats Markers." *International Journal of Biodiversity.* DOI:10.1155/2015/458237

Chun, M.E. 2001. "Biology and host specificity of *Melittia Oedipus* (Lepidoptera: Sessidae), abiological control agent of *Coccinia grandis* (Cucurbitaceae)." *Proceedings Hawaiian Entomol.* Soc. 35 : 85–93.

Dje, Y. Tachi, C.G. Bi Z, A.I. Baudoin, J.P. and Bertin, P. 2010. "Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded *Citrullus lanatus* landraces." *Scientia Horticulturae.* 124 : 159-164.

Esmailnia, E. Arefrad, M. Shabani, S. Karimi, M. Vafadar, F. and Dehestani, A. 2015. "Genetic diversity and phylogenetic relationship of Iranian indigenous cucurbits investigated by inter simple sequence repeat (ISSR) markers." *Biharea Biologist.* 9(1) : 47-54.

Heikal, A.H. Abdel-Razzak, H.S. and Hafez, E.E. 2008. "Assessment of genetic relationships among and within *cucurbita* species using RAPD and ISSR markers." *Journal of Applied Science Research.* 4(5) : 515-525.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumar, V. and Sharma, S.N. 2011. "Comparative Potential of Phenotypic, ISSR and SSR Markers for Characterization of Sesame (Sesamum indicum L.) Varieties from India." *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 14(3) : 163–171. DOI: 10.1007/s12892-010-0102-z

Lakshmanan, V. Venkataramaredy, S. Nelwarne, B. 2007. "Aplication of inter simple sequence repeats (ISSR) markers to plant genetics." *Electronic Journal of Biotechnology*. 10(1) : 106-13.

Payel, D. Mala, P. and Sunita, S. 2015. "Inter-genus variation analysis in few members of Cucurbitaceae based on ISSR markers." *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015. DOI:10.1080/13102818.2015.1052760

Pekamwar, S.S. Kalyankar, T.M. and Kokate, S.S. 2013. "Pharmacological activities of *Coccinia grandis*" *Review. Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3 : 114–119.

Reddy, M.P. Sarla, N. and Siddiq, E.A. 2002. "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding." *Euphytica*. 128 : 9-17.

Reddy, U. 2009. "Cladistic analysis of a few members of Cucurbitaceae using rbcl nucleotide and amino acid sequences." *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*. 1(2) : 58-64.

Sestili, S. Giardini, A. and Ficcadenti N. 2011. "Genetic diversity among Italian melon inodorus (*Cucumis melo* L.) germplasm revealed by ISSR analysis and agronomic traits." *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 9(2) : 214–217. Doi:10.1017/S1479262111000335

Shao, Q.S. Guo, Q.S. Deng, Y.M. and Guo, H.P. 2010. "A comparative analysi of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 38(10) : 1160-1169.

Singh, S. and Mala, P. 2015. "Fingerprinting intra-specific diversity among *Coccinia grandis* landraces." *International Journal of Recent Scientific Research*. 6(3) : 3025-3032.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, A.K. Behera, T.K. Chandel, D. Singh N.K. and Sharma P. 2007. "Assessing genetic relationships among bitter gourd (*Momordica charantia* L.) accessions using inter simple sequence repeat (ISSR) markers." *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82 : 217-222.

Warnakula, W.A.D.L.R. Kottearachchi, N.S. and Yakandawala, K. 2017. "Morphological, SSR and ISSR markers based genetic diversity assessment of mountain papaya germplasm in comparison with *Carica papaya.*" *Journal of the Nationa Science Foundation of SriLanka.* 45(3) : 255-264.

บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน). 2562. **ตำลึง ตัวผู้ ตัวเมีย สรรพคุณต่างกัน.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://www.amarinbabyandkids.com/tips-for-parents/male-female-ivy-gourd/ (สืบค้นเมื่อวันที่ 26 มีนาคม 2562)

Plant Molecular Biology Lab. 2013. **Plant Molecular Biology Lab, IPB, Bogor.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://pmblab.wordpress.com/2013/10/10/qa-in-agh635-course-what-is-issr-marker-and-how-to-generate-the-marker (สืบค้นเมื่อวันที่ 26 มีนาคม 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียม 5X TBE buffer

ชั่งผง Tris 54 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลาย แล้วชั่ง boric acid 27.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์และคนให้ละลาย ตวง 0.5 M EDTA 20 มิลลิลิตร เทลงไปในบีกเกอร์และคนให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม 1X TBE buffer

