ความหลากหลายและการระบุเพศของอินทผลัม ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

DIVERSITY AND SEX IDENTIFICATION OF *Phoenix dactylifera* BY SRAP MARKER

พิชญ์สิณี ชาตรีชาญ
อัญชิสา เสนาะดนตรี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DIVERSITY AND SEX IDENTIFICATION OF *Phoenix dactylifera* BY SRAP MARKER

PITSINEE CHATRICHAN
ANCHISA SANORDONTREE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ความหลากหลายและการระบุเพศของอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี Diversity and Sex Identification of *Phoenix dactylifera* by SRAP Marker
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพิชญ์สิณี ชาตรีชาญ รหัสนักศึกษา 57050738 นางสาวอัญชิสา เสนาะดนตรี รหัสนักศึกษา 57050782
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ ความหลากหลายและการระบุเพศของอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

ชื่อนักศึกษา นางสาวพิชญ์สิณี ชาตรีชาญ รหัสนักศึกษา 57050738
นางสาวอัญชิสา เสนาะดนตรี รหัสนักศึกษา 57050782

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

อินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) เป็นพืชประเภทที่มีดอกแบบไม่สมบูรณ์เพศแบบแยกเพศอยู่ต่างต้นกัน เป็นต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศในระยะก่อนออกดอกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัม โดยอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี โดยมีจำนวนตัวอย่างอินทผลัมจำนวน 32 ตัวอย่าง 6 สายพันธุ์ ที่ทราบเพศจากการที่เคยออกผลแล้ว จากไพรเมอร์ทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 สามารถระบุเพศได้ถูกต้อง 17 ตัวอย่างจาก 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละความผิดพลาดเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัม คัดเลือกไพรเมอร์ 4 คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ ME4/EM2, ME4/EM3, ME4/EM5 และ ME5/EM2 ให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 68.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11 โดยใช้วิธี UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.75 ถึง 0.97 โดยที่ค่า 0.81 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างอินทผลัมเป็น 3 กลุ่ม จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างในแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยตัวอย่างที่มีถิ่นกำเนิดจากแหล่งของสายพันธุ์เดียวกัน จากงานวิจัยนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการตรวจสอบและจัดจำแนกสายพันธุ์ของอินทผลัมในอนาคตได้

คำสำคัญ : การระบุเพศ ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี อินทผลัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Diversity and Sex Identification of *Phoenix dactylifera* by SRAP Marker
Student	Miss Pitsinee Chatrichan Student ID 57050738
	Miss Anchisa Sanordontree Student ID 57050782
Degree	Bachelor of science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst.Prof.Dr.Supattra Poeaim

Abstract

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is a dioecious plant with separate sexes on a different tree; male and female. The purpose in this research is to identify the sex before flowering and genetic diversity of date palms by molecular markers SRAP. With sample of date palms, containing 32 samples within 6 strains/species after flowering. Used to 30 pairs of primers, only one primer ME4/EM3 can identified gender correctly 17 samples from 20 samples, the percentage of mistake is 15. For the genetic diversity, using 4 pairs of primers that have been selected are ME4/EM2, ME4/EM3, ME4/EM5 and ME5/EM2. Showing as different band a percentage of different is 68.84. Through the analyzed relation by NTSYSpc program version 2.11 with the UPGMA method show genetic similarity coefficient between 0.75 to 0.97, where at 0.81 can be divided all date palms into 3 groups. From the analysis, the samples in each group analyzed the genetic characteristics that are obvious in these species. From this research, the data can be validate and improve the classification of date palm species in the future.

Keywords : Sex identification, Genetic diversity, SRAP markers, Date palm (*Phoenix dactylifera)*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษในหัวข้อความหลากหลายและการตรวจเพศอินทผลัมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลที่มีพระคุณดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ดูแลอย่างใกล้ชิด อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆ และปรับปรุงข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานอีกด้วย รวมถึงตรวจปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการ ที่ร่วมพิจารณาในการแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณปรีชา ธรรมเชาวรัตน์ เจ้าของสวนอินทผลัมปรีชา จังหวัดนนทบุรี ที่อนุเคราะห์ในการเอื้อเฟื้อตัวอย่างอินทผลัมเพื่อนำมาทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคน ณ ห้องเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ที่ให้ความช่วยเหลือ จึงสามารถทำโครงงานนี้ได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเป็นพิเศษสำหรับความห่วงใยและกำลังใจจากครอบครัวของผู้วิจัย ซึ่งเป็นแรงผลักดันและสนับสนุนการศึกษาของผู้วิจัย จนสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี่ด้วย

พิชญ์สิณี ชาตรีชาญ
อัญชิสา เสนาะดนตรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการจัดจำแนกสายพันธุ์อินทผลัม 4
2.1.1 ประวัติและลักษณะทางพฤษศาสตร์ของอินทผลัม 4
2.1.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์อินทผลัม 5
2.2 เครื่องหมายโมเลกุล 6
2.3 เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 7
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา 12
3.2 อุปกรณ์ 13
3.3 สารเคมีและสารละลาย 13
3.4 วิธีการทดลอง 15
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ 15
3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ 16
3.4.3 การระบุเพศของอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 16
3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมโดยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 18
3.4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 20
4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 20
4.1.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศของอินทผลัม 20
4.1.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เอสอาร์เอพี 21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 26
5.1 สรุปผลการวิจัย 26
5.2 ข้อเสนอแนะ 26
เอกสารอ้างอิง 27
ภาคผนวก 32
ภาคผนวก ก 33
ภาคผนวก ข 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 รหัสตัวอย่าง ชื่อสายพันธุ์ และเพศของอินทผลัม 12

3.2 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ใน เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 14

3.3 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 17

3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 18

4.1 ชนิดของไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน polymorphic bands และเปอเซ็นต์ polymorphism ของอินทผลัม จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ดอกอินทผลัมเพศเมียและดอกอินทผลัมเพศผู้ 5

4.1 แถบดีเอ็นเอของอินทผลัมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟีโดยคู่ไพรเมอร์ ME4/EM3..... 21

4.2 ดีเอ็นเอโปรไฟล์ของอินทผลัมที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟี 22

4.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของอินทผลัมจำนวน 30 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟี 4 คู่ไพรเมอร์ โดยการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA 24

4.4 ประเทศถิ่นกำเนิดของอินทผลัมทั้ง 6 สายพันธุ์ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อินทผลัม (Date Palm) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phoenix dactylifera* L. เป็นพืชในตระกูลปาล์ม มีการกระจายพันธุ์ในพื้นที่แถบตะวันออกกลางและอเมริกาใต้ มีหลากหลายสายพันธุ์ทั้งชนิดปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับ ซึ่งมีรูปทรงต้นที่สวยงาม ผลมีขนาดเล็ก เนื้อมีปริมาณน้อย ไม่สามารถรับประทานได้ และอีกชนิดหนึ่งเป็นชนิดปลูกเพื่อรับประทานผล ผลมีขนาดใหญ่ รสชาติหวาน อินทผลัมเป็นผลไม้ที่ดีต่อสุขภาพประกอบไปด้วยวิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ มากมาย อีกทั้งยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ช่วยรักษาโรคได้หลายอย่าง เนื่องจากในผลอินทผลัมมีส่วนประกอบของสารแทนนิน ซึ่งมีเส้นใยช่วยรักษาอาการท้องผูก และมีธาตุเหล็กสูงช่วยรักษาโรคโลหิตจาง ลดสาเหตุการเกิดโรคมะเร็ง ลดระดับน้ำตาลในเลือดสูง และลดอัตราการเกิดโรคหัวใจ นอกจากนี้อินทผลัมเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญต่อชาวไทยที่นับถือศาสนาอิสลาม โดยเฉพาะในเดือนแห่งการถือศีลอด (รอมฎอน) มักนิยมบริโภคและมอบผลอินทผลัมแก่กัน เพื่อรับประทานทดแทนพลังงานที่สูญเสียไปในแต่ละวัน อินทผลัมเรียกเป็นภาษาท้องถิ่นว่า Khajji หรือ Khajoor (จารุฉัตร, 2558) โดยผู้ผลิตอินทผลัมรายใหญ่ ได้แก่ ประเทศซาอุดีอาระเบีย ประเทศแอลจีเรีย และประเทศในแถบอาหรับ ดังนั้นอินทผลัมส่วนใหญ่ในประเทศไทยจึงต้องนำเข้ามาจากประเทศเหล่านี้ในรูปผลแห้ง จากการสำรวจพบว่าอินทผลัมที่เพาะปลูกทั่วโลกมีอยู่มากกว่า 700 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ สายพันธุ์บาฮี คาลาส เมดจูลห์ ซิชิ และโคนิชี่ (สัมฤทธิ์, 2534) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคในระดับโมเลกุลมาศึกษาความหลากหลายและการจัดจำแนกทางพันธุกรรม ดังงานวิจัยของ Mirbahar *et al*. (2014) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.636 ถึง 0.950 ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งอินทผลัมออกตามพื้นที่ปลูกของประเทศปากีสถาน พบว่าตัวอย่างที่อยู่ในพื้นที่ปลูกใกล้เคียงกันจะมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน และดังงานวิจัยของ Ahmed *et al*. (2016) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมในประเทศกาตาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.32 ถึง 0.96 แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง และสามารถแบ่งอินทผลัมออกตามสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Sequence Related Amplified Polymorphism) ได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่นงานวิจัยของ Zhao *et al*. (2016) ศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกีวี่ (*Actinidia*) พบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด 292 แถบ จากคู่ไพรเมอร์ ME5/EM5 และ ME9/EM12 เมื่อนำว่าวิเคราะห์พบว่าสามารถแบ่งกีวี่ออกได้เป็น 5 กลุ่ม โดยที่ *A. rufa* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A. arguta นี้มีระยะห่างในความสัมพันธ์กันค่อนข้างมาก ต่างจาก *A. Chinensis*, *A. deliciosa* และ *A. eriantha* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดและอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

อินทผลัมจัดอยู่ในกลุ่มพืชที่มีดอกแบบไม่สมบูรณ์เพศ คือ พืชดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน มีโครโมโซมเป็นแบบดิพลอยด์ (2n=36) (Dhawan *et al.*, 2013) เป็นพืชที่มีทั้งต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ต้องอาศัยการผสมเกสรจึงจะติดผล จากการปลูกเพาะเมล็ดจะใช้ระยะเวลานานจนกว่าจะทราบได้ว่าเป็นต้นเพศผู้หรือเพศเมีย การปลูกจะติดดอกออกผลให้ทราบเพศในช่วงอายุ 3 ปีแรก บางต้นอาจใช้เวลานานถึง 5 ปี ซึ่งเป็นระยะเวลานานและไม่แน่นอนสำหรับเกษตรกรที่ปลูกอินทผลัมเพื่อการค้า ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคในระดับโมเลกุลมาศึกษาการระบุเพศ เช่น เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat) ดังงานวิจัยของ Al-Ameri *et al.* (2016) ศึกษาการระบุเพศของอินทผลัม พบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์เท่านั้นที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในเพศผู้และเพศเมียได้ คือไพรเมอร์ IS_A02 และ IS_A71 โดยที่ไพรเมอร์ IS_A02 จำเพาะกับเพศเมียที่ขนาดประมาณ 390 คู่เบส และไพรเมอร์ IS_A71 จำเพาะกับเพศผู้ที่ขนาดประมาณ 380 คู่เบส และเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) ดังงานวิจัยของ Dhawan *et al.* (2013) ศึกษาการระบุเพศในอินทผลัมเพศผู้ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์เดียวคือ ไพรเมอร์ OPA-02 ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างของเพศผู้จากเพศเมียได้ จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในการระบุเพศของอินทผลัมเพศผู้โดยเทคนิคสการ์ (Sequence Characterized Amplified Region) พบว่าในเพศผู้จะปรากฏ 2 แถบ และในเพศเมียจะปรากฏ 1 แถบ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Sequence Related Amplified Polymorphism) ได้มีการศึกษาการระบุเพศในพืชหลายชนิด เช่นงานวิจัยของ Wang *et al.* (2016) ศึกษาการระบุเพศของต้นเบอร์รี่แดง (*Idesia polycarpa*) ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการระบุเพศเพียง 1 คู่ไพรเมอร์ คือ ME14/EM8 เท่านั้นที่สามารถแยกได้เฉพาะในตัวอย่างเพศเมียทั้งหมด ชิ้นส่วนนี้มีขนาดประมาณ 210 คู่เบส และงานวิจัยของ Zhou *et al.* (2011) ศึกษาการระบุความแตกต่างของเพศในหญ้าขน (Buffalograss) (*Buchloe dactyloides*) ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีทั้งหมด 228 คู่ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ ME9/EM2 สามารถให้ความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมีย ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่-เบส ในเพศเมียเท่านั้น

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีในการระบุเพศของอินทผลัม จึงเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีนี้พัฒนาขึ้นโดย Li and Quiros (2001) เป็นวิธีการที่มีวัตถุประสงค์เพื่อการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วน Open Reading Frames (ORFs) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ Forward primer มีขนาด 17 เบส และ Reverse primer มีขนาด 18 เบส ข้อดีของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี คือ ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา และเป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอครั้งละหลายตำแหน่งได้พร้อมกัน ใกล้เคียงกับการตรวจสอบโดยเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี แต่ทำได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และรวดเร็วกว่า (สุรินทร์, 2552) จึงได้นำเทคนิคนี้มาศึกษาการระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อระบุเพศและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาตัวอย่างจากใบอินทผลัมที่ได้จากสวนอินทผลัมปรีชา จังหวัดนนทบุรี จำนวน 32 ตัวอย่าง ที่ทราบเพศจากการที่เคยออกผลแล้ว ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ KL-1 บาฮี ซัลตาน่า กานามิ คาลาส และเมดจูลห์ โดยทุกต้นเป็นต้นที่มีอายุมากกว่า 3 ปี แบ่งเป็นเพศผู้ 12 ตัวอย่าง และเพศเมีย 20 ตัวอย่าง นำมาศึกษาการระบุเพศและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมทางโมเลกุลด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะในการระบุเพศของอินทผลัม

1.4.2 เป็นฐานข้อมูลของอินทผลัมในแต่ละสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

