

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน (*Sandoricum koetjape*)

โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP และ AFLP

GENETIC DIVERSITY OF SANTOL (*Sandoricum koetjape*)

USING SRAP AND AFLP MARKERS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GENETIC DIVERSITY OF SANTOL (*Sandoricum koetjape*)

USING SRAP AND AFLP MARKERS



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE

DEGREE OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2017

KMITL-2017-SC-M-020-012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน (<i>Sandoricum koetjape</i>) โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP และ AFLP
ชื่อนักศึกษา	นายนวนพงศ์ ทรัพย์าคม
รหัสประจำตัว	58605056
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์

บทคัดย่อ

กระท้อน (*Santol*) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Sandoricum koetjape* (Burm.F.) Merr. เป็นพืชที่นิยมเพาะปลูกกันทั่วไป และเป็นผลไม้ตามฤดูกาลเชิงพาณิชย์ ซึ่งกระท้อนในประเทศไทยมีความหลากหลายในเรื่องชื่อของสายพันธุ์ การจำแนกสายพันธุ์กระท้อนจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม กระท้อนสายพันธุ์ต่างๆ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ทำให้เป็นการยากที่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกพันธุ์กระท้อนเพียงอย่างเดียว ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนในพื้นที่เพาะปลูกในจังหวัดนนทบุรี ลพบุรี นครนายก และปราจีนบุรี โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล sequence-related amplified polymorphism (SRAP) และ amplified fragment length polymorphism (AFLP) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคทั้งสองชนิด จากการศึกษาพบว่าเทคนิคทั้งสองมีประสิทธิภาพสูงในการจัดกลุ่มตัวอย่างกระท้อน โดยสามารถจัดกลุ่มกระท้อนออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ที่ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และคานหาม และกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดเล็กประกอบไปด้วยสายพันธุ์ทับทิม ทองคำมะหะยี นิมนวล ทองใบใหญ่ เขียวหวาน และชันทอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาคุณภาพของผลกระท้อนในส่วนองน้ำหนักรส เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจาก 2 เทคนิคพร้อมกัน พบว่าประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น และให้ผลที่คล้ายคลึงกับเทคนิค AFLP การศึกษาวิจัยนี้เป็นรากฐานสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน การระบุสายพันธุ์ และแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ของกระท้อนต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : กระท้อน ความหลากหลายทางพันธุกรรม เทคนิค SRAP เทคนิค AFLP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Genetic Diversity of Santol (<i>Sandoricum koetjape</i>) using SRAP and AFLP Markers
Student Name	Mr. Navapong Subpayakom
Student ID	58605056
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2017
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Dr. Piyarat Parinyapong Chareonsap

Abstract

Santol (*Sandoricum koetjape* (Burm.F.) Merr.) is prevalent plant for cultivation and becomes a seasonal for commercial fruit. The classification of santol cultivar is very important. However, santol shows similar morphological characteristics. It is difficult to use morphological characteristics in classifying santol. In this study, we investigated the genetic diversity of santol cultivated in Nonthaburi, Lop Buri, Nakhon Nayok and Prachin Buri province via sequence-related amplified polymorphism (SRAP) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers and compare the efficiency of both techniques. The results showed that both techniques were highly effective in dividing santol into 2 major groups: heavy santol consists of Puifai, E-lah and Khanham cultivar while light santol consists of Tubtim, Thongkammayi, Nimnuan, Thongbaiyai, Khiaowan and Khanthong. The results are in line with the studies quality of santol fruit weight. When analyzing the genetic diversity by combination of SRAP and AFLP, it was found that the efficiency of sample clustering increased and showed the similar results as the AFLP technique. This study is the basis for studying the genetic diversity of santol, cultivar identification and plans to improving santol cultivar in the future

Keywords: Santol, Genetic diversity, SRAP technique, AFLP technique

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ไม่อาจสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์ เลขาธิการคณะกรรมการ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ที่ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนเสนอแนะแนวทางการแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษาเกี่ยวกับขั้นตอนในการทำเรื่องสอบ เสนอแนะแนวทางการแก้ปัญหา ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำสาขาวิชา ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อเสนอแนะต่างๆ เกี่ยวกับงานวิจัยเสมอมา ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.โองการ วนิษาชีวะ อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ที่ช่วยเสนอแนะแนวทางการแก้ปัญหา ตลอดจนให้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับงานวิจัย และขอขอบพระคุณ เจ้าของสวนกระท้อน อบต.ประสิทธิ์ โพธิ์ม่วง คุณบุญช่วย กล้าชุม คุณศิริพันธ์ บุญจำ คุณสมหมาย วันเพ็ญ คุณสังเวียน อ่างแก้ว คุณสุชาติ หล้าผาสุก และคุณชาติรี ไสวรรณตระกูล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกระท้อน

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2558 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ และขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวก ในการทำการทดลอง จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบุคคลสำคัญที่ทำให้ข้าพเจ้ามีวันนี้ ก็คือ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ให้กำลังใจพร้อมทั้งให้โอกาสในการศึกษาอย่างเต็มที่ และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ที่ให้กำลังใจตลอดมา ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

นายนางวงศ์ ทรัพย์าคม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และสายพันธุ์ของกระท้อน.....	4
2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	12
3.1 ตัวอย่างกระท้อนที่นำมาศึกษา.....	12
3.2 วัสดุและอุปกรณ์.....	14
3.3 สารเคมี.....	15
3.4 วิธีการทดลอง.....	18
3.4.1 การศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อน.....	18
3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	19
3.4.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ.....	20
3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP.....	20
3.4.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP.....	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	27
4.1 ผลของการศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อน.....	27
4.2 ผลของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค SRAP..	31
4.2.1 ผลการคัดเลือกคู่ไพรมอร์ และการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP	31
4.2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค SRAP.....	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค AFLP..	36
4.3.1 ผลการคัดเลือกคู่ไพโรเมอร์ และการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP	36
4.3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค AFLP.....	38
4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP	42
4.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม	45
4.6 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม.....	46
4.7 ผลการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนระหว่าง เทคนิค SRAP และ AFLP	48
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง.....	53
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้เขียน	63