การเตรียม 1X TBE buffer เพื่อใช้ในการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เตรียมได้จาก stock 5X TBE buffer

การเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

จาก

$$c_1v_1 = c_2v_2$$

$$(5X)(v_1) = (1X)(1000\ ml)$$

$$V_1 = 200\ ml$$

ดังนั้น ในการเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จะต้องเตรียมจาก stock 5X TBE buffer 200 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร

การเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

จาก

$$c_1v_1 = c_2v_2$$

$$(5X)(v_1) = (1X)(500\ ml)$$

$$V_1 = 100\ ml$$

ดังนั้น ในการเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จะต้องเตรียมจาก Stock 5X TBE buffer 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร

3. การเตรียม working solution

การเตรียม working solution ของไพรเมอร์ ให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ จาก stock USB primer ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จาก

$$c_1v_1 = c_2v_2$$

$$(100\ \mu M)(v_1) = (5\ \mu M)(100\ \mu l)$$

$$V_1 = 5\ \mu l$$

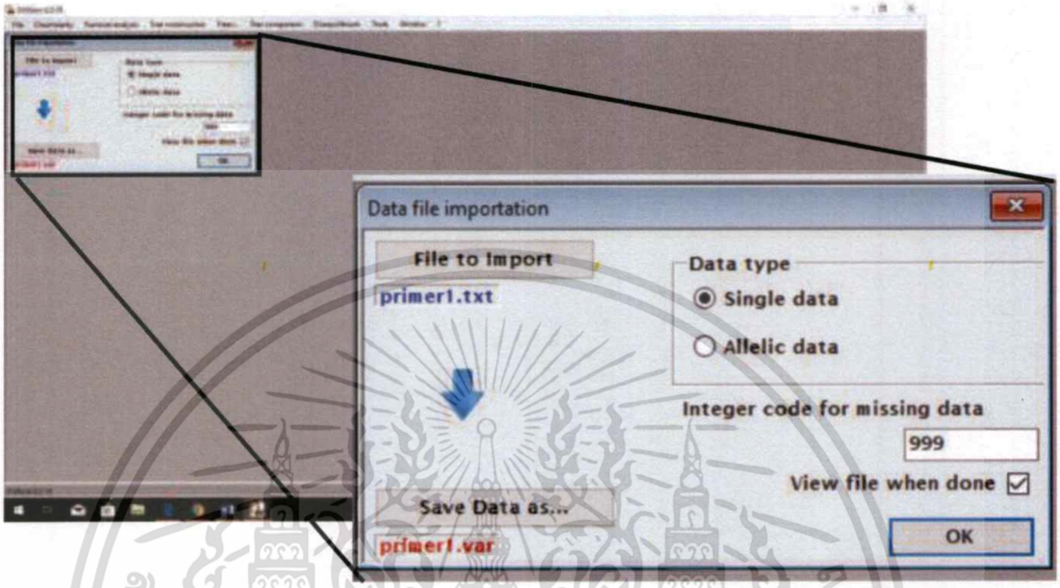
ดังนั้น ในการเตรียม working solution ของไพรเมอร์ ให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ จะต้องเตรียมจาก stock USB primer ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 95 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีการใช้โปรแกรม DARwin version 6

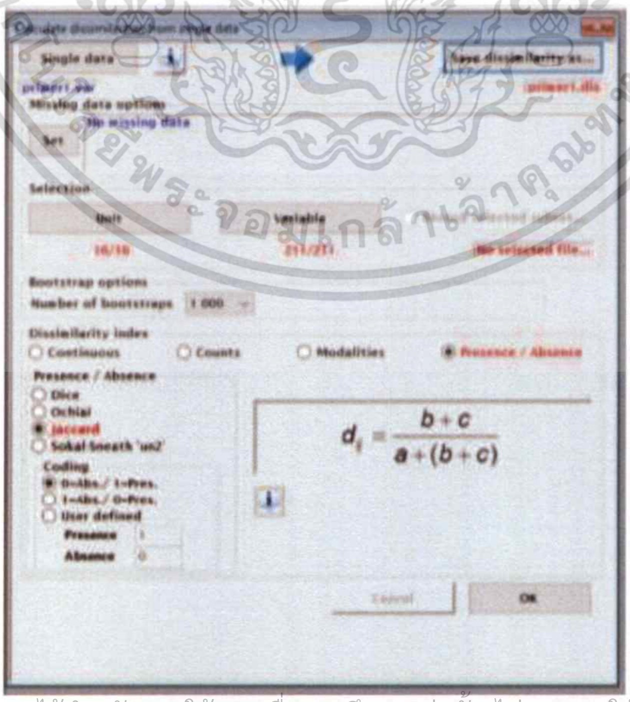
4.1 เปิดโปรแกรม Darwin จากนั้น กดหัวข้อ File เลือก Import data matrix