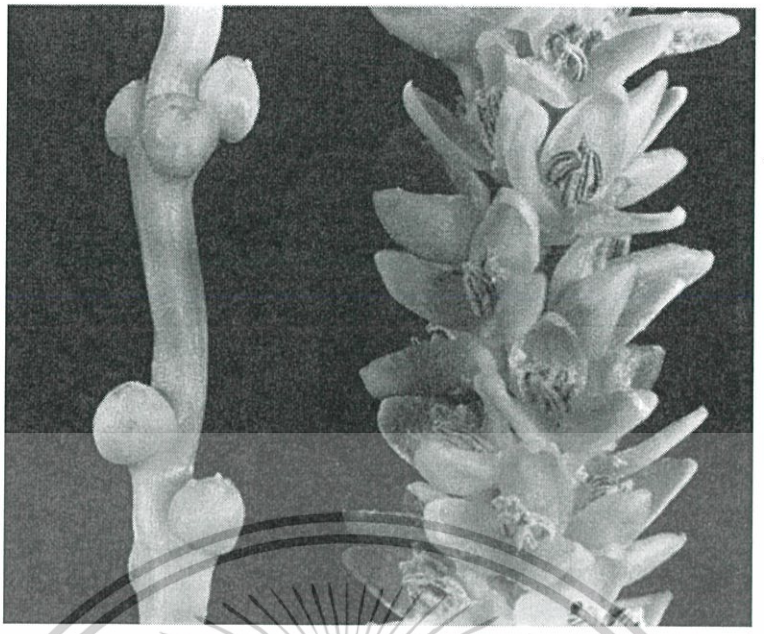
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการจัดจำแนกสายพันธุ์อินทผลัม

2.1.1 ประวัติและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอินทผลัม

อินทผลัมเป็นผลไม้ที่เก่าแก่ที่สุดที่ได้มีการเพาะปลูกกันมาในแอฟริกาเหนือและตะวันออกกลาง เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 5000 ปี หลักฐานที่เก่าแก่ที่สุดเป็นหลักฐานการบันทึกการเกษตรกรรมของอิรักในสมัยอารยธรรมเมโสโปเตเมีย ซึ่งเป็นช่วงเวลา 3000 ปีก่อนคริสตศักราช อินทผลัมจัดเป็นผลไม้ที่มีคุณค่ามากชนิดหนึ่ง ในยุคโบราณนอกจากจะนำไปบริโภคเป็นอาหารแล้ว หมอหรือแพทย์ในสมัยนั้นยังนำไปใช้ทำเป็นยาหรือส่วนประกอบของยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคมายาวนานนับพันปี (Chao and Krueger, 2007) ในระยะ 3 ถึง 5 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยได้หันมาสนใจปลูกอินทผลัม โดยเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของประเทศไทย ในประเทศไทยมีการปลูกอินทผลัมหลากหลายสายพันธุ์ มีทั้งอินทผลัมประดับ อินทผลัมบริโภคได้ทั้งผลสดและผลแห้ง โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกมากคือ สายพันธุ์ KL-1 ซึ่งเป็นพันธุ์บริโภคผลสด ปลูกมากทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคอีสานในบางพื้นที่ รองลงมาคือ สายพันธุ์เดกเล็ท นัวร์ (Deglet Nour) และเมดจูลห์ (Medjool) ซึ่งเป็นพันธุ์บริโภคผลแห้ง ปลูกมากทางภาคอีสาน (จารุฉัตร, 2558)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอินทผลัม (Date Palm: *Phoenix dactylifera* L.) หรือเรียกภาษาท้องถิ่นว่า Khajji หรือ Khajoor อินทผลัมเป็นพืชตระกูลปาล์ม มีถิ่นกำเนิดในแถบตะวันออกกลาง สามารถเจริญเติบโตได้ในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนและแห้งแล้งแบบทะเลทราย ลักษณะเป็นต้นเดี่ยว และแตกหน่อ ลำต้นสูงประมาณ 30 เมตร ขนาดลำต้นประมาณ 0.3 ถึง 0.5 เมตร มีกาบก้านใบห่อหุ้มต้น ช่อดอกจะออกจากโคนใบ ต้นหนึ่งจะมีช่อดอกประมาณ 5 ถึง 11 ช่อ เริ่มออกดอกติดผลได้เมื่ออายุ 3 ถึง 5 ปี อินทผลัมจัดอยู่ในกลุ่มพืชดอกไม่สมบูรณ์เพศ แบบดอกเพศเมียและเพศผู้อยู่ต่างต้นกัน เรียกว่า ต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย ดอกเพศผู้มีลักษณะเป็นพวกคล้ายหางกระรอก สีขาว กลีบดอกบานออกเป็นแฉก (รูปที่ 2.1ขวา) ส่วนดอกเพศเมียมีลักษณะเป็นช่อเมล็ดกลมๆ สีเขียวอ่อน (รูปที่ 2.1ซ้าย) มีก้านใบบนต้นประมาณ 40 ถึง 60 ก้าน ก้านทางใบมีหนามแหลมยาวประมาณ 3 ถึง 4 เมตร ใบเป็นแบบขนนกยาวประมาณ 6 เมตร ทางใบชี้ตรงขึ้นไม่โค้งลง ปลายใบแหลมคม สีเขียวอ่อน ใต้ใบสีเทา ใบย่อยพุ่งออกหลายทิศทาง ผลมีรูปทรงกลมรียาวประมาณ 2 ถึง 4 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นช่อ สามารถรับประทานได้ทั้งผลสุกและผลแห้ง ผลสีเหลืองจนถึงสีส้มและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้มเมื่อแก่จัด (สัมฤทธิ์ และคณะ, 2534 ; นิรนาม, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 (ซ้าย) ดอกอินทผลัมเพศเมีย และ (ขวา) ดอกอินทผลัมเพศผู้
(ที่มา: http://www.datepalm.in.th/photo-album/id-5/id.html)

2.1.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์อินทผลัม

จากรายงานของพัชรี (2560) อินทผลัมในโลกมีมากกว่า 700 สายพันธุ์ เนื่องจากมีการผสมพันธุ์ข้ามต้นและเกิดการกลายพันธุ์ไปจากต้นพ่อแม่พันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์อินทผลัมส่วนใหญ่เป็นที่รู้จักกันในวงแคบที่มีการเพาะปลูกและรับประทานกันในท้องถิ่น แต่มีอินทผลัมกว่า 10 สายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักในระดับสากล และมีเพียงไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้นที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค จากการพิสูจน์ของกลุ่มเกษตรกรไทย พบว่าสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกในประเทศไทยที่สุดคือ สายพันธุ์บาฮี และนอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อื่นๆ ที่นิยมปลูกดังนี้

สายพันธุ์บาฮี (Barhee) อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศอิรัก อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีลักษณะผลทรงรีกลมมากกว่าพันธุ์อื่น ผลอ่อนจะมีสีเขียวเข้มก่อนเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนจนกลายเป็นสีเหลืองทอง จนกระทั่งผลแก่จัดจะเป็นสีน้ำตาลปนเหลือง มีเนื้อนิ่ม นิยมรับประทานเป็นผลสด เมื่อทิ้งให้ผลสุกงอมจะได้เนื้อที่นิ่มคล้ายลูกพลับ สายพันธุ์นี้จะมีรสหวานที่เป็นเอกลักษณ์ในประเทศไทยสายพันธุ์นี้เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่นิยมนำมาเพาะปลูก

สายพันธุ์กานามิ (Ghannami) อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศอิรัก เป็นที่นิยมของทางตะวันออกกลาง เป็นสายพันธุ์ที่เพศผู้มีลักษณะดีที่สุด เพราะได้มาจากการคัดเลือกและทดสอบจากสายพันธุ์ของอินทผลัมต้นเพศผู้กว่า 200 สายพันธุ์ เกสรของสายพันธุ์กานามิมีอนุภาคขนาดเล็กเหมาะสำหรับการผสมกับเกสรเพศเมียได้ทุกสายพันธุ์ ติดผลง่ายและผลดก เหมาะสมกับการเป็นพ่อพันธุ์ของอินทผลัมมากที่สุด ทั้งยังให้ผลผลิตมีขนาดใหญ่ เนื้อเยอะ มีรสฝาดน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์เมดจูลห์ (Medjool) อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศโมร็อกโก ปัจจุบันมีผู้นำไปเพาะปลูกอย่างแพร่หลายจนได้รับการยกย่องว่าเป็น “ราชาแห่งอินทผลัม” ส่วนใหญ่นิยมรับประทานผลสุกแห้ง มีลักษณะที่โดดเด่นคือ ผลขนาดใหญ่ ผลอ่อนมีสีเขียวแล้วจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อผลแก่ขึ้น เมื่อผลแห้งจะมีสีน้ำตาลเข้มคล้ายสีมะฮอกกานี มีลักษณะเนื้อกึ่งแห้ง เป็นทรายเล็กน้อย รสชาติหวานจัด แต่ในการติดผลจะติดยาก จึงไม่นิยมปลูกในประเทศไทย

สายพันธุ์คาลาส (Khalas) อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศซาอุดิอาระเบีย เป็นสายพันธุ์ที่รับประทานผลสุกตั้งแต่เริ่มสุกครึ่งผลและมีสีเหลือง ให้รสชาติหวาน มีความหอมเป็นเอกลักษณ์ที่โดดเด่น เนื้อนุ่ม ลักษณะผลเรียวยาว รูปทรงไข่ ผลมีขนาดเล็ก ผลดิบหรือผลอ่อนจะมีสีเหลือง ส่วนผลแห้งจะมีสีน้ำตาลอ่อนใส มีรสชาติหวานน้อย และถูกจัดอยู่ในอันดับต้นๆ ที่นิยมนำมารับประทาน แม้ในประเทศไทยจะยังไม่เป็นที่รู้จักมากนัก

สายพันธุ์ซัลตาน่า (Sultana) อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศซาอุดิอาระเบีย มีผลสีเหลืองทอง รูปทรงกลม ขนาดของผลค่อนข้างใหญ่ ออกผลผลิตช่วงกลางฤดู สามารถรับประทานได้ทั้งในระยะแก่จัดและในระยะตากแห้ง ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูง เนื้อแน่นและมีความนุ่ม สำหรับประเทศไทยอินทผลัมพันธุ์นี้จะสุกประมาณปลายเดือนสิงหาคม อินทผลัมพันธุ์นี้จึงเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่น่าจะสามารถปลูกได้แค่บางพื้นที่ของไทย อินทผลัมพันธุ์นี้สามารถให้ผลผลิตดกพันธุ์หนึ่ง

สายพันธุ์เคแอล 1 (KL-1) อินทผลัมสายพันธุ์นี้นิยมรับประทานเป็นผลสด โดยถูกพัฒนาขึ้นและมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย มีต้นสายพันธุ์ดั้งเดิมเป็นสายพันธุ์บาฮี ผู้ที่ทำการพัฒนาสายพันธุ์นี้ขึ้นมาคือ คุณศักดิ์ ลำจวน ในผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล (พัชรี, 2560)

2.2 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecule Markers)

เครื่องหมายโมเลกุล หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์-แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี่เองที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึงแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ นั่นเอง สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุรีพร, 2546) ปัจจุบันมีการนำเทคนิคในระดับโมเลกุลมาใช้อย่างแพร่หลาย เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยอาศัยเครื่องหมายต่างๆ ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การระบุเพศ จัดจำแนก และศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Sequence Relate Amplfied Polymorphism) (Li and Quiros, 2001) เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) และเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) เป็นต้น

2.3 เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Sequence Related Amplified Polymorphism; SRAP)

เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจัดจำแนก ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เครื่องหมายนี้พัฒนาขึ้นโดย Li and Quiros (2001) มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเครื่องหมายโมเลกุลจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วน Open Reading Frame (ORF) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ Forward primer โดยคู่ไพร-เมอร์ที่มีขนาด 17 เบส มีส่วนของลำดับเบสหลัก (core sequences) ซึ่งจะยาวประมาณ 13 ถึง 14 เบส โดยที่มีลำดับเบส 10 ถึง 11 เบสเป็นส่วนของปลาย 5' อาจเรียกลำดับเบสนี้ว่า ลำดับเบสส่วนเติม (filler sequences) และตามด้วยลำดับเบส CCGG ใน Forward primer เพื่อให้จับกับส่วนของเอ็กซอน (exon) หรือ ORF ซึ่งมักเป็นบริเวณที่มีปริมาณของเบส GC สูง และ Reverse primer มีขนาด 18 เบส มีส่วนลำดับเบสหลัก (core sequences) ขนาด 15 เบส โดยที่ลำดับเบส 11 เบสแรกทางด้านปลาย 5' เป็นลำดับเบสที่ไม่มีความจำเพาะ เรียกว่า ลำดับเบสส่วนเติม (filter-sequence) ตามด้วยส่วนที่เป็นเบสจำเพาะ คือ AATT จากปลาย 3' เพื่อให้จับกับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณที่มีเบส AT สูง ซึ่งพบมากในส่วนของอินทรอน (intron) และรวมถึงส่วนโพรโมเตอร์ของยีนตรงปลาย 3' ของทั้ง Forward primer และ Reverse primer เรียกว่า ลำดับเบสคัดเลือก (selective sequence) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงลำดับเบสได้อีก 3 เบส (Ferriol *et al.*, 2004)

สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้วิธี step up PCR คือใช้อุณหภูมิ annealing 2 รอบ โดยรอบแรกใช้อุณหภูมิต่ำ เรียกว่า early cycles ซึ่งไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแบบสุ่มอย่างจำเพาะ จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เรียกว่า late cycles เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจากรอบแรกเท่านั้น หรือเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะมากยิ่งขึ้น ซึ่งอุณหภูมิและจำนวนรอบนั้นแตกต่างไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Abedian *et al.*, 2012) ทำให้ผลที่ได้มีความคงที่ หลังจากนั้นตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลที่ได้จะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดี-เอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลหลากหลายชนิดมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การจัดจำแนกสายพันธุ์ และการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของอินทผลัม ดังงานวิจัยของ Al-Ameri *et al.* (2016) ศึกษาการระบุเพศของอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์กับตัวอย่างอินทผลัมจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 200 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์เท่านั้นที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในเพศผู้และเพศเมียได้ คือไพรเมอร์ IS_A02 และ IS_A71 โดยที่ไพรเมอร์ IS_A02 จำเพาะกับเพศเมียที่ขนาดประมาณ 390 คู่เบส และไพรเมอร์ IS_A71 จำเพาะกับเพศผู้ที่ขนาดประมาณ 380 คู่เบส ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์จึงสามารถนำมาใช้ในการระบุความแตกต่างของเพศได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dhawan *et al.* (2013) ศึกษาการระบุเพศในอินทผลัมเพศผู้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีและเทคนิคสการ์ ใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ 104 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์อาร์เอพีดี 100 ไพรเมอร์ กับตัวอย่างจำนวน 45 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศเมีย 25 ตัวอย่าง และเพศผู้ 20 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียงไพรเมอร์เดียว คือ ไพรเมอร์ OPA-02 จากเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเพศผู้ ที่ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในการระบุเพศของอินทผลัมเพศผู้ โดยเทคนิคสการ์มี Forward primer คือ dpF และ Reverse primer คือ dpR จากนั้นทำการทดสอบไพรเมอร์ที่ได้จากเทคนิคสการ์กับตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง เป็นเพศผู้ 3 ตัวอย่าง และเพศเมีย 7 ตัวอย่าง พบว่าในเพศผู้จะปรากฏ 2 แถบ และในเพศเมียจะปรากฏ 1 แถบ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีจึงสามารถนำมาใช้ในการระบุความแตกต่างของเพศในอินทผลัมได้ และงานวิจัยของ Younis *et al.* (2008) ศึกษาการระบุเพศในอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี และเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์กับตัวอย่างอินทผลัมจำนวน 7 ตัวอย่าง เครื่องหมายละ 7 ไพรเมอร์ พบว่าเมื่อทำการทดลองด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี มี 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถให้ความจำเพาะในเพศเมีย 1 ไพรเมอร์ และเพศผู้ 2 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ A-10 ที่จำเพาะต่อเพศเมีย ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 490 คู่เบส และไพรเมอร์ A-12 กับ D-10 ที่จำเพาะต่อเพศผู้ ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 370 และ 675 คู่เบส ตามลำดับ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดลองด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ ที่สามารถให้ความจำเพาะในเพศผู้ คือ HB10, HB09, HB12, 844A และ 814 ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 340, 1010, 375, 590 และ 920 คู่เบส ตามลำดับ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องเฉลี่ยของเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์