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงรหัสตัวอย่าง ชื่อสายพันธุ์ และแหล่งปลูกตัวอย่างกระท้อน.....	12
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adaptors และไพรเมอร์ในเทคนิค AFLP.....	17
3.3 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP.....	18
3.4 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP.....	21
3.5 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP.....	21
3.6 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	22
3.7 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอนเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adaptor.....	23
3.8 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอน pre-selective amplification.....	24
3.9 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอน pre-selective amplification.....	24
3.10 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอน selective amplification.....	25
3.11 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอน selective amplification.....	26
4.1 แสดงค่าน้ำหนัก ความหนาเนื้อเปลือก ความหวาน และความเป็นกรด-ด่าง ของกระท้อน.....	28
4.2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP จากตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง.....	33
4.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในเทคนิค AFLP จากตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง.....	38
4.4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (AMOVA) ของเทคนิค SRAP, AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP.....	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะของกระท้อน (A) ต้นกระท้อน (B) ระยะเวลาอ่อน (C) ระยะใบที่เจริญเต็มที่ และ (D) ดอกกระท้อน	5
2.2 ลักษณะทรงผลของกระท้อนสายพันธุ์ (A) ปุยฝ้าย (B) อีล่า (C) ทับทิม (D) นิ่มนวล (E) ชั้นทอง (F) เขียวหวาน (G) ทองใบใหญ่ และ (H) ทองกำมะหยี่	7
2.3 ส่วนประกอบของไพรเมอร์ของเทคนิค SRAP (A) forward primer และ reverse primer และ (B) ลักษณะการเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย	9
4.1 Dendrogram ของคุณภาพผลกระท้อน (A) ค่าน้ำหนักผลกระท้อน และ (B) ค่าความหวานเนื้อปุย ของตัวอย่างกระท้อนจำนวน 27 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RStudio	29
4.2 Dendrogram ของคุณภาพผลกระท้อน (A) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเนื้อผล และ (B) ค่าความหนาเนื้อผล ของตัวอย่างกระท้อนจำนวน 27 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RStudio	30
4.3 แถบดีเอ็นเอของกระท้อนจำนวน 14 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ME5/EM4 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ลูกศรสีแดงแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	32
4.4 Dendrogram ของกระท้อน จำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ด้วยวิธี UPGMA.....	34
4.5 แผนภูมิการกระจายของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP	35
4.6 แถบดีเอ็นเอของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ <i>MseI</i> -CAA/ <i>EcoRI</i> -AGC เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ลูกศรสีแดงแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง.....	37
4.7 Dendrogram ของกระท้อน จำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค AFLP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ด้วยวิธี UPGMA.....	40
4.8 แผนภูมิการกระจายของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค AFLP	41
4.9 Dendrogram ของกระท้อน จำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ด้วยวิธี UPGMA	43
4.10 แผนภูมิการกระจายของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP ..	44

- 4.11 โครงสร้างทางพันธุกรรมของตัวอย่างกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่างจาก (A) เทคนิค SRAP (B) เทคนิค AFLP และ (C) เทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP โดยมีโครงสร้างทางพันธุกรรม 2 แบบ คือ C1 (สายพันธุ์ที่มีผลขนาดเล็ก) และ C2 (สายพันธุ์ที่มีผลขนาดใหญ่)..... 47



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กระท้อน (Santol) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Sandoricum koetjape* (Burm.F.) Merr. เป็นไม้ผลัดใบ ต้นมีขนาดใหญ่ สูงได้ถึง 50 เมตร ลำต้นตรง เปลือกไม่มีสีเทา เมื่อได้รับบาดเจ็บจะหลั่งน้ำยางออกมา มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นได้ถึง 100 เซนติเมตร ใบประกอบ มีใบย่อย 3 ใบ การเกาะติดของใบบนกิ่งแบบเรียงสลับ ใบย่อยรูปรีแกมไข่จนถึงขอบขนาน ฐานใบป้าน ปลายใบแหลม หลังใบมันวาว ท้องใบมีขนคล้ายกำมะหยี่ ใบมีสีเขียวเข้ม ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศมีลักษณะเป็นช่อออกมาตามซอกใบบริเวณปลายกิ่ง มีดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกมีสีเหลือง ผลกระท้อนมีลักษณะเป็นทรงกลม ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีผิวเปลือกเป็นขนกำมะหยี่นุ่ม เมล็ดมีเนื้อหุ้มสีขาวหรือที่เรียกว่าปุย สามารถรับประทานได้ มีลักษณะอ่อนนุ่ม ฉ่ำน้ำ รสชาติหวานหรือหวานอมเปรี้ยว ส่วนเนื้อเปลือกสามารถรับประทานได้โดยจะมีรสเปรี้ยว (Lim, 2012) กระท้อนที่นิยมเพาะปลูกมีหลากหลายสายพันธุ์แตกต่างกันออกไป แต่ละสายพันธุ์จะให้รสชาติที่แตกต่างกันออกไป โดยสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ สายพันธุ์เบา มีลักษณะผลขนาดเล็กและให้ผลผลิตในฤดูกาลเก็บเกี่ยวเร็ว เช่น สายพันธุ์ทับทิม นิมนวล ชันทอง เขียวหวาน ทองใบใหญ่ ทองกำมะหยี่ และสายพันธุ์หนัก มีลักษณะผลขนาดใหญ่และให้ผลผลิตในฤดูกาลเก็บเกี่ยวช้า เช่น สายพันธุ์ปุยฝ้าย และอีล่า เป็นต้น (สำนักงานพาณิชย์จังหวัดนนทบุรี, ม.ป.ป)

การจำแนกสายพันธุ์กระท้อนมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากกระท้อนแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น น้ำหนักผล ความหวานของผล และระยะเวลาเก็บเกี่ยว เป็นต้น ซึ่งลักษณะเหล่านี้อาจเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของกระท้อนในแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม กระท้อนสายพันธุ์ต่างๆ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ทำให้เป็นการยากที่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกสายพันธุ์กระท้อน อีกทั้งในกระท้อนบางสายพันธุ์ไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้ แต่มีชื่อเรียกที่ต่างกันออกไป ทำให้ยังคงเป็นปัญหาต่อการจำแนกเป็นอย่างมาก ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers) มาใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายทางโมเลกุลมีอยู่หลายชนิด เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD) (William *et al.*, 1990) เป็นเทคนิคที่สะดวก ง่าย แต่ทำซ้ำให้ผลไม่เหมือนเดิม (Yang *et al.*, 2012) simple Sequence Repeat (SSR) (Powell *et al.*, 1996) เป็นเทคนิคที่แม่นยำ แต่มีราคาแพง มีขั้นตอนยุ่งยาก และต้องมีความรู้เรื่องลำดับจีโนม งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) และ sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (Li and Quiros, 2001) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค AFLP และ SRAP มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ของสิ่งมีชีวิต โดยมีการนำเครื่องหมายทางโมเลกุล AFLP มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดต่างๆ เช่น ในพืช *Acca sellowiana* (Quezada *et al.*, 2014) ผักกาดหอม (*Lactuca aculeata*) (Jemelkova *et al.*, 2015) รัสเบอร์รี่ (*Rubus sp.*) (Miyashita *et al.*, 2015) กำนยาน (*Styrax obassia*) (Wang *et al.*, 2015) เป็นต้น ถึงแม้เครื่องหมายทางโมเลกุล AFLP จะเป็นเทคนิคที่มีขั้นตอนมากแต่ก็ยังเป็นที่นิยม เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม ไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอ (Yang *et al.*, 2012) และการนำเครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP มาศึกษา เช่น บัว (*Nelumbo sp.*) (Yang *et al.*, 2012) อัลมอนต์ (*Amygdalus spp.*) (Jing *et al.*, 2013) ถั่วพริ้ว (*Canavalia ensiformis*) (Liu *et al.*, 2014) หนุ่ยฝรั่ง (*Crocus sativus*) (Babaei *et al.*, 2014) สน (*Pinus sp.*) (Xie *et al.*, 2015) เป็นต้น เครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP เป็นเทคนิคที่ง่าย เชื่อถือได้ ทำซ้ำให้ผลเหมือนเดิม ไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอ สะดวก และรวดเร็ว (Yang *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกกระท้อนเชิงพาณิชย์ในจังหวัดนนทบุรี ลพบุรี นครนายก และปราจีนบุรี โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP และ AFLP นำมาสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์กระท้อน เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคทั้งสองชนิดเกี่ยวกับการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน และหาความสัมพันธ์กับคุณภาพของผลกระท้อน เพื่อใช้เป็นพื้นฐานข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อน
- 1.2.2 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP และ AFLP
- 1.2.3 หาความสัมพันธ์ของคุณภาพผลกระท้อนกับเครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP และ AFLP