กด File to import เลือกไฟล์ สกุล .txt => กด save data as... => เลือก Single data => กด View file when done => กด OK



4.2 กดหัวข้อ Dissimilarity เลือก Calculate from single data

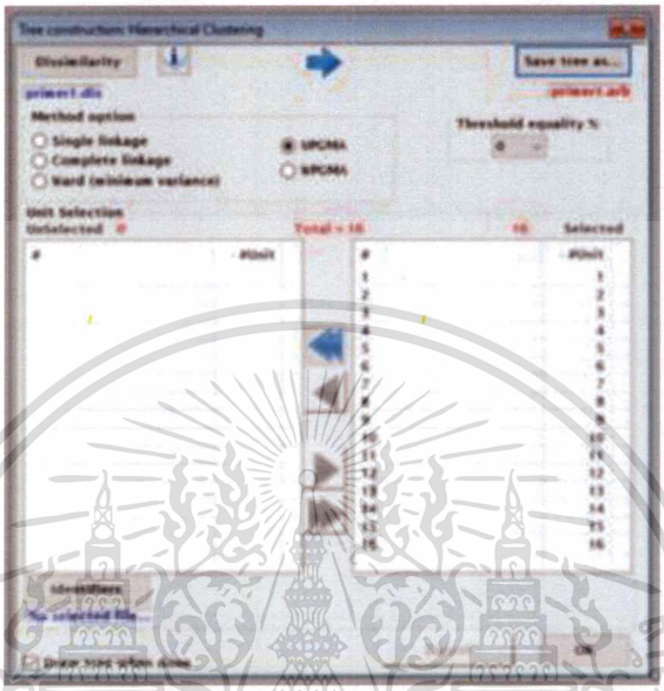
กด Single data เลือกไฟล์ สกุล .var => Number of bootstraps เลือก 1000 => Dissimilarity index เลือก Presence/Absence และเลือก Jaccard => กด OK



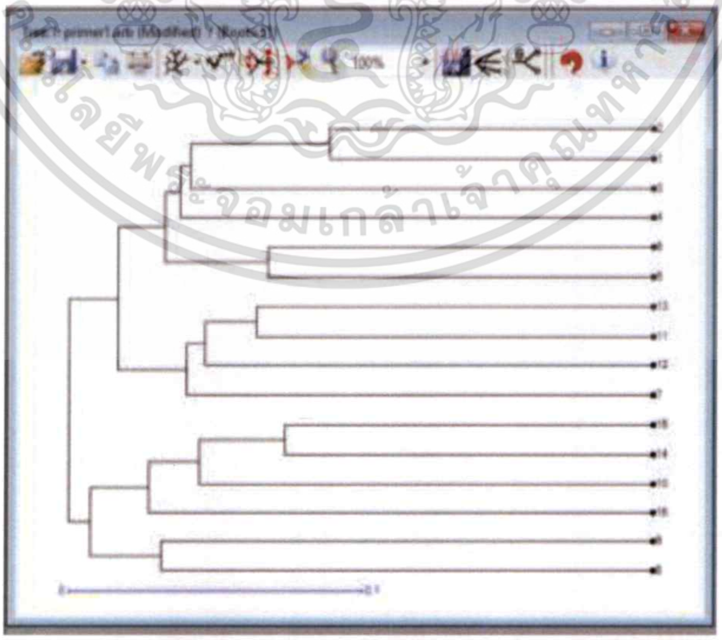
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 กดหัวข้อ Tree construction เลือก Hierarchical Clustering

กด Dissimilarity เลือกไฟล์ สกุล .dis => Mathod option เลือก UPGMA => กด Draw tree when done => กด Save tree as… => กด OK



จากนั้น กด เลือก Hierarchical (hor.) จะได้ แผนภูมิ phylogenetic tree ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้