สำหรับรายงานวิจัยของ Mirbahar *et al.* (2014) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) จำนวน 25 ตัวอย่างในประเทศปากีสถานด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี พบว่าไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอเท่ากับ 79.4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

ทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.636 ถึง 0.950 ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งอินทผลัมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 มี 2 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 มี 23 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ให้เห็นถึงความใกล้ชิดกันของตัวอย่างในแต่ละพื้นที่ในประเทศปากีสถาน พบว่าตัวอย่างที่อยู่ในพื้นที่ปลูกใกล้เคียงกันจะมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Al-Najm *et al*. (2016) ศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอพีบีเอส ทำการศึกษาตัวอย่างของอินทผลัมในประเทศออสเตรเลียและประเทศอิรัก โดยจำนวนตัวอย่างจากประเทศออสเตรเลีย 54 ตัวอย่าง และจากประเทศอิรัก 12 ตัวอย่าง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอเท่ากับ 67.79 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.33 ถึง 0.82 ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งอินทผลัมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยอินทผลัมที่ปลูกในประเทศออสเตรเลียและประเทศอิรักมีการแยกกันอย่างชัดเจนสอดคล้องกับพื้นที่ปลูก และงานวิจัยของ Ahmed *et al*. (2016) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมในประเทศกาตาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ตัวอย่างอินทผลัมทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.32 ถึง 0.96 พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แบ่งอินทผลัมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยแบ่งตามประเทศถิ่นกำเนิดของแต่ละสายพันธุ์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Karim *et al*. (2010) วิเคราะห์ความหลากหลายของอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ในประเทศตูนีเซียทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.30 ถึง 0.75 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยค่าที่ 0.70 สามารถแบ่งอินทผลัมออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามแหล่งที่ปลูก และงานวิจัยของ Haider *et al*. (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมที่ปลูกในประเทศซีเรียด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ตัวอย่างจากอินทผลัมหลายสายพันธุ์จำนวน 23 ตัวอย่าง ผลการทดลองด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 35 ไพรเมอร์ พบว่ามี 9 ไพรเมอร์ ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอเท่ากับ 58.5 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดลองด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอส-เอสอาร์ 15 ไพรเมอร์ มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอเท่ากับ 50.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ข้อมูลของทั้งสองเครื่องหมายมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยมีค่าระหว่าง 0.05 ถึง 0.35 โดยที่ค่า 0.31 สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามประเทศถิ่นกำเนิดของสายพันธุ์ โดยในกลุ่มที่ 1 มีสายพันธุ์มาจากประเทศตูนีเซียและซีเรีย และในกลุ่มที่ 2 มีสายพันธุ์มาจากประเทศอิรัก อิหร่าน อียิปต์ สหรัฐ-อาหรับเอมิเรตส์ และซาอุดีอาระเบีย จากการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างในแต่ละกลุ่มมีความสัมพันธ์กันสูง เนื่องจากมีประเทศที่เป็นแหล่งกำเนิดมาจากในแถบตะวันออกกลางเหมือนกัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Srivashtav *et al*. (2013) ศึกษาถึงความหลากหลายของอินทผลัมในเมืองเคิร์ทของประเทศอินเดีย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีและเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์กับตัวอย่างอินทผลัมจำนวน 8 ตัวอย่าง ทำการทดลองกับเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี 13 ไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไอเอสเอสอาร์ 18 ไพรเมอร์ ผลการทดลองด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอเท่ากับ 39.77 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดลองจากเครื่องหมายโมเลกุลไอ-เอสเอสอาร์ พบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์ ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอน้อยมาก เท่ากับ 23.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำข้อมูลจากทั้งสองเครื่องหมายมาเปรียบเทียบกัน พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีให้แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมได้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้และแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากการรวมข้อมูลทั้ง 2 เครื่องหมาย

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีศึกษาการระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมในอินทผลัม แต่มีการศึกษาพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่นงานวิจัยของ Zhou *et al*. (2011) ศึกษาการระบุความแตกต่างของเพศในหญ้าขน (Buffalograss) (*Buchloe dactyloides*) ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีทั้งหมด 228 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้ Forward primer 12 ไพรเมอร์ และ Reverse primer 19 ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ ME9/EM2 สามารถให้ความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมีย ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่เบส ในเพศเมียและไม่พบในเพศผู้ โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีที่ใช้ในการให้ความแตกต่างในการระบุเพศนี้เป็นวิธีการใหม่ และเป็นวิธีการที่มีความเสถียรมากกว่าเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี ง่ายกว่าวิธีการในเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี และถูกกว่าเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ และงานวิจัยของ Wang *et al*. (2016) ศึกษาการระบุเพศของต้นเบอร์รีแดง (*Idesia polycarpa*) ในต้นเพศเมียโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี วัยเจริญพันธุ์ของต้นกล้าเพศเมียใช้เวลามากถึง 5 หรือ 6 ปี ทำให้ยากที่จะแยกเพศของต้นเพศผู้และเพศเมีย นำตัวอย่างใบอ่อนของต้นเพศผู้ 22 ตัวอย่าง และเพศเมีย 30 ตัวอย่าง มาจากถิ่นกำเนิดที่ต่างกัน 5 แห่ง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีจำนวน 342 คู่ไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการระบุเพศเพียง 1 คู่ไพรเมอร์ คือ ME14/EM8 เท่านั้นที่สามารถแยกได้เฉพาะในตัวอย่างเพศเมียทั้งหมด ชิ้นส่วนนี้มีขนาดประมาณ 210 คู่เบส สำหรับงานวิจัยของ Zhao *et al*. (2016) ศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกีวี่ (*Actinidia*) สายพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างจากกีวี่จำนวน 30 ตัวอย่าง ใช้ไพร-เมอร์ทั้งหมด 90 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Forward primer 9 ไพรเมอร์ และ Reverse primer 10 ไพร-เมอร์ พบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด 292 แถบจากคู่ไพรเมอร์ ME5/EM5 และ ME9/EM12 นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกีวี่ออกได้เป็น 5 กลุ่ม โดยที่ *A. rufa* และ *A. arguta* นี้มีระยะห่างในความสัมพันธ์กันค่อนข้างมาก ต่างจาก *A. chinensis*, *A. deliciosa* และ *A. eriantha* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดและอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และงานวิจัยของวนิตรา (2554) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ที่รวบรวมจากจังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี จำนวน 20 ตัวอย่างที่แตกต่างกันใน 4 พื้นที่ (อ.เมือง อ.พนมทวน อ.ท่าม่วง และ อ.ท่ามะกา) และ 2 สายพันธุ์ (มะรุมอินเดียและมะรุมอินโดนีเซีย) จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 25 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 13 คู่ไพรเมอร์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมด 52 แถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากทั้งหมด 114 แถบ ไพรเมอร์ S1 (ME1/EM1) และ S15 (ME4/EM2) มีค่าน้อยที่สุดคือ 6 แถบ ส่วนไพรเมอร์ S2 (ME1/EM2) มีค่ามากที่สุดคือ 13 แถบ จัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะรุมทั้ง 20 ตัวอย่าง สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 4 และ 5 เป็นตัวอย่างมะรุมจากกาญจนบุรี กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างมะรุมสายพันธุ์อินเดีย และกลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างมะรุมสายพันธุ์อินเดียและอินโดนีเซีย จะเห็นได้ว่าตัวอย่างมะรุมที่มาจากกาญจนบุรีมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ยังพบว่ามะรุมที่รวบรวมจากจังหวัดกาญจนบุรีมีลักษณะ ทางพันธุกรรมแตกต่างจากมะรุมสายพันธุ์อินเดียและอินโดนีเซียอย่างชัดเจน จากงานวิจัยข้างต้นสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างใบของพืชจากสวนอินทผลัมปรีชา จังหวัดนนทบุรี จำนวน 32 ตัวอย่าง ที่ทราบเพศจากการที่เคยออกผลแล้ว โดยทุกต้นเป็นต้นที่มีอายุมากกว่า 3 ปี แบ่งเป็นเพศผู้ 12 ตัวอย่าง และเพศเมีย 20 ตัวอย่าง ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ KL-1 บาฮี ซัลตาน่า กานามิ คาลาส และเมดจูลห์ (ตารางที่ 3.1) ล้างทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง ใส่ถุงซิปล็อคเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 รหัสตัวอย่าง ชื่อสายพันธุ์ และเพศของอินทผลัม

รหัสตัวอย่าง	สายพันธุ์	เพศ	รหัสตัวอย่าง	สายพันธุ์	เพศ
DP1	KL-1	เมีย	DP17	ซัลตาน่า	เมีย
DP2	KL-1	เมีย	DP18	ซัลตาน่า	เมีย
DP3	KL-1	เมีย	DP19	คาลาส	เมีย
DP4	KL-1	เมีย	DP20	เมดจูลห์	เมีย
DP5	KL-1	เมีย	DP21	เมดจูลห์	เมีย
DP6	KL-1	ผู้	DP22	KL-1	เมีย
DP7	KL-1	ผู้	DP23	KL-1	เมีย
DP8	KL-1	ผู้	DP24	KL-1	เมีย
DP9	KL-1	ผู้	DP25	KL-1	เมีย
DP10	KL-1	ผู้	DP26	KL-1	เมีย
DP11	กานามิ	ผู้	DP27	KL-1	ผู้
DP12	กานามิ	ผู้	DP28	KL-1	ผู้
DP13	บาฮี	เมีย	DP29	KL-1	ผู้
DP14	บาฮี	เมีย	DP30	KL-1	ผู้
DP15	บาฮี	เมีย	DP31	KL-1	ผู้
DP16	บาฮี	เมีย	DP32	คาลาส	เมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 Autoclave

3.2.2 Centrifuge

3.2.3 Cooling box

3.2.4 Electrophoresis system (รุ่น Mupid-EXU)

3.2.5 Flask

3.2.6 Forceps

3.2.7 Gel documentation (รุ่น InGenius)

3.2.8 Gloves

3.2.9 Heat block

3.2.10 Hood

3.2.11 Incubator

3.2.12 Micro centrifuge tube 0.2 และ 1.5 ml

3.2.13 Micropipette

3.2.14 Micropipette tip

3.2.15 Microwave

3.2.16 Mortar และ Pestle

3.2.17 Scissors

3.2.18 Spatula

3.2.19 Spectrophotometer

3.2.20 Spin down

3.2.21 Thermal cycler (รุ่น Eppendorf Mastercycler® ep. Gradient S)

3.2.22 Vortex

3.2.23 Water bath

3.3 สารเคมีและสารละลาย

3.3.1 10% CTAB

3.3.2 2X CTAB

3.3.3 10X Standard *Taq* reaction buffer

3.3.4 100 bp DNA ladder และ 1 kb DNA ladder (Vivantis, Malaysia)

3.3.5 6X gel loading dye blue

3.3.6 10X TBE buffer

3.3.7 Agarose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.8 Chloroform

3.3.9 Deionized water

3.3.10 Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs)

3.3.11 Ethanol 70% และ absolute ethanol

3.3.12 Ethidium Bromide (EtBr)

3.3.13 Isoamyl alcohol

3.3.14 Isopropanol

3.3.15 Liquid nitrogen

3.3.16 Magnesium chloride ($MgCl_2$)

3.3.17 β-mercaptoethanol

3.3.18 RNase A

3.3.19 SRAP primer (Li and Quiros, 2001) (ตารางที่ 3.2)

3.3.20 *Taq* DNA polymerase (BioLabs, England)

3.3.21 TE Buffer

ตารางที่ 3.2 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Li and Quiros, 2001)

ชนิด	ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
Forward primer	ME1	TGAGTCCAAACCGGATA
	ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC
	ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT
	ME4	TGAGTCCAAACCGGACC
	ME5	TGAGTCCAAACCGGAAG
Reverse primer	EM1	GACTGCGTACGAATTAAT
	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC
	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอจะใช้ส่วนใบของต้นอินทผลัมในการสกัด โดยนำตัวอย่างใบมาล้างทำความสะอาด เช็ดให้แห้ง จากนั้นตัดใบของอินทผลัมด้วยกรรไกรให้มีขนาดเล็ก โดยใช้ส่วนกลางใบ นำมาบดลดขนาดให้เล็กลงด้วยไนโตรเจนเหลว ย้ายตัวอย่างที่ลดขนาดแล้วใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีของ Doyle and Doyle (1987) เติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ พันปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ถึง 90 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 ถึง 15 นาที หลังจากบ่มครบเวลาแล้วนำมาเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในตู้ดูดควันกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที เมื่อบ่มครบเวลาแล้วนำมาเติม 10% CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่เย็นจัด โดยปริมาตร 1: 1 (v/v) ของสารละลายส่วนใส เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ กลับหลอดไปมาเบาๆ จากนั้นนำไปแช่ในตู้ที่อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส โดยแช่ไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชูเพื่อซับสารละลายที่ยังเหลือออกให้หมด เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชูเพื่อซับสารละลายที่ยังเหลือออก หรือนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาทีหรือจนกว่าหลอดจะแห้งเพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งไวยิ่งขึ้น จากนั้นเติม TE Buffer ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 35 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส เมื่อได้ดีเอ็นเอนำมาทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ในการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้ เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และการวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสง

เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส สำหรับใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยชั่งผงอะกาโรสตามปริมาณที่คำนวณ จากนั้นเติมสารละลาย 1X TBE buffer ลงไปตามปริมาตรที่คำนวณ เช่น ต้องการเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ต้องชั่งผงอะกาโรส 0.2 กรัม แล้วเติม 1XTBE buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายโดยใช้ไมโครเวฟจนละลายเหลวใสเป็นเนื้อเดียวกัน เจลอะกาโรสที่ได้จะมีความเข้มข้นตามที่ต้องการ จากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงไปในหลุม เมื่อหยอดครบทุกหลุมแล้วทำการปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ เวลา 45 นาที เมื่อครบเวลาให้นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 ถึง 15 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง gel documentation และถ่ายภาพโดยใช้ชุดถ่ายภาพเจล SYSGENE InGenuis Bio Imaging ร่วมกับโปรแกรม GeneSnap

การวัดปริมาณของดีเอ็นเอโดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสง สำหรับวิธีการวัดปริมาณของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำได้โดยการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวัด ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 297 ไมโครลิตร (dilution factor เท่ากับ 100) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่า Optical Density (OD) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นค่ามาตรฐาน (Blank) แล้วนำมาคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น และปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร หรือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซ้ำอีกครั้ง ทำการตรวจสอบคุณภาพโดยดูจากอัตราส่วนของค่า A_{260} / A_{280} ค่าที่ได้มีค่าระหว่าง 1.8 ถึง 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นบริสุทธิ์ ถ้าค่าที่ได้นั้นน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนเจือปนอยู่ในสารละลาย และหากค่าที่ได้มากกว่า 2.0 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอนั้นมีอาร์เอ็นเอเจือปนอยู่

3.4.3 การระบุเพศของอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในเบื้องต้นเพื่อหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ Forward 5 แบบ และ Reverse 6 แบบ (Li and Quiros, 2001) (ตารางที่ 3.2) นำมาจับคู่กันเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม รวมทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ ใช้ในการระบุเพศของอินทผลัมในตัวอย่างสายพันธุ์ KL-1 ที่มีทั้งเพศผู้ 5 ตัวอย่าง และเพศเมีย 5 ตัวอย่าง รวม 10 ตัวอย่าง เพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและปรากฏความต่างของแถบดีเอ็นเอ เมื่อได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจะนำมาระบุเพศของอินทผลัมกับตัวอย่างดีเอ็นเอสายพันธุ์ KL-1 ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยเจือจางดีเอ็นเอทุกตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบ (ตารางที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3) ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น Eppendorf Mastercycler® ep Gradient S โดยมีขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ตารางที่ 3.4) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงวิธีใช้ในข้อ 3.4.2 โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1XTBE Buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 ถึง 50 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐานขนาดช่วง 100 คู่เบส

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (ดัดแปลงจาก Zhang *et al.*, 2013)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Standard *Taq* reaction Buffer	10X	1X	2
dNTPs	1.25 mM	200 µM	4
$MgCl_2$	50 mM	2.5 mM	1
Forward primer	100 pmol	20 pmol	1
Reverse primer	100 pmol	20 pmol	1
Taq DNA Polymerase	5000 unit/ml	1 unit	0.2
DNA template	50 ng/µl	100 ng/µl	2
DI water	-	-	8.8
ปริมาตรรวม	-	-	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Abedian *et al.*, 2012)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	94	3	1
Denaturation	94	1	
Annealing	35	1	5
Extension	72	1	
Denaturation	94	1	
Annealing	50	1	35
Extension	72	1	
Final extension	72	10	1
Cool down	4		

3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมโดยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมนี้จะใช้คู่ไพรเมอร์ที่ได้จากการคัดเลือก 30 คู่ไพรเมอร์ มา 4 คู่ไพรเมอร์ ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างและแถบดีเอ็นเอมีความคมชัด คือ คู่ไพรเมอร์ ME4/EM2, ME4/EM3, ME4/EM5 และ ME5/EM2 มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างอินทผลัมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ จำนวน 32 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างอินทผลัมมาใช้จำนวน 30 ตัวอย่าง ได้แก่ สายพันธุ์ KL-1 จำนวน 20 ตัวอย่าง สายพันธุ์กานามิ จำนวน 2 ตัวอย่าง สายพันธุ์บาฮี จำนวน 2 ตัวอย่าง สายพันธุ์ซัลตาน่า จำนวน 2 ตัวอย่าง สาย-พันธุ์คาลาส จำนวน 2 ตัวอย่าง และสายพันธุ์เมดจูลห์ จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยเจือจางดีเอ็นเอทุกตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบดังตารางที่ 3.3 แต่เพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้เป็น 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Eppendorf รุ่น Mastercycler® ep Gradient S โดยมีขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ตารางที่ 3.4) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงวิธีใช้ในข้อ 3.4.2 โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1XTBE Buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 ถึง 50 นาที โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน (DNA marker) ขนาด 100 คู่เบส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงวิธีในข้อ 3.4.5

เมื่อได้ลักษณะแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีในแต่ละคู่ไพรเมอร์ นำไฟล์ภาพมาทำการปรับแต่งปริมาณแสงและความคมชัดของภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CC 2015 จากนั้นสร้างแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละตัวอย่างเพื่อให้ได้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอินทผลัมที่ใช้ในการศึกษา

3.4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

เมื่อได้แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ทำการแปลผลโดยการให้คะแนนแบบ binary data matrix คือ ที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเท่ากับ 1 และหากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้คะแนนเท่ากับ 0 จากนั้นนำคะแนนที่ได้จากการนับมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11 (Rohlf, 2000) โดยใช้วิธี Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) แสดงผลออกมาในรูปแบบของแผนภาพความสัมพันธ์ (Dendrogram)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

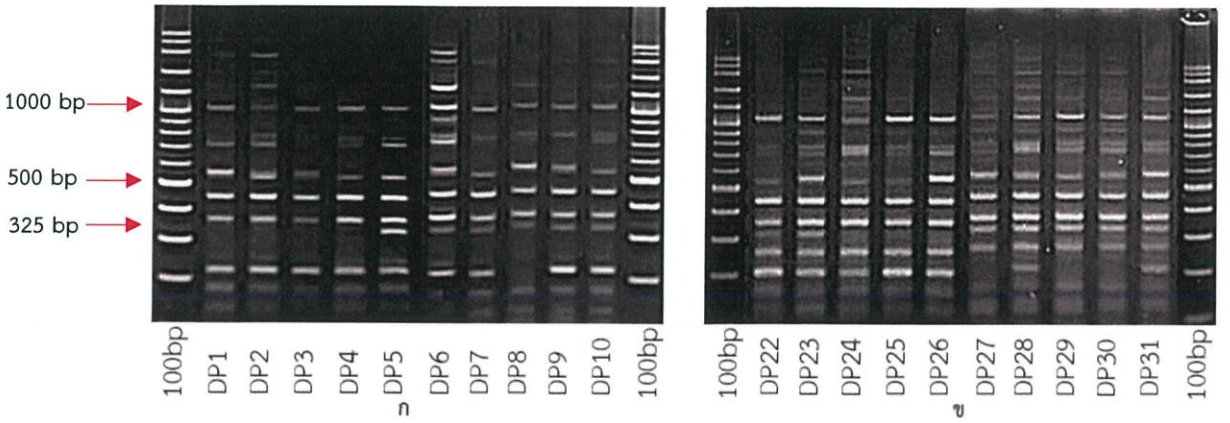
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

4.1.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศของอินทผลัม

งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาและคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีสำหรับใช้ในการระบุเพศของอินทผลัม โดยใช้อินทผลัมสายพันธุ์ KL-1 จำนวน 10 ตัวอย่าง เป็นเพศเมีย 5 ตัวอย่าง (DP1 ถึง DP5) และเพศผู้ 5 ตัวอย่าง (DP6 ถึง DP10) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.2) หลังจากการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามี 1 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเพศผู้และเพศเมียได้ สามารถระบุเพศได้ถูกต้อง 9 ตัวอย่าง โดยมีข้อผิดพลาด 10 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.1ก) คือ คู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 ที่ขนาดประมาณ 325 คู่เบส จึงทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งกับตัวอย่างใหม่ของสายพันธุ์ KL-1 จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเพศเมีย 5 ตัวอย่าง (DP22 ถึง DP26) และเพศผู้ 5 ตัวอย่าง (DP27 ถึง DP31) พบว่าผลที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 นี้มีโอกาสที่จะระบุเพศได้เนื่องจากระบุเพศได้ถูกต้องจำนวน 17 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยมีข้อผิดพลาด 15 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.1ข) จึงทำให้การศึกษาการระบุเพศของอินทผลัมนี้มีโอกาสหาคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเพศผู้และเพศเมียได้ ดังงานวิจัยของ Wang *et al.* (2016) ศึกษาการระบุเพศของต้นเบอร์รี่แดง (*Idesia polycarpa*) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีทั้งหมด 342 คู่ไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการระบุเพศเพียง 1 คู่ไพรเมอร์ คือ ME14/EM8 เท่านั้น ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 210 คู่เบส มีปรากฏเฉพาะในเพศเมีย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zhou *et al.* (2011) ศึกษาการระบุความแตกต่างของเพศในหญ้าขน (Buffalograss)(*Buchloe dactyloides*) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีทั้งหมด 228 คู่ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ ME9/EM2 ที่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่เบส สามารถให้ความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมีย โดยจะพบแถบดีเอ็นเอในเพศเมียเท่านั้นแต่ไม่พบในเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แถบดีเอ็นเอของอินทผลัมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์-เอพี โดยคู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 (ก) แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเพศผู้และเพศเมียได้ถูกต้อง 9 ตัวอย่าง และ (ข) แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเพศผู้และเพศเมียได้ถูกต้อง 8 ตัวอย่าง

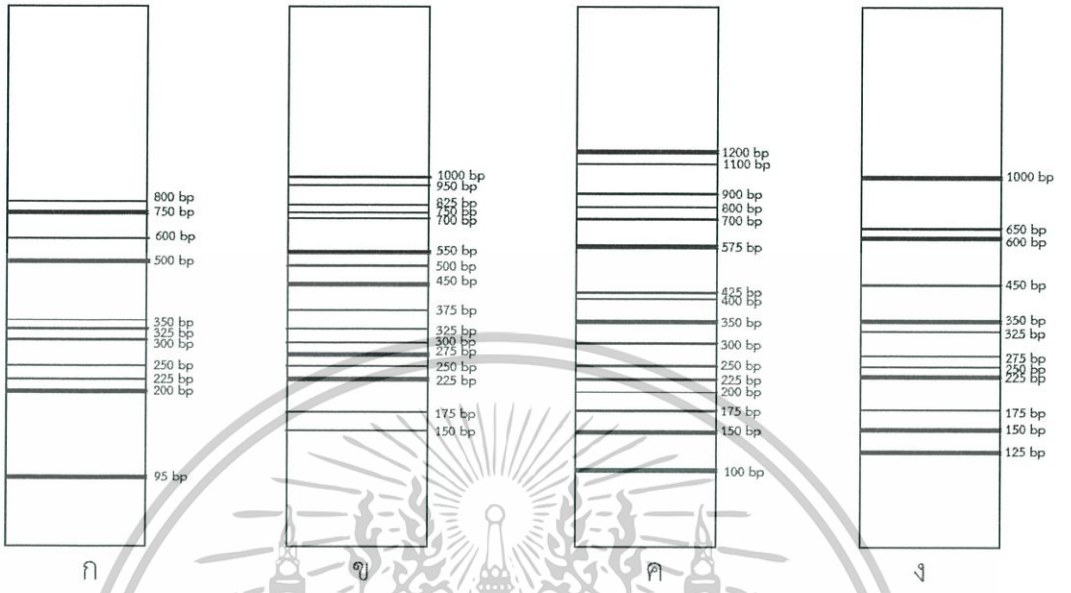
4.1.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีในอินทผลัมจำนวน 30 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 32 ตัวอย่าง โดยใช้เป็นสายพันธุ์ KL-1 จำนวน 20 ตัวอย่าง (DP1 ถึง DP10 และ DP22 ถึง DP31) สายพันธุ์กานามิ จำนวน 2 ตัวอย่าง (DP11 และ DP12) สายพันธุ์บาฮี จำนวน 2 ตัวอย่าง (DP13 และ DP14) สายพันธุ์ซัลตาน่า จำนวน 2 ตัวอย่าง (DP17 และ DP18) สายพันธุ์คาลาส จำนวน 2 ตัวอย่าง (DP19 และ DP32) และสายพันธุ์โมดจูลห์ จำนวน 2 ตัวอย่าง (DP20 และ DP21) นำมาศึกษาด้วย 4 คู่ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างและแถบดีเอ็นเอมีความคมชัด คือ ME4/EM2 ME4/EM3 ME4/EM5 และ ME5/EM2 ที่ได้คัดเลือกมาจาก 30 คู่ไพรเมอร์

หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ แต่ละคู่ไพรเมอร์มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ปรากฏขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 95 ถึง 1200 คู่เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 55 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 13.75 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 38 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 68.84 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 และ ME4/EM5 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 16 แถบ ส่วนคู่ไพรเมอร์ ME4/EM2 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 11 แถบ และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันมากที่สุด คือ ME5/EM2 มีจำนวน 10 แถบ คิดเป็น 83.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันน้อยที่สุด คือ ME4/EM2 มีจำนวน 6 แถบ คิดเป็น 54.54 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.2) โดยคู่ไพรเมอร์ที่แสดงเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนและบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี ดังนั้น 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่ไพรเมอร์นี้มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัมได้



รูปที่ 4.2 ดีเอ็นเอโปรไฟล์ของอินทผลัมจำนวน 30 ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี ได้แก่ (ก) คู่ไพรเมอร์ ME4/EM2 (ข) คู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 (ค) คู่ไพรเมอร์ ME4/EM5 และ (ง) คู่ไพรเมอร์ ME5/EM2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