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อน เช่น น้ำหนักผล ความหวาน ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เฉพาะตัวอย่างกระท้อนในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกเชิงพาณิชย์ในจังหวัดนนทบุรี ลพบุรี นครนายก และปราจีนบุรี และใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP และ AFLP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อนสายพันธุ์ต่างๆ
- 1.4.2 สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางโมเลกุล SRAP และ AFLP
- 1.4.3 ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนในประเทศไทย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

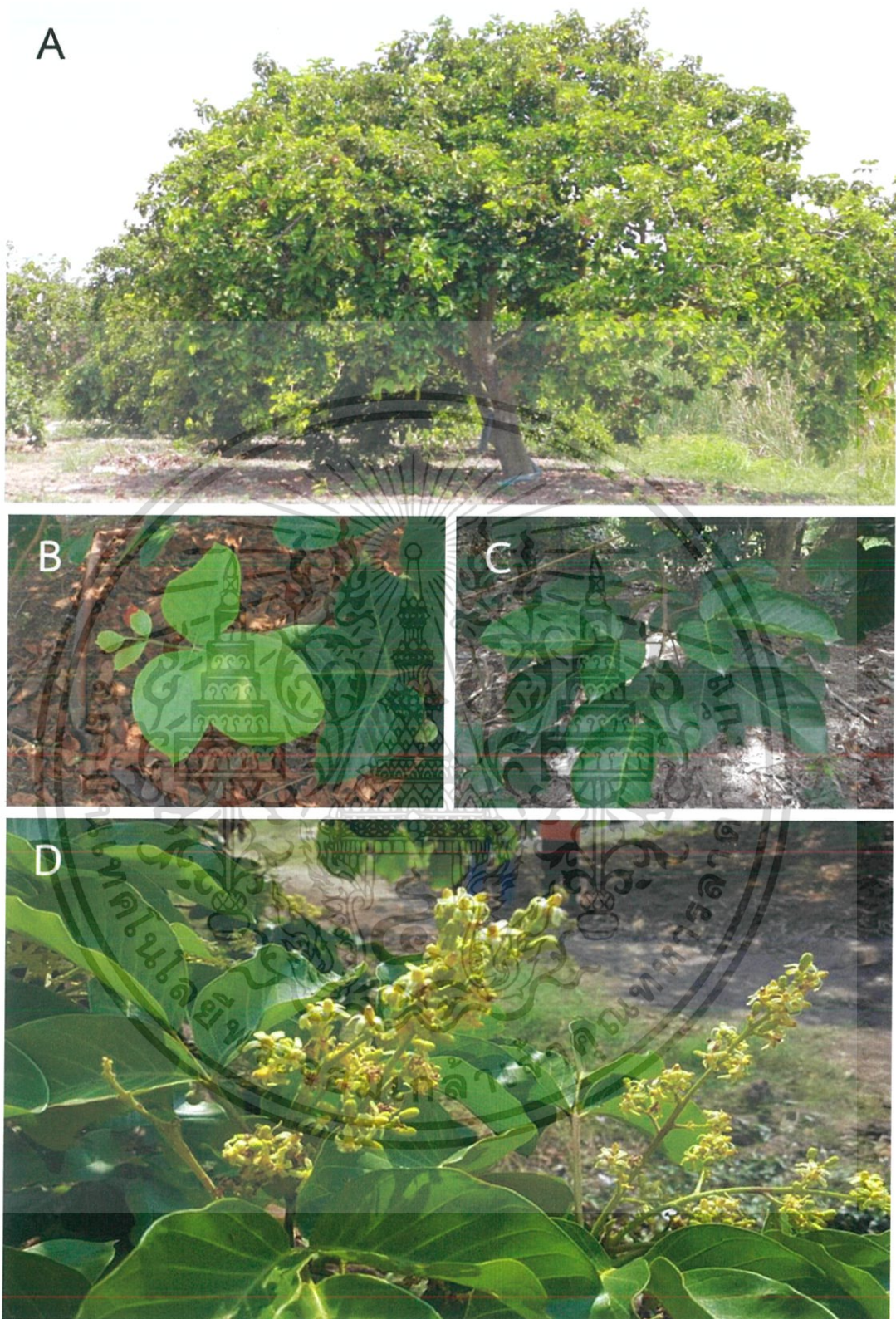
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และสายพันธุ์ของกระท้อน

กระท้อน (Santol) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Sandoricum koetjape* (Burm.F.) Merr. จัดอยู่ในอันดับ (order) Sapindales วงศ์ (family) Meliaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบคาบสมุทรอินโดจีนและคาบสมุทรมาเลเซีย ต่อมามีการนำเอากระท้อนมาเพาะปลูกกันทั่วไป และกลายเป็นผลไม้ตามฤดูกาลเชิงพาณิชย์ที่มีทั่วไปในท้องตลาด อีกทั้งยังมีการนำไปปลูกที่ประเทศจีน ไต้หวัน ออสเตรเลีย และบางพื้นที่ในอเมริกากลาง และทางตอนใต้ของฟลอริดา (Lim, 2012) ในประเทศไทยไม่พบประวัติว่ามีการนำกระท้อนเข้ามาเพาะปลูกนานเท่าใด แต่เชื่อกันว่ามีการเพาะปลูกที่จังหวัดนนทบุรีมากกว่า 100 ปี (สำนักงานพาณิชย์จังหวัดนนทบุรี, ม.ป.ป) อีกทั้งยังมีการรายงานเกี่ยวกับปริมาณพื้นที่เพาะปลูกกระท้อนในภาคกลางของประเทศไทย และพบการเพาะปลูกเชิงพาณิชย์มากในจังหวัดนนทบุรี ลพบุรี นครนายก และปราจีนบุรี กระท้อนมีลักษณะทั่วไปดังต่อไปนี้