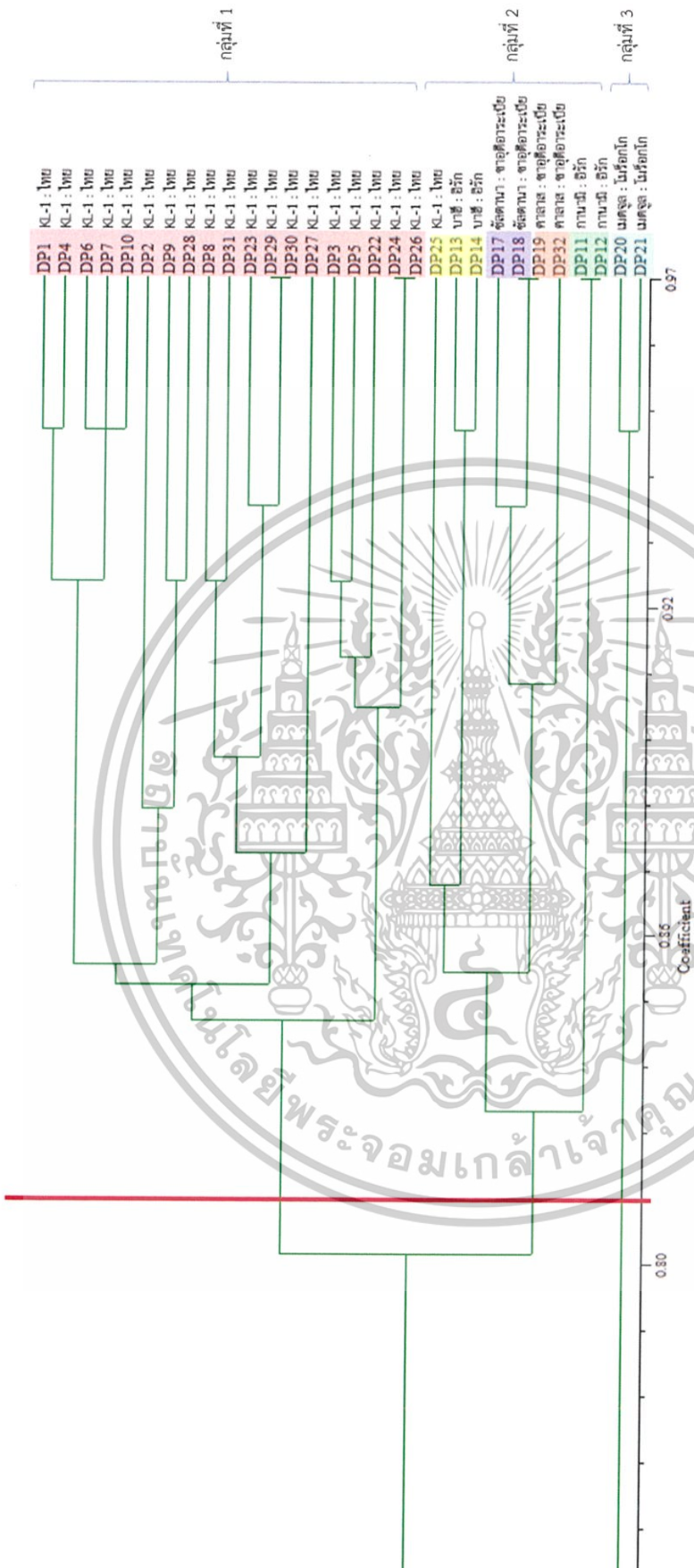
ตารางที่ 4.1 ชนิดของไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของอินทผลัมจำนวน 30 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

ชนิดของไพรเมอร์	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (คู่เบส)	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	เปอร์เซ็นต์ polymorphism
ME4/EM2	95-800	11	6	54.54
ME4/EM3	150-1000	16	10	62.50
ME4/EM5	100-1200	16	12	75.00
ME5/EM2	125-1000	12	10	83.33
รวม	-	55	38	275.37
จำนวนเฉลี่ย	-	13.75	9.5	68.84

เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างอินทผลัม จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11 (Rohlf, 2000) โดยใช้วิธี Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) ซึ่งแสดงผลในรูปของแผนภาพแสดงความสัมพันธ์พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.75 ถึง 0.97 โดยที่ค่า 0.81 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างอินทผลัมเป็น 3 กลุ่ม ตามถิ่นกำเนิดของสายพันธุ์

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างสายพันธุ์ KL-1 ทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศไทย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างสายพันธุ์ KL-1 จำนวน 1 ตัวอย่าง สายพันธุ์บาฮี สายพันธุ์ซัลตาน่า สายพันธุ์คาลาส และสายพันธุ์กานามิที่มีถิ่นกำเนิดจากตะวันออกกลาง ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มที่ 2.1 ประกอบด้วยตัวอย่างสายพันธุ์ KL-1 (DP25) และสายพันธุ์บาฮี (DP13 และ DP14) ที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศไทยและอิรัก พบว่าสายพันธุ์ KL-1 ที่มาปะปนกับสายพันธุ์บาฮีเป็นผลมาจากการพัฒนาสายพันธุ์ของ KL-1 ที่พัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์โดยคุณศักดิ์ ลำจวน เกิดจากการผสมต้นอินทผลัมเพศเมียสายพันธุ์บาฮีกับอินทผลัมเพศผู้สายพันธุ์ต่างๆ จึงทำให้ตัวอย่าง DP25 นี้มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับตัวอย่างสายพันธุ์บาฮี กลุ่มที่ 2.2 ประกอบด้วยตัวอย่างสายพันธุ์ซัลตาน่า (DP17 และ DP18) ที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศซาอุดิอาระเบีย กลุ่มที่ 2.3 ประกอบด้วยตัวอย่างสายพันธุ์คาลาส (DP19 และ DP32) ที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศซาอุดิอาระเบีย และกลุ่มที่ 2.4 ประกอบด้วยตัวอย่างสายพันธุ์กานามิ (DP11 และ DP12) ที่มีถิ่นกำเนิดจากตะวันออกกลาง และสุดท้ายกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายพันธุ์เมดจูลห์ (DP20 และ DP21) ที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศโมร็อกโก (รูปที่ 4.3)

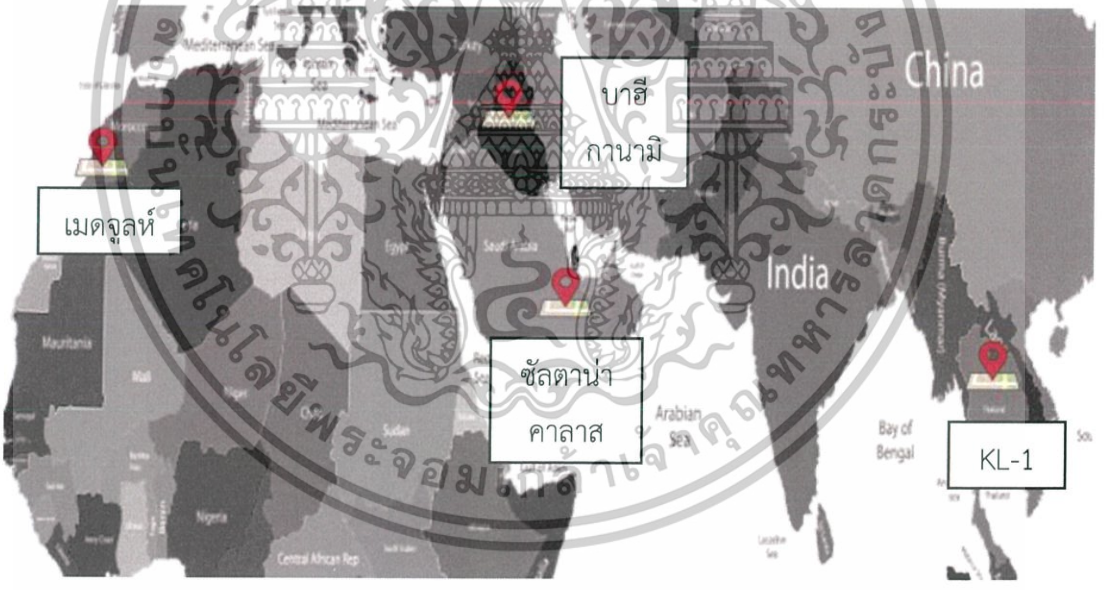
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของอินทผลัมจำนวน 30 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 4 คู่ไพรเมอร์ โดยการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อดูความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม พบว่าในแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยตัวอย่างที่มีถิ่นกำเนิดจากในแหล่งของสายพันธุ์เดียวกัน และกลุ่มย่อยล้วนเป็นตัวอย่างเฉพาะในสายพันธุ์นั้นๆ และตัวอย่างในกลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างที่แยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจนจากตัวอย่างในสายพันธุ์อื่นๆ เป็นไปได้ว่าอาจไม่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาเนื่องจากต้นกำเนิดของสายพันธุ์แยกออกมาอย่างเด่นชัด จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างในแต่ละกลุ่มที่นำมาวิเคราะห์มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ชัดเจนในแต่ละสายพันธุ์และถิ่นกำเนิด (รูปที่ 4.4) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Al-Najm *et al*. (2016) ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอพีบีเอสทำการศึกษาตัวอย่างของอินทผลัมในประเทศออสเตรเลียและประเทศอิรัก สามารถแบ่งอินทผลัมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 6 กลุ่มย่อย ตามสถานที่เก็บตัวอย่าง โดยอินทผลัมที่ปลูกในประเทศออสเตรเลียและประเทศอิรักมีการแยกกันอย่างชัดเจนสอดคล้องกับพื้นที่ปลูก และจากข้อมูลของคุณปรีชา (2560) ที่กล่าวไว้ว่า สายพันธุ์ของอินทผลัมมีผลต่อคุณภาพของผลผลิต คือ เมล็ดเล็ก เนื้อเยอะ ขนาดผลพอเหมาะ และที่สำคัญต้องมีรสชาติอร่อย โดยได้รับการยอมรับจากทุกคนว่าอร่อย หากนำเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีนี้มาใช้ตรวจสอบ จัดจำแนก และปรับปรุงสายพันธุ์ จะสามารถพัฒนาผลผลิตอินทผลัมในอนาคตได้



รูปที่ 4.4 ประเทศถิ่นกำเนิดของอินทผลัมทั้ง 6 สายพันธุ์
(ที่มา:https://png.pngtree.com/element_origin_min_pic/cbca4bd0262)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการระบุเพศของอินทผลัมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ จำนวน 32 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างอินทผลัมสายพันธุ์ KL-1 จำนวน 20 ตัวอย่าง เป็นเพศเมีย 10 ตัวอย่าง และเพศผู้ 10 ตัวอย่าง ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี คัดเลือกคู่ไพร-เมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีสำหรับใช้ในการระบุเพศของอินทผลัม สามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้เพียง 1 คู่ไพรเมอร์คือ ME4/EM3 โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 325 คู่เบส ที่แสดงความแตกต่างระหว่างเพศ จึงทำให้มีโอกาสที่คู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 จะใช้ระบุเพศได้ สามารถระบุเพศได้ถูกต้องจำนวน 17 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นเปอร์เซนต์ความผิดพลาด 15 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ 4 คู่ ไพรเมอร์ คือ คู่ไพรเมอร์ ME4/EM2 ME4/EM3 ME4/EM5 และ ME5/EM2 มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างอินทผลัมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์ปรากฏขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 95 ถึง 1200 คู่เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 55 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 13.75 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 38 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 68.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11 โดยใช้วิธี UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.75 ถึง 0.97 โดยที่ค่า 0.81 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างอินทผลัมเป็น 3 กลุ่ม ที่แสดงความสัมพันธ์กับประเทศถิ่นกำเนิดในแต่ละสายพันธุ์

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์เอสอาร์เอพีในการทดสอบการระบุเพศ และเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีนี้สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จัดจำแนก และปรับปรุงสายพันธุ์ของอินทผลัมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จารุฉัตร เขนยทิพย์. 2558. “วิจัยและพัฒนาพันธุ์อินทผลัม.” กรมวิชาการเกษตร. 1-26.

ภัทราภรณ์ ทรัพย์อุดมมาก, นงลักษณ์ คงศิริ, อลิษา ภู่ประเสริฐ, เกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์ และราตรี บุญเรืองรอด. 2559. “การพัฒนาวิธีการระบุเพศมะละกอในระยะต้นกล้าต้นทุนต่ำ.” กรุงเทพฯ : วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 34(3) : 33-38.

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์. 2554. “การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี.” ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วินิตรา เชิงแก้ว. 2554. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะรุมที่รวบรวมจากจังหวัดกาญจนบุรีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SRAP.” วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-32.

สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์, ประมณฑ์ ธรรมศักดิ์, ทวีเกียรติ ยิ้มสวัสดิ์, โสพส จินดาประเสริฐ, ไพฑูรย์ กิจเภาสงค์, แววจักร กองพลพรหม, ไสว สุหร่าย และจิตต์ อิสรีย์. 2534. “การศึกษาอินทผลัมในสภาพภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.” กรุงเทพฯ : วารสารแก่นเกษตร. 19(4) : 184-190.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. “เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.” กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-269.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. “เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช.” วารสารวิชาการ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

อภิชาต ศรีสะอาด และพัชรี สำโรงเย็น. 2560. **อินทผลัมผลสด.** กรุงเทพฯ : นาคา อินเตอร์มีเดีย.

“อินทผลัมกินผลที่เชียงใหม่.” 2549. วารสารเคหการเกษตร. 61 : 67-68.

Abedian, M. Talebi, M. Golmohammdi, H. and Sayed, T.B. 2012. “Genetic Diversity and Population Structure of Mahaleb Cherry (*Prunus mahaleb* L.) and Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP Markers.” Biochemical Systematics and Ecology. 40(1) : 112–117.

Ahmed, A.T. and Al-Hadidi, S. 2016. “Molecular Characterization of Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.) using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers.” The Fifth International Date Palm. 161-166.

Al-Ameri, A.A. Al-Qurainy, F. Gaafar, Z.A. Khan, S. and Nadeem, M. 2016. “Male Specific Gene Expression in Dioecious *Phoenix dactylifera* (Date Palm) Tree at Flowering Stage.” Pakistan Journal of Botany. 48(1) : 131-135.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Al-Ameri, A.A. Al-Qurainy, F. Gaafar, Z.A. Khan, S. and Nadeem M. 2016. "Molecular Identification of Sex in *Phoenix dactylifera* using Inter Simple Sequence Repeat Markers." BioMed Research International. 1-5.

Al-Faifi, A.S. Migdadi, M.H. Algamdi, S.S. Khan, A.M. Ammar, H.M. Al-Obeed, S.R. Al-Thamra, I.M. El-Harty, H.E. and Jakse, J. 2016. "Development, Characterization and Use of Genomic SSR Markers for Assessment of Genetic Diversity in some Saudi Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars." Electronic Journal of Biotechnology. 21 : 18-25.

Al-Mahmoud, E.M. Al-Dous, K.E. Al-Azwani, K.E. and Malek, A.J. 2012. "DNA-based Assays to Distinguish Date Palm (Arecaceae) Gender." American Journal of Botany. e7-e10.

Al-Najm, A. Luo, S. Ahmad, M.N. and Trethowan, R. 2016. "Molecular Variability and Genetic Relationships of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars Based on inter-Primer Binding Site (iPBS) Markers." Australian Journal of Crop Science. 10(15) : 732-740.

Arabnezhad, H. Bahar, M. Mohammadi, R.H. and Latifian, M. 2012. "Development, Characterization and Use of Microsatellite Markers for Germplasm Analysis in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.)." Scientia Horticulturae. (134) : 150-156.

Bekheet, A.S. and Hanafy, S.M. 2014. "Towards Sex Determination of Date Palm." Date Palm Biotechnology. 551-566.

Chao, T.C. and Krueger, R.R. 2007. "the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) : Overview of Biology, Uses, and Cultivation." HortScience. 42(5) : 1077-1082.

Cherif, E. Zehdi, S. Castillo, K. Chabrillange, N. Abdoulkader, S. Pintaud, J. Santoni, S. Salhi-Hannachi, A. Glemin, S. and Aberlenc-Bertossi, F. 2012. "Male-specific DNA Markers Provide Genetic Evidence of an XY Chromosome System, a Recombination Arrest and Allow the Tracing of Paternal Lineages in Date Palm." New Phytologist. 1-8.

Dhawan, C. Kharb, P. Sharma, R. Uppal, S. and Aggarwal, R.K. 2013. "Development of Male-specific SCAR Marker in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.)." Tree Genetic and Genome. 9 : 1143-1150.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Doyle, J.J and Doyle, J.L. 1987. "a Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue." Phytochemical Bulletin. 19 : 11-15.

Ferriol, M. Pico, B. Cordova, P. and Nuez, F. 2004. "Molecular Diversity of a Germplasm Collection of Squash (*Cucurbita moschata*) Determined by SRAP and AFLP Markers." Crop Science. 44 : 653–664.

Garcia, A.A.F. Benchimol, L.L. Barbosa, A.M.M. Geraldi, I.O. Souza Jr, C.L. and Souza, P.A. 2004. "Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR Markers for Diversity Studies in Tropical Maize Inbred Lines." Genetics and Molecular Biology. 27(4) : 579-588.

Haider, N. Nabulsi, I. and MirAli, N. 2012. "Phylogenetic Relationships among Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars in Syria using RAPD and ISSR Markers." Journal of Plant Biology Research. 1(2) : 12-24.

Karim, K. Chokri, B. Amel, S. Wafa, H. Richid, H. and Nouredine, D. 2010. "Genetic Diversity of Tunisian Date Palm Germplasm using ISSR Markers." International Journal of Botany. 6(2) : 182-186.

Li, G. and Quiros, F.C. 2001. "Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP), a New Marker System Based on a Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica." Theoretical and Applied Genetics. 455–461.

Li, G. McVetty, E.B.P. and Quiros, F.C. 2013. "SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science." InTech. 24-25.

Li, S. Wang, L. Deng, C. and Gao, W. 2017. "Identification of Male-specific AFLP and SCAR Markers in the Dioecious Plant *Humulus scandens*." Molecular and Cellular Probes. 1-3.

Mirbahar, A.A. Khan, S. Markhand, S.G. Kauser, N. and Saeed, R. 2016. "DNA Fingerprinting of some Pakistani Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.) Cultivars using ISSR Markers." Pakistan Journal of Botany. 48(5) : 2005-2010.

Mirbahar, A.A. Markhand, S.G. Khan, S. and Abul- Soad, A.A. 2014. "Molecular Characterization of some Pakistani Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars by RAPD Markers." Pakistan Journal of Botany. 46(2) : 619-625.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Patil, G.C. Baratakke, C.R. and Sandigwad, M.A. 2012. "Development of a RAPD-based SCAR Marker for Sex Identification in *Momordica dioica* Roxb." Israel Journal of Plant Sciences. (60) : 457-465.

Qacif, N. Baaziz, M. and Bendiab, K. 2007. "Biochemical Investigations on Peroxidase Contents of Male and Female Inflorescences of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.)." Scientia Horticulturae. (114) : 298-301.

Rohlf, F.J. 2000. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exter Software**. New York : Setauket.

Sabri, S.M.J. Abo-Aba, S. Bafeel, S. Zari, A.T. Edris, S. Shokry, M.A. Atef, A. Gadalla, O.N. Ramadam, M.A. Al-Kordy, A.M. El-Domyati, M.F. Jansen, K.R. and Bahieldin, A. 2014. "Characterization of Ten Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR Markers." Comptes Rendus Biologies. (337) : 6-18.

Srivashtav, S.V. Kapadia, V.C. Mahatma, K.M. Jha, K.S. and Ahmed, T. 2013. "Genetic Diversity of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the Kutch Region of India using RAPD and ISSR Markers." Journal Food Agric. 25(11) : 798-806.

Tautz, D. 1989. "Hypervariability of Simple Sequences as a General Source of Polymorphic DNA Markers." Nucleic Acids Res. 17 : 6463-6471.

Vyskot, B. and Hobza, R. 2015. "the Genomics of Plant Sex Chromosomes." Plant Science. (236) : 126-135.

Wang, H.S. Li, Y. Li, Z.Q. Chang, L. and Li, L. 2015. "Identification of an SCAR Marker Related to Female Phenotype in *Idesia polycarpa* Maxim." Genetics and Molecular Researches. 14(1) : 2015-2022.

Williams, G.K.J. Kubelik, R.A. Livak, J.K. Rafalski, A.J. and Tingey, V.S. 1990. "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are useful as Genetic Markers." Nucleic Acids Research. 18(22) : 6531-6535.

Younis, A.A.R. Ismail, M.O. and Soliman, S.S. 2008. "Identification of Sex-specific DNA Markers for Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) using RAPD and ISSR Techniques." Journal of Agriculture and Biological Sciences. 4(4) : 278-284.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Zehdi, S. Cherif, E. Rhouma, S. Santoni, S. Hannachi, S.A. and Pintaud, C.J. 2012. "Molecular Polymorphism and Genetic Relationships in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.): the Utility of Nuclear Microsatellite Markers." Scientia Horticulturae. (148) : 255-263.

Zhang, B.J. Wang, X.P. and Chen, J.M. 2013. "Analysis of Genetic Diversity among Chinese Wild Vitis Species Revealed with SSR and SRAP markers." Genetics and Molecular Researchers. 12(2) : 1962-1973.

Zhao, B.J. Ming, X. and Yu, S.L. 2016. "Genetic Diversity and Relationships between and Within Kiwifruit *(Actinidia)* Wild Species and Cultivated Varieties using SRAP Markers." International Journal of Biochemistry Research and Review. 15(3) : 1-7.

Zhou, Y. Wang, X. and Zhang, X. 2011. "Development and Application of a SRAP Marker for the Identification of Sex in *Buchloe dactyloides*." Euphytica. (181) : 261-266.

Zietkiewicz, E. Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. "Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification." Gonomics. 20 : 176-183.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย 2X CTAB buffer (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 2 กรัม
2. 5.0 M NaCl 28 มิลลิลิตร
3. 0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 4 มิลลิลิตร
4. 1 M Tris-HCl 10 มิลลิลิตร
5. Polyvinyl pyrolidone (PVP) 1 กรัม
6. Deionized water

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมสารละลาย 5.0 M NaCl 0.5 M EDTA pH8 และ Deionized water พร้อมกับกระบอกตวง ขวดดูแรน บีกเกอร์ และ magnetic bar นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่ง CTAB 2 กรัม และ PVP 1 กรัม ละลายด้วย 5.0 M NaCl ปริมาตร 28 มิลลิลิตร และเติม 0.5 M EDTA pH8 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารให้เข้ากันในบีกเกอร์โดยใช้ magnetic stirrer
3. ปรับปริมาตรด้วย Deionized water ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้

1. RNase A 20 มิลลิกรัม
2. Deionized water

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง RNase A 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม Deionized water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารให้เข้ากัน

3. การเตรียม 10% CTAB ใน 0.7 NaCl (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 10 กรัม
2. 0.7 M NaCl 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมสารละลาย 0.7 M NaCl พร้อมกับกระบอกตวง ขวดดูแรน บีกเกอร์ และ magnetic bar นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่ง CTAB 10 กรัม ละลายด้วย 0.7 M NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารให้เข้ากันในบีกเกอร์โดยใช้ magnetic stirrer

4. การเตรียม 10X TBE buffer (ปริมาตร 1 ลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Tris-base	108	กรัม
2. Boric acid	61.83	กรัม
3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	9.305	กรัม
4. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ		

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Tris-base 108 กรัม Boric acid 61.83 กรัม และ EDTA 9.305 กรัม
2. ละลายด้วยน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1 ลิตร
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้เท่ากับ 8
4. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียม 1X TBE buffer (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. 10X TBE buffer	50	มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	450	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปต 10X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร

6. การเตรียม TE buffer (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. 1.0 M Tris-HCl pH8	100	ไมโครลิตร
2. 0.5 M EDTA pH8	20	ไมโครลิตร
3. น้ำกลั่น	9.88	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปต 1.0 M Tris-HCl pH8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.5 M EDTA pH8 20 ไมโครลิตร
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร
3. นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. การเตรียม 1.25 mM dNTPs (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1.	100 mM dATP	1.25 ไมโครลิตร
2.	100 mM dCTP	1.25 ไมโครลิตร
3.	100 mM dGTP	1.25 ไมโครลิตร
4.	100 mM dTTP	1.25 ไมโครลิตร
5.	Deionized water	95 ไมโครลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปต Deionized water ปริมาตร 95 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 100 mM dATP dCTP dGTP และ dTTP สารละ 1.25 ไมโครลิตร
2. ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex)

8. การเตรียมไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคโมเลกุลเอสอาร์เอพี แต่ละไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 pmol (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1.	100 pmol ไพรเมอร์เอสอาร์เอพี	20 ไมโครลิตร
2.	Deionized water	80 ไมโครลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปต Deionized water ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 100 pmol ไพรเมอร์เอสอาร์เอพี ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
2. ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

9. การเตรียม Ethidium bromide staining (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร) 0.5 มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น 499.5 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตสารละลาย Ethidium bromide เข้มข้น 10 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
2. ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร โดยเขย่าถาดไปมาเล็กน้อยเพื่อให้สารละลายเข้ากันดียิ่งขึ้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

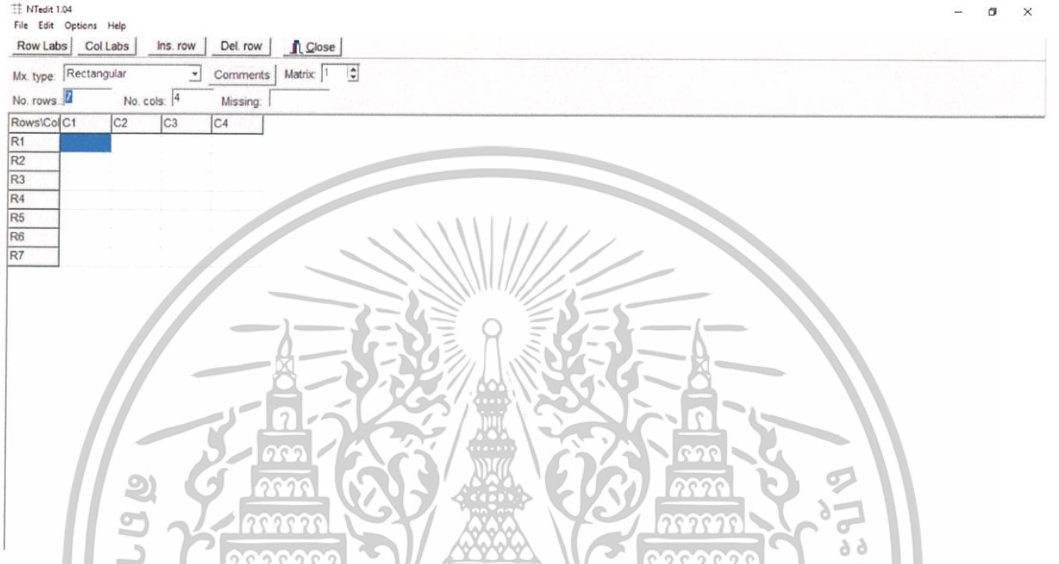
ภาคผนวก ข

วิธีการใช้โปรแกรม

การใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.11 ด้วยวิธีการวิเคราะห์โดยจัดรูปแบบแบบ UPGMA

1. แปลงไฟล์จาก .xls เป็น .NTS เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในโปรแกรม NTSYSpc version 2.11

1.1 เปิดโปรแกรม ntedit

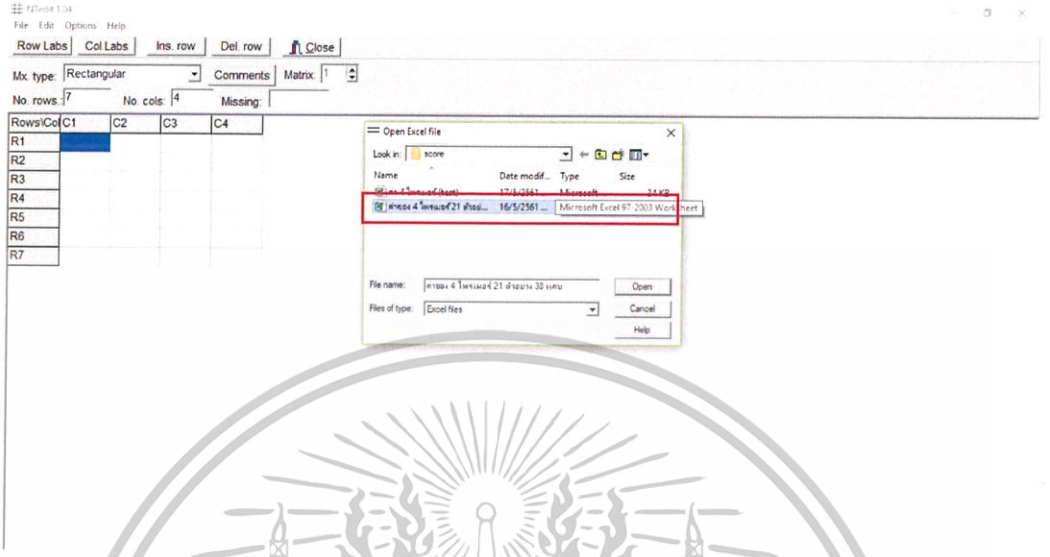


1.2 เลือกที่ Import Excel

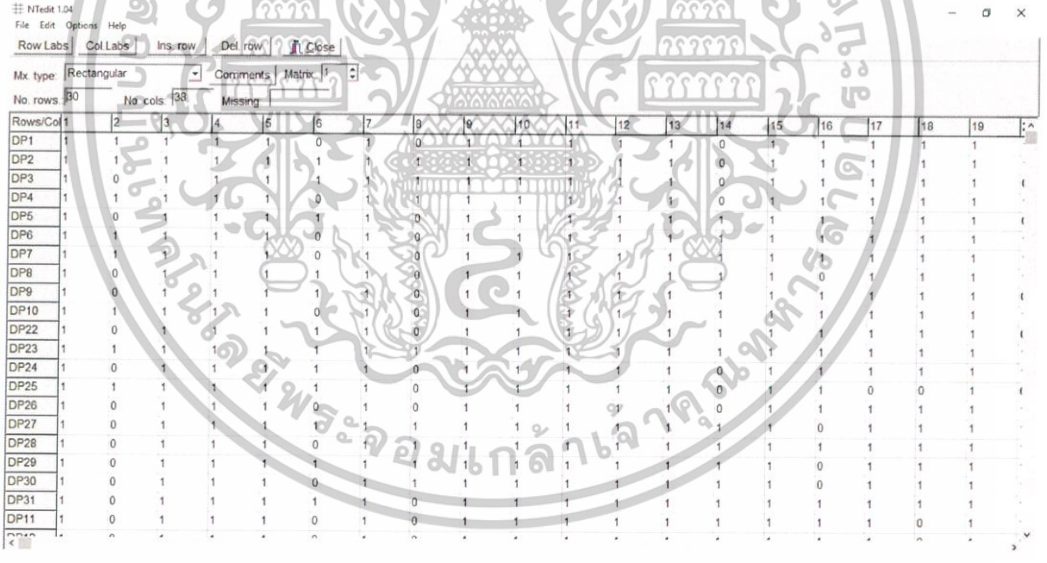
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