ลำต้น โดยทั่วไปกระท้อนจะมีลำต้นเป็นแบบต้นเดี่ยวแล้วมีการแตกออกเป็นกิ่งหรือแขนงในส่วนที่อยู่สูงขึ้นไป ส่วนของลำต้นจะเป็นไม้เนื้อแข็ง แต่เปราะ หักง่าย รูปร่างของต้นเป็นเหลี่ยมไม่ได้รูปทรง มีขนาดของทรงต้นไม่แน่นอน มีกิ่งแตกออกทั่วทั้งลำต้น กิ่งส่วนใหญ่มักยาวเป็นกิ่งเดี่ยว ไม่มีการแตกเป็นกิ่งข้างมากนัก (ปฐพีชล, 2531) ดังรูปที่ 2.1A

ใบ เป็นแบบใบรวมประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ ติดอยู่บนก้านใบเดี่ยวที่มีความยาวประมาณ 8-10 เซนติเมตร รูปร่างของใบเป็นรูปรีแกมไข่ ฐานใบป้าน ปลายใบแหลม หลังใบมีขนยาวคล้ายหนัง เส้นใบด้านหลังใบเป็นร่องลึกและขนขึ้นทางด้านท้องใบ ท้องใบมีขนละเอียดคล้ายกำมะหยี่ ขอบใบเป็นคลื่น ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อน ใบมีสีเขียวเข้มขึ้น ดังรูปที่ 2.1B-C ใบแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีแดงส้ม (ปฐพีชล, 2531)

ดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศที่แตกออกจากปลายกิ่งบริเวณตาอยู่มุมซอกใบ ในยอดหนึ่งจะมีตาดอกที่สามารถแตกออกมาเป็นช่อดอกได้ 4-6 ช่อ ใบ และจะมีก้านดอกย่อยแตกออกจากก้านดอกใหญ่อีกหนึ่งช่อ ดอกเมื่อบานจะมีสีเหลืองอ่อน ปกติการออกดอกในกระท้อนแต่ละต้นมักจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน ในระยะเวลา 7-10 วัน จะมีดอกออกทั้งต้น และหลังการออกดอกประมาณ 6-7 เดือนจึงจะสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ (ปฐพีชล, 2531) ดังรูปที่ 2.1D



รูปที่ 2.1 ลักษณะของกระท้อน (A) ต้นกระท้อน (B) ระยะเวลาอ่อน (C) ระยะเวลาที่เจริญเต็มที่ และ (D) ดอกกระท้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผล ผลของกระท้อนในแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ทั้งในด้านรูปร่างและสี ผล อย่างไรก็ตามลักษณะของผลกระท้อนโดยทั่วไปจะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ในระยะเมื่อผลกำลังแก่จะมีสีเขียวและค่อนข้างกลม ผิวเกลี้ยงมีขนขึ้นปกคลุม เมื่อผลสุกสีผลจะเปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง บริเวณผิวจะหยาบขึ้น มีรอยย่นเกิดขึ้นตามแนวยาวของผล และเด่นชัดที่สุดบริเวณขั้วผล มีขนขึ้นปกคลุมทั่วทั้งผล เนื้อภายในจะแบ่งออกเป็นพู ในแต่ละผลจะมีพูอยู่ 3-5 พู แต่ละพูจะมีเมล็ดอยู่ 1 เมล็ด โดยพูจะมีลักษณะเป็นปุยสีขาว มีรสเปรี้ยวจนถึงหวานสนิทขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (ปฐพีชล, 2531)

สายพันธุ์กระท้อนในประเทศไทยมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมที่จังหวัดนนทบุรี ซึ่งมีการเพาะปลูกกันยาวนานมากกว่า 100 ปี และได้มีการขยายออกไปสู่จังหวัดอื่นๆ ช่วงระยะเวลาอันยาวนานนี้ กระท้อนได้รับการขยายพันธุ์สืบต่อมาโดยใช้วิธีการขยายพันธุ์แบบต่างๆ แต่การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดที่ทำมาตั้งแต่อดีตทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย ทำให้เกิดลักษณะใหม่ที่แตกต่างไปจากพันธุ์เดิม และได้มีการตั้งชื่อขึ้นใหม่อีกมากในปัจจุบัน (ปฐพีชล, 2531) อย่างไรก็ตาม การจำแนกสายพันธุ์กระท้อนโดยอาศัยความแตกต่างของ ใบ ดอก หรือลำต้น ทำได้ยากมาก จึงนิยมจำแนกสายพันธุ์กระท้อนโดยใช้ลักษณะของผลเข้าช่วย ซึ่งกระท้อนที่มีการเพาะปลูกในปัจจุบันจะแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ สายพันธุ์หนัก มีลักษณะผลขนาดใหญ่ และให้ผลผลิตช้า ได้แก่ สายพันธุ์ปุยฝ้าย และอีล่า และสายพันธุ์เบา มีลักษณะผลขนาดเล็ก และให้ผลผลิตเร็ว ประกอบด้วย สายพันธุ์ทับทิม นิ่มนวล ชันทอง เขียวหวาน ทองใบใหญ่ ทองกำมะหยี่ กระท้อนแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะประจำพันธุ์ดังต่อไปนี้ (สำนักงานพาณิชย์จังหวัดนนทบุรี, ม.ป.ป)

ปุยฝ้าย ผลมีขนาดใหญ่ กลม มีจุดแหลมบริเวณขั้ว เปลือกมีผิวเรียบบาง ปุยขาวหนานุ่ม รสหวาน เมล็ดค่อนข้างโต ให้ผลผลิตน้อย

อีล่า ผลมีขนาดใหญ่ ปุยหนา รสหวาน มีกลิ่นหอมเล็กน้อย ออกผลช้ากว่าสายพันธุ์อื่นๆ

ทับทิม ขนาดผลปานกลางประมาณ 200-400 กรัม รูปร่างผลกลมแป้น มีขั้วเล็กยาว เปลือกเหลือง บาง เรียบและนึ่ม เนื้อและปุยมีรสหวานอมเปรี้ยว ให้ผลดก ออกผลเร็ว ลูกร่วงง่าย เมล็ดโต