1.3 เลือกไฟล์ที่จะใช้งาน .xls version 2003 worksheet กด Open



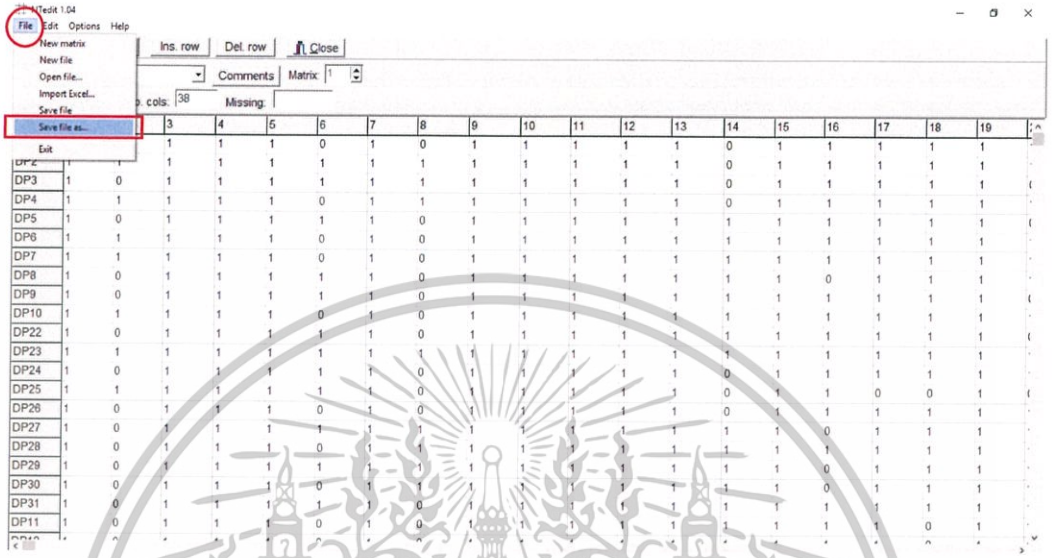
1.4 โปแกรมจะแสดงค่าจากไฟล์



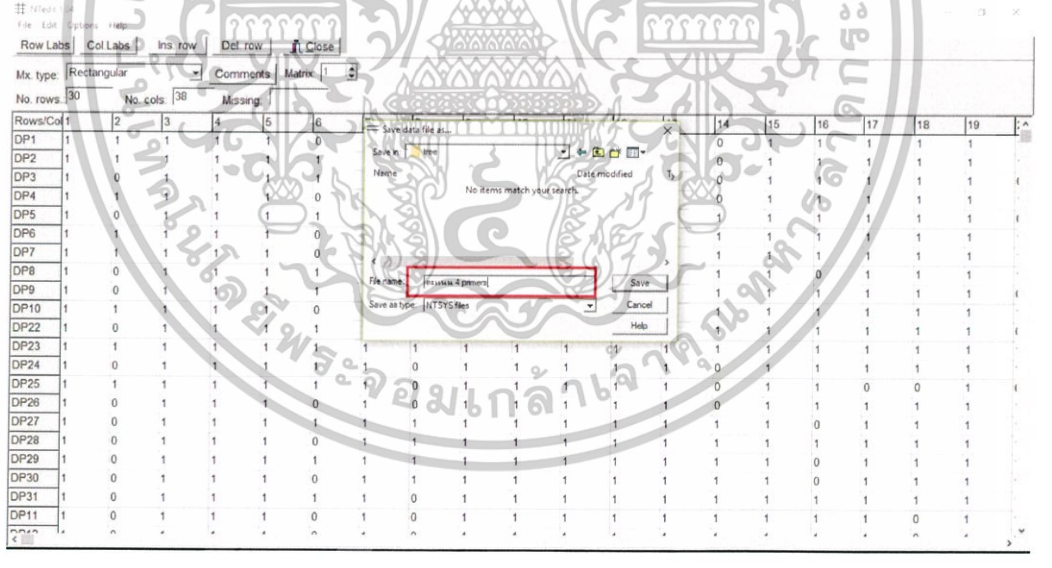
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

1.5 ทำการเปลี่ยนสกุลไฟล์จาก .xls เป็น .NTS เพื่อจะวิเคราะห์ค่าในโปรแกรม NTSYSpc โดยการเลือก File และกด Save File As



1.6 Save File จะได้ไฟล์สกุล .NTS เพื่อใช้งาน

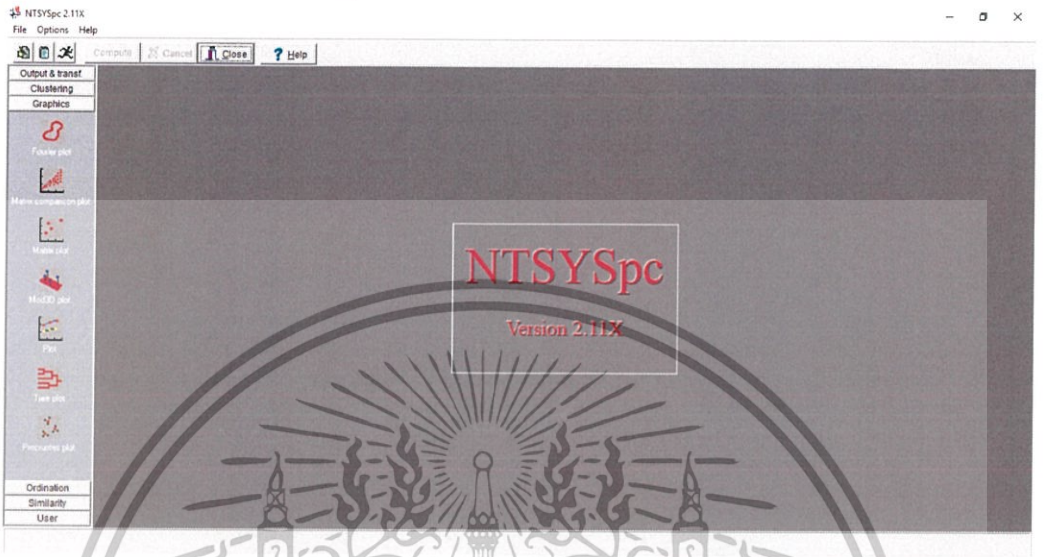


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2. วิเคราะห์ค่าจากการนับแบบ binary โดยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11

2.1 เปิดโปรแกรม NTSYSpc

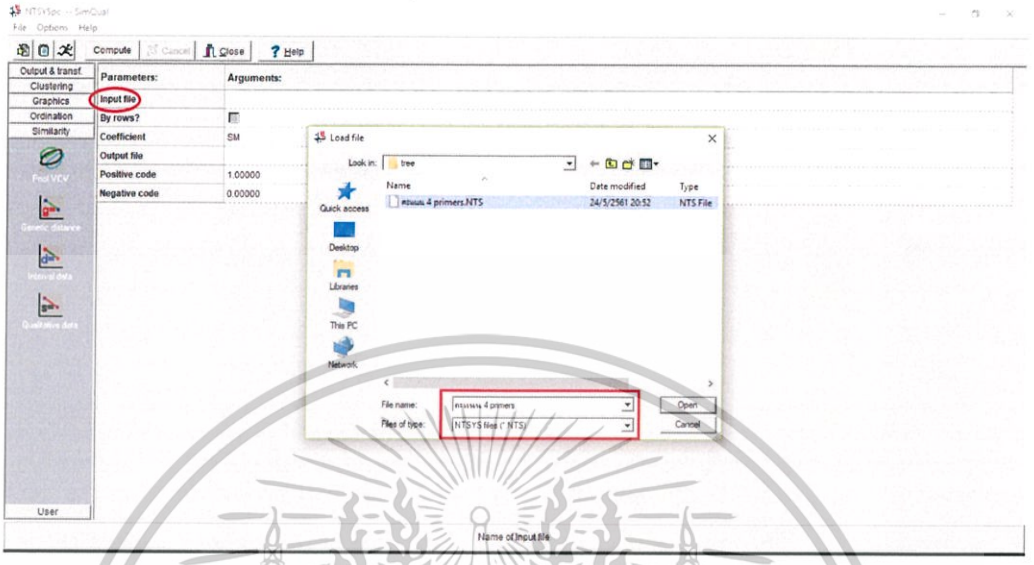


2.2 เลือก Similarity และเลือกรูปแบบ Qualitative Data

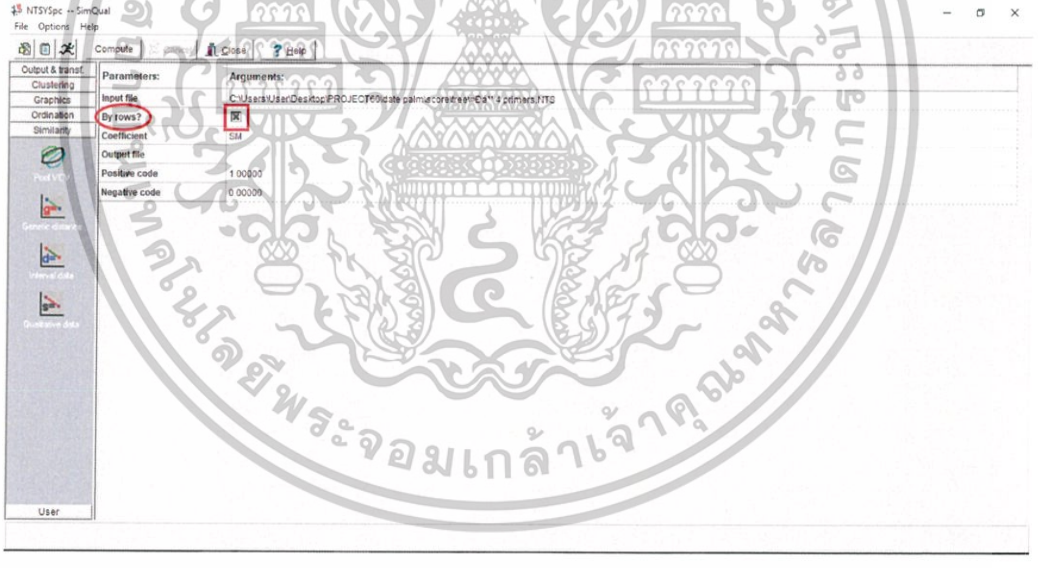
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2.3 กด Input File เลือกไฟล์สกุล .NTS



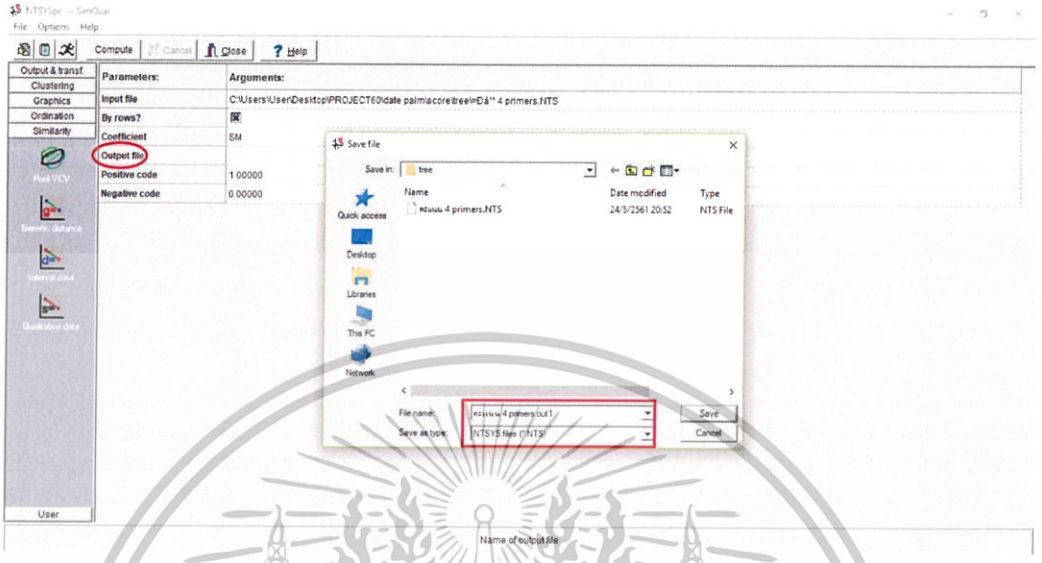
2.4 คลิกที่ช่องสี่เหลี่ยม By row?



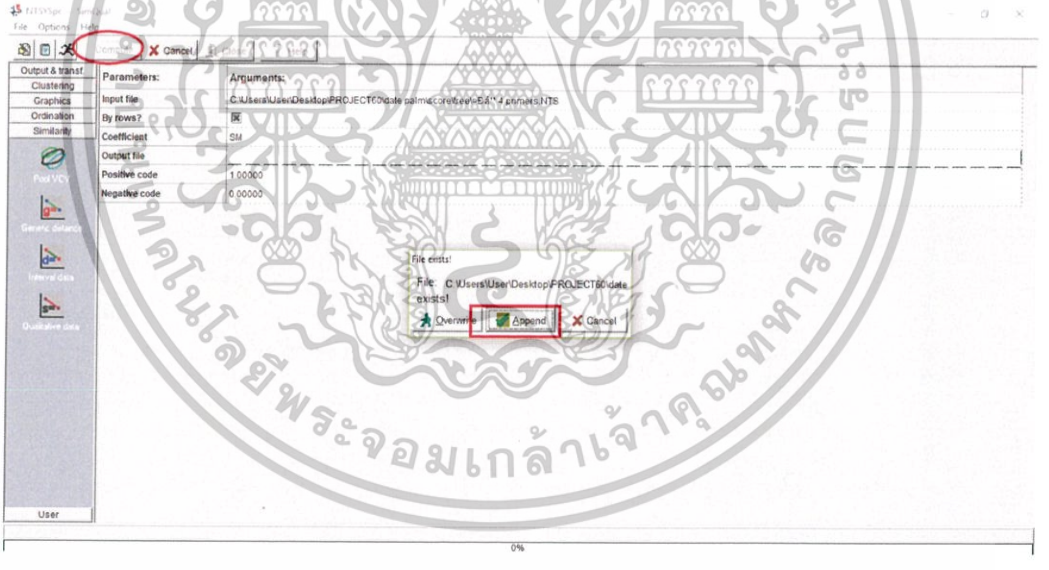
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2.5 กด Output File เซฟไฟล์โดยตั้งชื่อไฟล์ใหม่



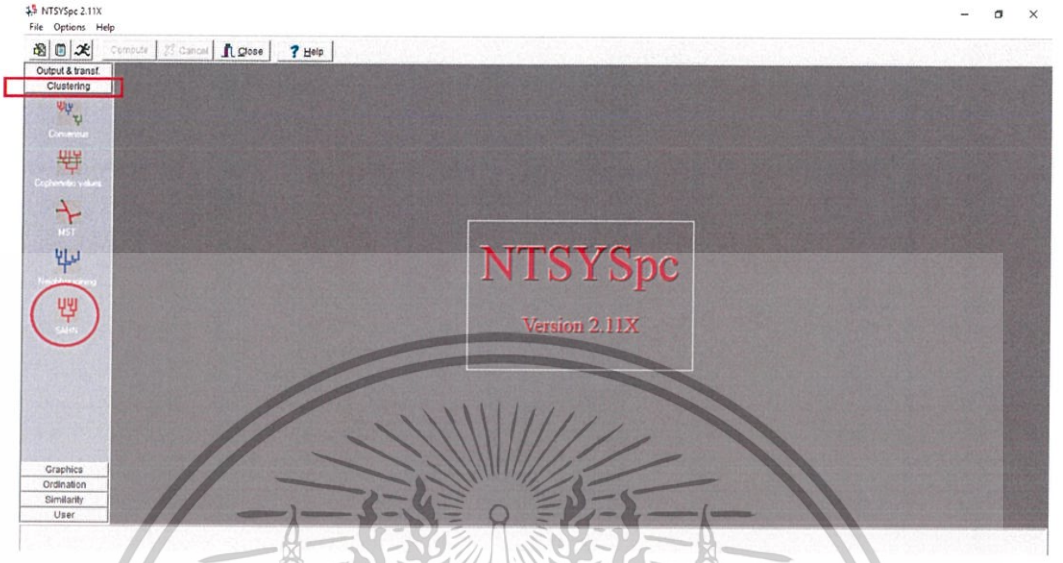
2.6 กด Compute จนขึ้นหน้าต่างเล็กดังภาพ เลือก Append



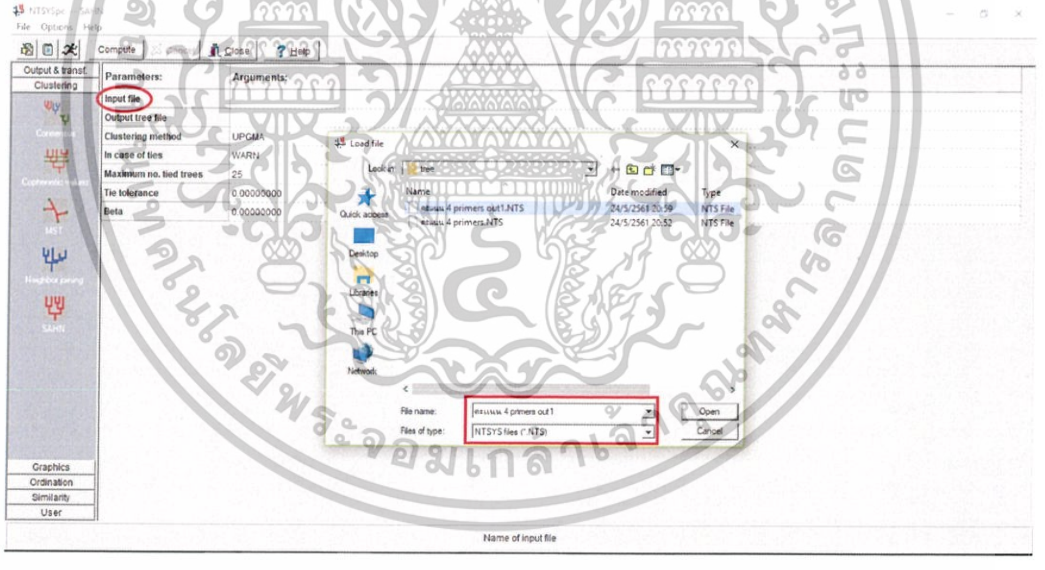
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2.7 คลิกที่ Clustering เลือก SAHN



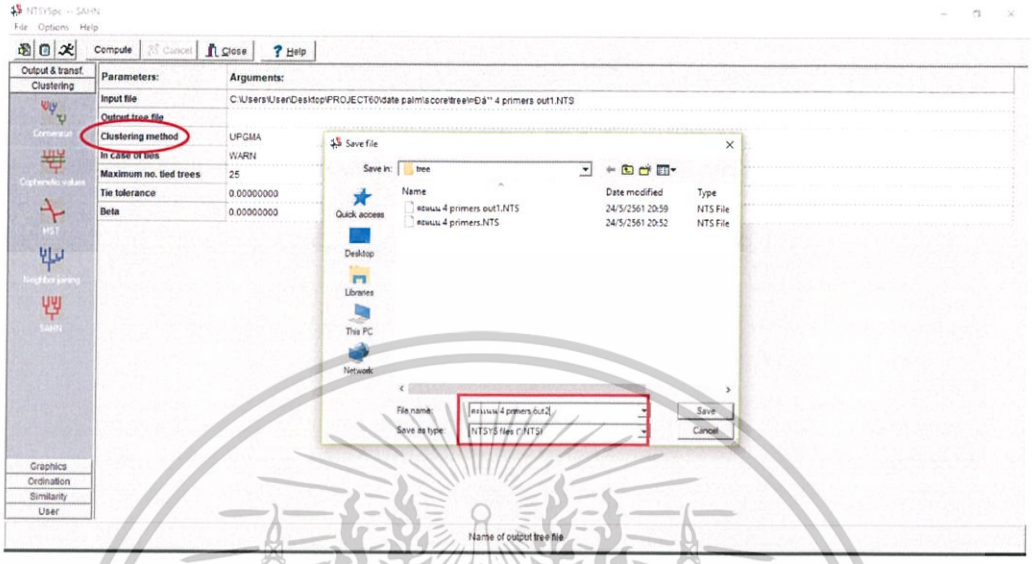
2.8 กด Input File เลือกไฟล์ Output ที่ได้จากการ Similarity



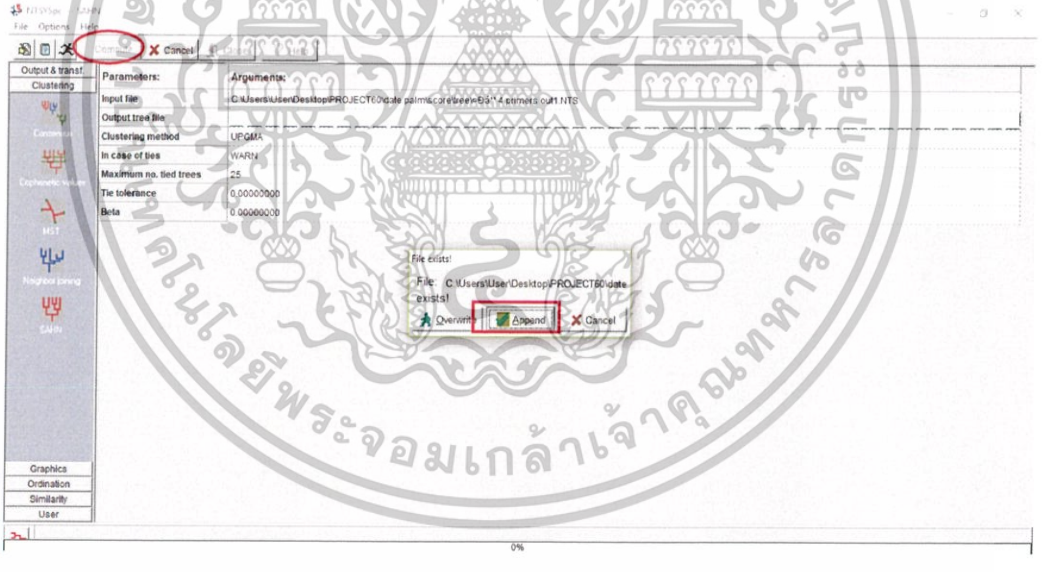
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2.9 กด Output File save ไฟล์โดยตั้งชื่อใหม่



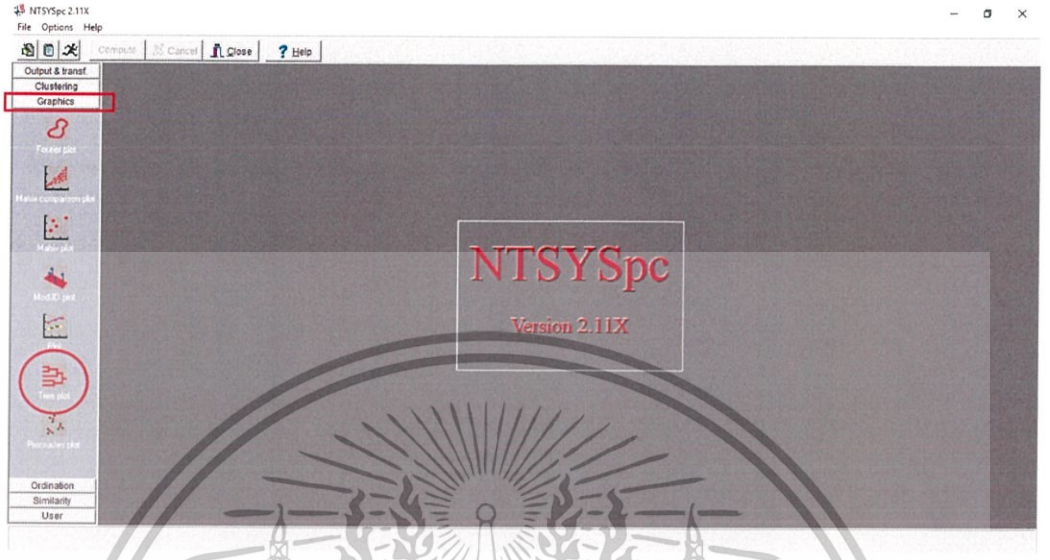
2.10 กด Compute จนขึ้นหน้าต่างเล็กดังภาพ เลือก Append



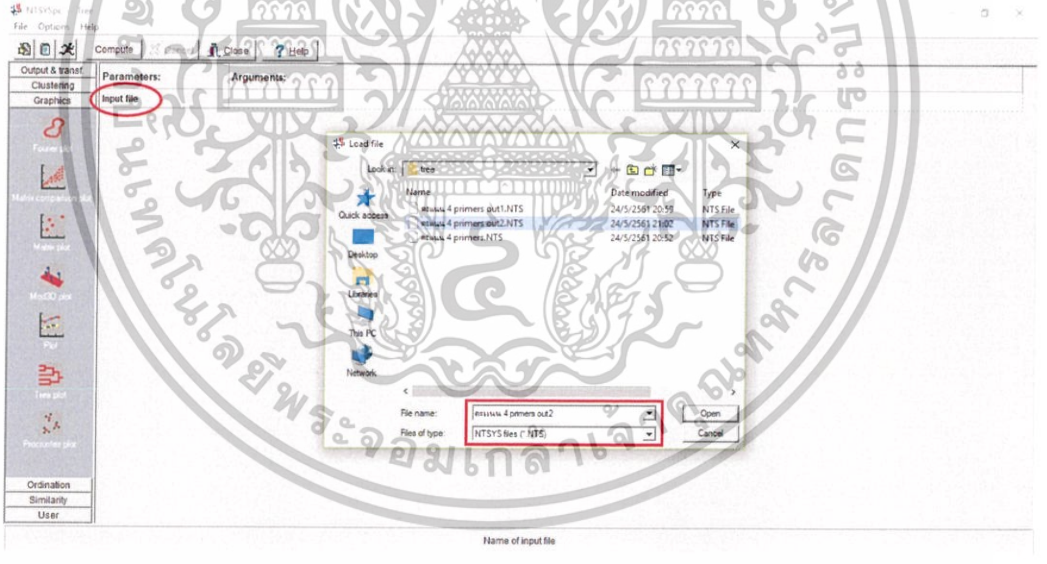
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2.11 กด Graphics เลือก Tree Plot เพื่อสร้าง tree



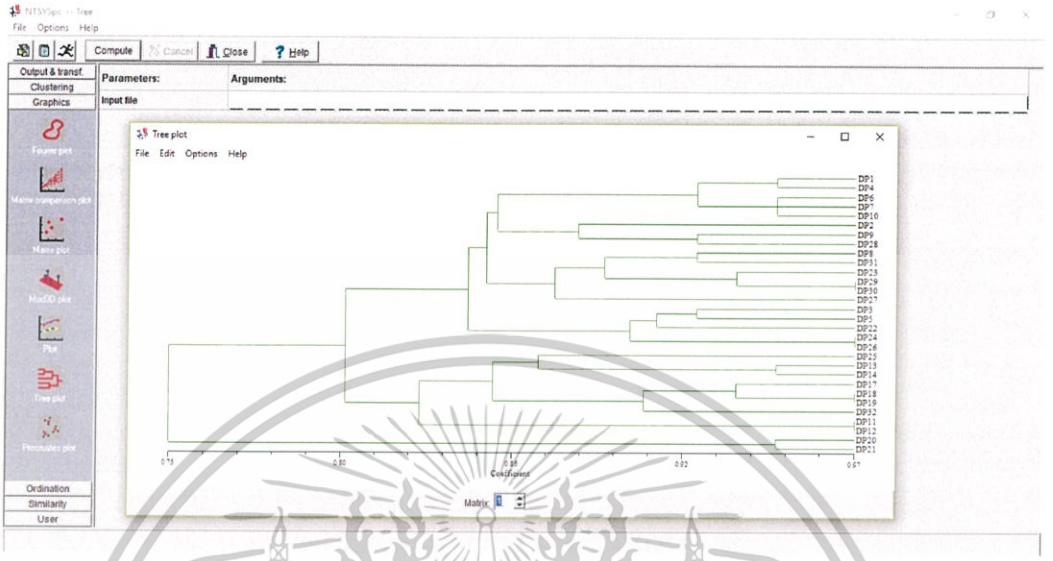
2.12 กด Input File เลือกไฟล์ที่ได้จาก Output ของ Graphics



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

2.13 กด Compute จะขึ้นหน้าต่างใหม่ที่เป็น tree แสดงความสัมพันธ์ดังภาพ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้