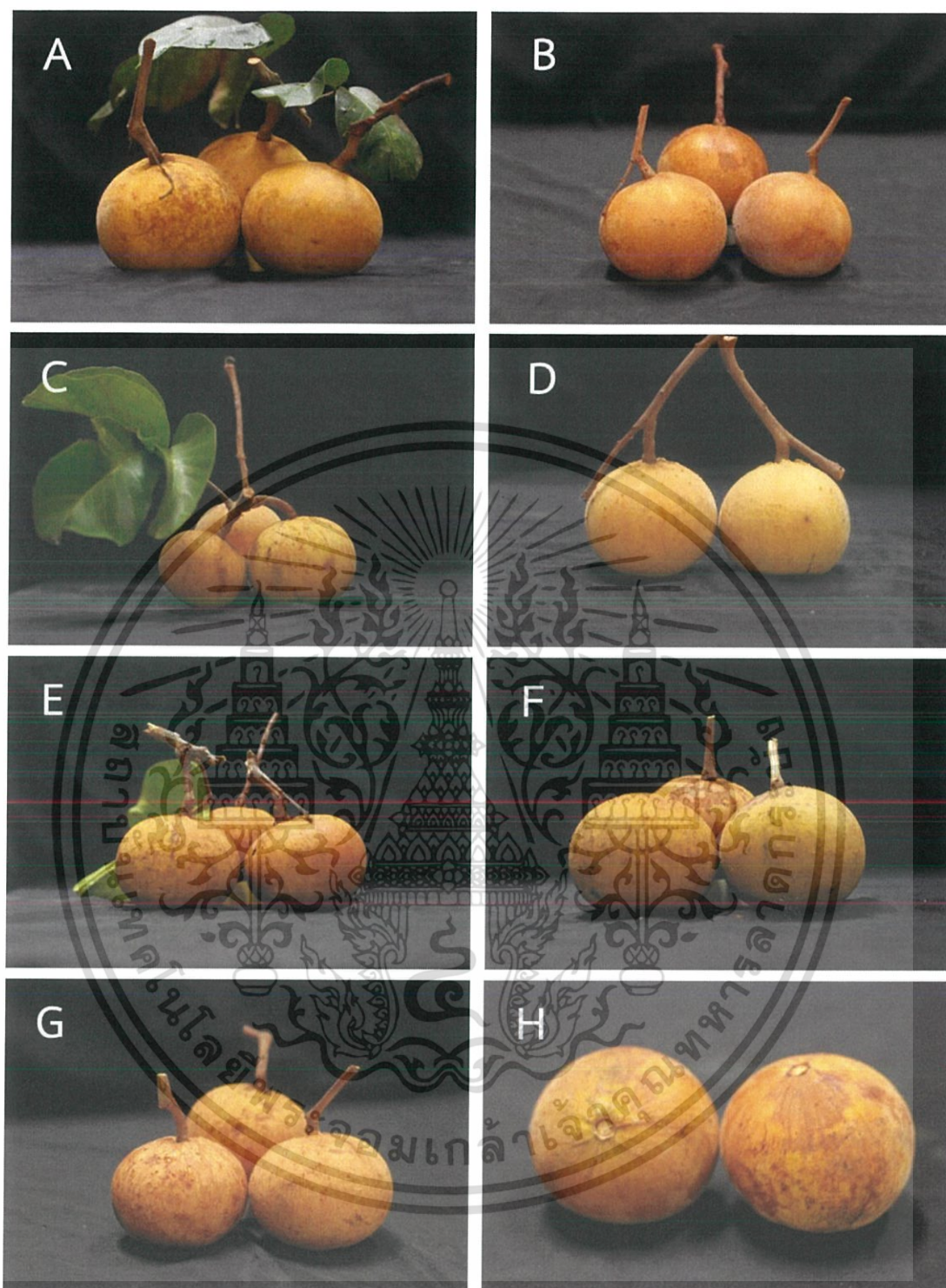
นิ่มนวล ผลกลม ขนาดปานกลาง มีปุยหนาและนึ่ม มีรสหวาน

ชันทอง ผิวเรียบ ผลใหญ่ ปุยหนา มีรสหวาน เนื้อเปลือกมีรสฝาด

เขียวหวาน ผลดก มีปุยหนา มีรสหวาน ถึงผลยังมีสีเขียวแต่ก็มีรสหวาน

ทองกำมะหยี่ ผลมีขนาดใหญ่ ตรงหัวขั้วเป็นจุด มีปุยหนา รสหวาน

ดังแสดงผลกระท้อนสายพันธุ์ปุยฝ้าย อีล่า ทับทิม นิ่มนวล ชันทอง เขียวหวาน ทองใบใหญ่ และทองกำมะหยี่ ดังรูปที่ 2.2A-H ตามลำดับ



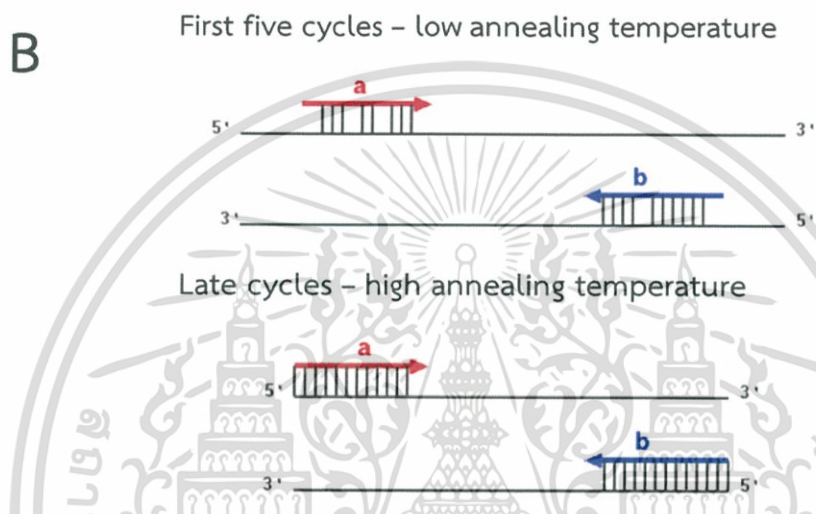
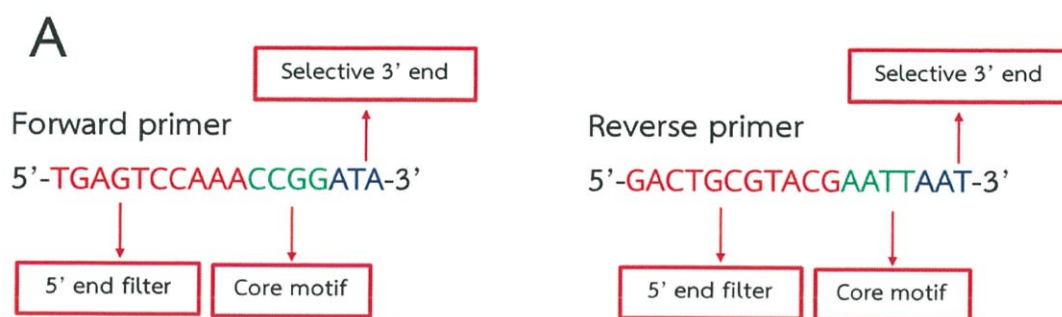
รูปที่ 2.2 ลักษณะทรงผลของกระถ่อนสายพันธุ์ (A) ปุยฝ้าย (B) อีล่า (C) ทับทิม (D) นิ่มนวล (E) ชันทอง (F) เขียวหวาน (G) ทองใบใหญ่ และ (H) ทองกำมะเหยี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลหลากหลายเทคนิค เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง แต่เมื่อทำซ้ำให้ผลไม่เหมือนเดิม เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ขนาดประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ในการสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งจีโนม (Figueiredo *et al.*, 2013) มีการรายงานเกี่ยวกับการใช้เทคนิค RAPD โดย Rind *et al.* (2016) มาใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช *Melia azedarach* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Meliaceae เช่นเดียวกับกับกระท้อน โดยพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) อยู่ในช่วง 0.36-0.76 จาก dendrogram สามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 2 กลุ่ม ตามภูมิประเทศของประชากรจากประเทศปากีสถาน และประเทศตุรกี แต่อย่างไรก็ตามหากวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD ควรวิเคราะห์เทคนิคอื่นๆ เพื่อยืนยันผล เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจง ทำซ้ำให้ผลไม่เหมือนเดิม (Figueiredo *et al.*, 2013)

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่เพิ่มปริมาณส่วนที่สามารถแสดงออก (open reading frame; ORF) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะพิเศษ 2 ชนิด ได้แก่ forward primer และ reverse primer ขนาด 17-19 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดจะมีส่วนประกอบที่คล้ายกัน นั่นคือส่วนลำดับเบสที่ไม่มีความจำเพาะเรียกว่า ลำดับเบสส่วนเดิม (filter sequence) และส่วนลำดับเบสแบบคัดเลือก (selective sequence) จำนวน 3 เบสที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ทางด้านปลาย 3' และมีส่วนที่ต่างกันคือ forward primer มีส่วนประกอบลำดับเบสจำเพาะ คือ CCGG เพื่อให้จับได้กับส่วนเอ็กซอน (exon) ซึ่งเป็นบริเวณที่มียีนประกอบของเบส GC สูง ส่วน reverse primer มีส่วนประกอบลำดับเบสจำเพาะคือ AATT เพื่อให้จับได้กับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณ AT สูง ซึ่งพบมากในส่วนอินตรอน (intron) และโพรโมเตอร์ (promoter) ของยีนเป็นส่วนสำคัญของไพรเมอร์ (Li and Quiros, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.3A อีกทั้งยังมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้วิธี step up PCR คือใช้อุณหภูมิ annealing 2 รอบ รอบแรกใช้อุณหภูมิต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส จำนวน 5 รอบ (early cycles) ซึ่งไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแบบไม่จำเพาะ หลังจากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้นเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะ (late cycles) ดังแสดงในรูปที่ 2.3B เทคนิคนี้มีข้อได้เปรียบคือทำซ้ำแล้วให้ผลคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสหรือจีโนม และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันด้วยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (Yang *et al.*, 2012)



รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบของไพรเมอร์ของเทคนิค SRAP (A) forward primer และ reverse primer และ (B) ลักษณะการเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย

(ดัดแปลงจาก: <http://www.plantmethods.com/content/figures/1746-4811-9-6-11.jpg>)

ในปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยที่ใช้เทคนิค SRAP ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมกระท้อนหรือภายในวงศ์เดียวกัน แต่มีรายงานการใช้เทคนิค SRAP ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Melia* ในประเทศจีนซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Meliaceae โดย Liao *et al.* (2016) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม *M. toosendan* และ *M. azedarach* ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล และงานวิจัยของ Yang *et al.* (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว (*Nelumbo sp.*) ด้วยเทคนิค simple sequence repeats (SSR) และ SRAP โดยศึกษาในบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) บัวหลวงอเมริกัน (*Nelumbo lutea*) และบัวลูกผสม โดยใช้คู่ไพรเมอร์ในเทคนิค SSR จำนวน 38 คู่ไพรเมอร์ และในเทคนิค SRAP จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเทคนิค SRAP ให้ผลแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 119 แถบ มีค่าเฉลี่ย polymorphism information content (PIC) อยู่ที่ 0.74 dendrogram ที่สร้างด้วยวิธี unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) จากข้อมูล SSR และ SRAP พบว่ามีการจัดกลุ่มคล้ายกัน ยกเว้นบางตัวอย่าง โดยกลุ่ม 1 ประกอบด้วย *N. nucifera* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้เผยแพร่บนสื่อออนไลน์หรือในสื่ออื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกผสม 4 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มของบัวที่ใช้เป็นไม้ดอก บัวที่ให้เมล็ด และบัวที่ให้ราก และกลุ่ม 2 ประกอบด้วย *N. lutea* และลูกผสม 9 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถยืนยันความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *N. nucifera* และ *N. lutea* ได้ นอกจากนี้การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ยังได้ dendrogram ที่มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มของแผนภูมิการกระจายด้วยวิธี PCoA (principal coordinate analysis) แสดงให้เห็นว่าเทคนิค SRAP และ SSR เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบทั้งสองเทคนิค โดยนำมาเปรียบเทียบกับ dendrogram ที่ได้จากการรวมทั้งสองเทคนิค พบว่าการจัดกลุ่มของเทคนิค SRAP มีความคล้ายคลึงกับ dendrogram จากการรวมทั้งสองเทคนิค มากกว่า dendrogram ที่ได้จากเทคนิค SSR แสดงให้เห็นว่าเทคนิค SRAP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิค SSR

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่คิดค้นขึ้นโดย Vos *et al.* (1995) เป็นเทคนิคที่รวมเอาจุดเด่นระหว่างเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) ที่มีความจำเพาะ กับเทคนิค RAPD ที่ไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับจีโนมเข้าด้วยกัน โดยนำดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำต่างกัน แล้วเชื่อมต่อ adaptor ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบลำดับเบส เข้ากับปลายทั้งสองด้านของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อเป็นส่วนให้ไพรเมอร์มาเกาะที่ปลายทั้งสองด้าน และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยไพรเมอร์ที่ใช้จะมีลำดับเบสเหมือนกับส่วน adaptor ที่เชื่อมต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์มีลำดับเบสที่เป็นส่วนตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ และเพิ่มเบสอีก 2-3 เบสเข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นี้ เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ดังนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จะมีเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ติดกับบริเวณจดจำของเอนไซม์เข้าคู่ได้กับไพรเมอร์ที่เลือกใช้นั้น โดยเทคนิค AFLP นี้มีข้อได้เปรียบคือมีประสิทธิภาพสูง ความสามารถในการทำซ้ำสูง และไม่จำเป็นต้องมีความรู้ของลำดับดีเอ็นเอ (Vos *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามเทคนิค AFLP มีข้อจำกัด นั่นคือมีค่าใช้จ่ายสูง มีขั้นตอนมาก ต้องการดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง จำเป็นที่จะต้องตรวจสอบผลด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากให้ผลของแถบดีเอ็นเอมาก ซึ่งวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขั้นตอนยุ่งยากและสารที่ใช้ในเทคนิคนี้เป็นสารก่อมะเร็ง (Li and Quiros, 2001)

ในปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยที่ใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมกระท้อน แต่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช *Cedrela lilloi* ในป่า Yungas ประเทศเปรู ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Meliaceae โดย Inza *et al.* (2012) ได้ศึกษาโดยใช้ตัวอย่าง 160 ตัวอย่างใน 9 ประชากร เก็บตัวอย่างตามเส้นละติจูด และใช้คู่ไพรเมอร์ *EcoRI-AT/MseI-ACCA*, *EcoRI-AC/MseI-AATA*, *EcoRI-AC/MseI-AACA*, *EcoRI-AT/MseI-AACA* และ *EcoRI-AG/MseI-ACCA* พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มทางตอนเหนือ และกลุ่มตอนกลางถึงตอนใต้ของป่า Yungas และพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และงานวิจัยของ Torre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et al. (2008) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Cedrela odorata* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Meliaceae โดยศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวน 137 ตัวอย่าง 9 ประชากร ทางตอนใต้ของป่าเมซอนในประเทศเปรู ใช้คูไพรเมอร์ 3 คูไพรเมอร์ ได้แก่ *EcoRI*-ACT/*MseI*-CAT, *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAC และ *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAT พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ระยะห่างทางพันธุกรรม และภูมิศาสตร์มีความสัมพันธ์กัน ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างมากระหว่างประชากรอาจจะเกี่ยวข้องกับภูมิศาสตร์และแม่น้ำ และสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่มตามระยะทางภูมิศาสตร์อย่างชัดเจน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างกระทอนที่นำมาศึกษา

เก็บตัวอย่างผลกระทอนเพื่อนำมาศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และใบกระทอนเพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จากสวนของเกษตรกรในพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลพบุรี นนทบุรี นครนายก และปราจีนบุรี จำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยมีรหัสตัวอย่าง สายพันธุ์ และสถานที่ของตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำตัวอย่างใบกระทอนมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งไว้ให้แห้ง แล้วเก็บใส่ถุงซิปล็อคไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำตัวอย่างมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงรหัสตัวอย่าง ชื่อสายพันธุ์ และแหล่งปลูกตัวอย่างกระทอน

รหัสตัวอย่าง	ชื่อสายพันธุ์	สวน	แหล่งปลูก
KT12	อีล่า	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT13	ทองใบใหญ่	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT15	ปุยฝ้าย	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT16	ปุยฝ้าย	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT17	ทองกำมะหยี่	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT18	อีล่า	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT19	ทองใบใหญ่	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT20	ถมทอง	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT21	นิมมวล	สวนคุณประสิทธิ์	ลพบุรี
KT22	ปุยฝ้าย	สวนคุณนรินทร์	นนทบุรี
KT23	ปุยฝ้าย	สวนคุณนรินทร์	นนทบุรี
KT26	ทับทิม	สวนคุณบุญช่วย	นนทบุรี
KT27	ชันทอง	สวนคุณบุญช่วย	นนทบุรี
KT28	เขียวหวาน	สวนคุณบุญช่วย	นนทบุรี
KT29	ทับทิม	สวนคุณนรินทร์	นนทบุรี
KT30	ทับทิม	สวนคุณนรินทร์	นนทบุรี
KT31	ปุยฝ้าย	สวนคุณศิริพันธ์	นนทบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ชื่อสายพันธุ์	สวน	จังหวัด
KT33	ปุยฝ้าย	สวนคุณศิริพันธ์	นนทบุรี
KT34	ปุยฝ้าย	สวนคุณศิริพันธ์	นนทบุรี
KT36	นิ่มนวล	สวนคุณศิริพันธ์	นนทบุรี
KT38	อีล่า	สวนก้านันสมหมาย	นครนายก
KT39	อีล่า	สวนก้านันสมหมาย	นครนายก
KT40	ทองกำมะหยี่	สวนก้านันสมหมาย	นครนายก
KT42	ปุยฝ้าย	สวนคุณสังเวียน	นครนายก
KT43	ปุยฝ้าย	สวนคุณสังเวียน	นครนายก
KT44	ทับทิม	สวนคุณสังเวียน	นครนายก
KT45	คานหาม	สวนก้านันสมหมาย	นครนายก
KT46	ทองกำมะหยี่	สวนผาสุข	ปราจีนบุรี
KT47	ปุยฝ้าย	สวนผาสุข	ปราจีนบุรี
KT48	เขี้ยวน้ำผึ้ง	สวนผาสุข	ปราจีนบุรี
KT49	ปุยฝ้าย	สวนผาสุข	ปราจีนบุรี
KT50	ทับทิม	สวนผาสุข	ปราจีนบุรี
KT51	ทับทิม	สวนผาสุข	ปราจีนบุรี
KT52	เขี้ยวหวาน	สวนผาสุข	ปราจีนบุรี
KT54	ปุยฝ้าย	สวนละอองฟ้า	นครนายก
KT55	กระท้อนป่า	สวนละอองฟ้า	นครนายก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.2.1 Agarose gel electrophoresis kit; ADVANCE
- 3.2.2 Balance
- 3.2.3 Beaker
- 3.2.4 Camera
- 3.2.5 Centrifuge
- 3.2.6 Computer
- 3.2.7 DC power supply; Bio-Rad
- 3.2.8 Flask
- 3.2.9 Forceps
- 3.2.10 Freezer
- 3.2.11 Fume hood
- 3.2.12 Gel document system
- 3.2.13 Heat block
- 3.2.14 Incubator
- 3.2.15 Label pen
- 3.2.16 Liquid nitrogen container
- 3.2.17 Microcentrifuge tube
- 3.2.18 Micropipettes และ micropipette tips
- 3.2.19 Microwave oven
- 3.2.20 Mortar และ pestle
- 3.2.21 Parafilm
- 3.2.22 pH meter
- 3.2.23 Plastic wrap
- 3.2.24 Polyacrylamide gel electrophoresis kit; Bio-Rad
- 3.2.25 Pruning shears
- 3.2.26 Quartz semi-cuvette
- 3.2.27 Rack
- 3.2.28 Refractometer
- 3.2.29 Refrigerator
- 3.2.30 Rubber glove
- 3.2.31 Scissors
- 3.2.32 Spatula

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.33 Spectrophotometer; Eppendorf
- 3.2.34 Spin down
- 3.2.35 Thermal cycler; Eppendorf
- 3.2.36 Tissue paper
- 3.2.37 Vernier caliper
- 3.3.38 Vortex
- 3.3.39 Water bath
- 3.3.40 Ziplock bag
- 3.3.41 Arlequin version 3.5.2.2 program (Excoffier and Lischer, 2010)
- 3.3.42 NTSYSpc version 2.11 program (Rohlf, 2000)
- 3.3.43 Past version 3.14 program (Hammer *et al.*, 2001)
- 3.3.43 RStudio program
- 3.3.44 Structure version 2.3.4 program (Pritchard *et al.*, 2000)

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 10% CTAB ใน 0.7 M NaCl
- 3.3.2 10X Fast Digest buffer; Thermo Scientific
- 3.3.3 2X CTAB
- 3.3.4 6X loading dye
- 3.3.5 70% Ethanol
- 3.3.6 Absolute ethanol
- 3.3.7 Acetic acid
- 3.3.8 40% acrylamide: bisacrylamide (19:1)
- 3.3.9 Adaptor *EcoRI* A1 และ A2 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 3.2
- 3.3.10 Adaptor *MseI* A1 และ A2 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 3.2
- 3.3.11 AFLP loading buffer (98% formamide, 0.1% bromopenol blue, 0.1% xylene cyanol และ 10 mM EDTA)
- 3.3.12 Agarose
- 3.3.13 APS (ammonium persulfate)
- 3.3.14 Bind silane
- 3.3.15 Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1)
- 3.3.16 Deionized water (DI water)
- 3.3.17 Distilled water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.18 1 kb DNA marker; Biolab
- 3.3.19 50 bp DNA ladder
- 3.3.20 100 bp plus DNA ladder; vivantis
- 3.3.21 dNTPs
- 3.3.22 1 FDU/ μ l *Eco*RI; Thermo Scientific
- 3.3.23 Ethidium bromide (EtBr)
- 3.3.24 37% Formaldehyde
- 3.3.25 Isopropanol
- 3.3.26 Liquid Nitrogen
- 3.3.27 Magnesium chloride ($MgCl_2$)
- 3.3.28 NaCl (sodium chloride)
- 3.3.29 NaOH (sodium hydroxide)
- 3.3.30 Primer เทคนิค AFLP (Vos *et al.* 1995) ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 3.2
- 3.3.31 Primer เทคนิค SRAP (Li and Quiros, 2001) ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 3.3
- 3.3.32 Repel silane
- 3.3.33 RNase A; vivantis
- 3.3.34 Silver nitrate
- 3.3.35 Standard *Taq* reaction buffer
- 3.3.36 10X T4 DNA buffer
- 3.3.37 5 U/ μ l T4 DNA ligase
- 3.3.38 *Taq* DNA polymerase; Biolab
- 3.3.39 TE buffer
- 3.3.40 TEMED (tetramethyl ethylenediamine)
- 3.3.41 Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer)
- 3.3.42 1 FDU/ μ l *Tru*ll (*Mse*I); Thermo Scientific
- 3.3.43 Urea
- 3.3.44 β -mercaptoethanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adaptors และไพรเมอร์ในเทคนิค AFLP (Vos *et al.*, 1995)

ชนิดของ adaptors และไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Adaptor <i>EcoRI</i> A1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
Adaptor <i>EcoRI</i> A2	3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
Adaptor <i>MseI</i> A1	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
Adaptor <i>MseI</i> A2	3'-TACTCAGGACTCAT-5'
<i>EcoRI</i> -A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>EcoRI</i> -AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
<i>EcoRI</i> -AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
<i>EcoRI</i> -ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
<i>EcoRI</i> -ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
<i>EcoRI</i> -ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'
<i>EcoRI</i> -ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
<i>EcoRI</i> -AGA	5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3'
<i>EcoRI</i> -AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
<i>EcoRI</i> -AGG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
<i>EcoRI</i> -AGT	5'-GACTGCGTACCAATTCAGT-3'
<i>MseI</i> -C	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
<i>MseI</i> -CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
<i>MseI</i> -CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
<i>MseI</i> -CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
<i>MseI</i> -CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP (Li and Quiros, 2001)

ชนิดไพรเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Forward primer	Me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'
	Me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
	Me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'
	Me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'
	Me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'
Reverse primer	Em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
	Em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
	Em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
	Em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
	Em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
	Em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อน

ทำการเก็บตัวอย่างผลกระท้อนในช่วงเดือนมิถุนายน และกรกฎาคม พ.ศ.2558 ซึ่งเป็นฤดูเก็บเกี่ยวผลผลิตประจำปี ตามข้อมูลการออกดอกและผลของเกษตรกร โดยจะเก็บเพียงผลกระท้อนที่สุกเต็มที่พร้อมจำหน่าย ไม่เก็บตัวอย่างที่อ่อน หรือสุกเกินไป เก็บตัวอย่างผลกระท้อนต้นละ 3 ผล เพื่อทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำมาศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น น้ำหนักผล ความหนาเนื้อผล ความหวาน ความเป็นกรด-ด่าง โดยการหาน้ำหนักผลกระท้อนสามารถทำได้โดยการชั่งน้ำหนักโดยให้หน่วยเป็นกรัม วัดความหนาของเนื้อผลด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (vernier caliper) โดยให้หน่วยเป็นเซนติเมตร ส่วนค่าความหวานจะวัดที่ปุยของผลกระท้อน และค่าความเป็นกรด-ด่างจะวัดที่เนื้อของผลกระท้อน ตามลักษณะการบริโภคของผู้บริโภค จึงวัดค่าความหวานโดยคั้นน้ำจากปุยของผลกระท้อน แล้วนำน้ำที่คั้นได้มาวัดค่าความหวานด้วยเครื่อง refractometer โดยมีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ (°Bx) และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยคั้นน้ำจากเนื้อผลกระท้อน นำน้ำที่ได้มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองมาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม R Studio

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าการใช้ใบแก่ของกระท้อนในการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ใบอ่อน (Subpayakom *et. al.*, 2016) จึงนำตัวอย่างใบแก่ของกระท้อนมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) โดยล้างใบให้สะอาด ใช้กรรไกรตัดใบให้มีขนาดเล็กกลงใส่ลงในโกร่ง นำไปบดกับไนโตรเจนเหลวจนมีลักษณะเป็นผง เติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโกร่ง บดจนมีลักษณะเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน พันพาราฟิล์มที่ปากหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุกๆ 15 นาที เมื่อบ่มครบเวลานำมาเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ทำในตู้ดูดควัน กลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 500-600 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเติม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ใน 0.7 M NaCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบน ปริมาตร 400-500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่เย็นจัด โดยเติมปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร (v/v) ของสารละลายส่วนใส กลับหลอดไปมา นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู ทิ้งไว้ให้แห้ง 1-2 นาที เติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง กลับหลอดไปมา แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู เติม absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง กลับหลอดไปมา แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง คว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู เพื่อซับสารละลายส่วนใสที่ยังเหลืออยู่ให้หมด ทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลาย โดยบ่มไม่เกิน 1 คืน จากนั้นเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อได้ดีเอ็นเอนำมาทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ อะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ Marker ขนาด 1 kb (vivantis, Malaysia) เป็นขนาดและปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน นำอะกาโรสแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลโดยใช้เครื่อง gel documentary system ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer (Eppendorf, German) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ แล้วทำการเจือจาง ดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP (Li and Quiros, 2001)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจำเป็นต้องศึกษาคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ก่อน โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด forward มี 5 ไพรเมอร์ และ reverse มี 6 ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3.3 (Li and Quiros, 2001) นำมาจับคู่กันเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเทคนิคนี้ โดยไพรเมอร์ชนิด forward จะจับคู่กันอย่างอิสระกับไพรเมอร์ชนิด reverse เช่น ไพรเมอร์ forward Me1 จับคู่กับ ไพรเมอร์ชนิด reverse Em1 (Me1/Em1) หรือ Me1 จับคู่กับ Em3 (Me1/Em3) ซึ่งจะจับคู่กันจนครบ ทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ นำแต่ละคู่ไพรเมอร์มาศึกษากับตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ปุยฝ้าย (KT22) และ เขียวหวาน (KT28) เพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยพิจารณา จากความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และปรากฏความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ เมื่อได้คู่ ไพรเมอร์ที่เหมาะสม นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างทั้งหมด โดยเจือจางดี เอ็นเอที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP เติมสารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดง ดังตารางที่ 3.4 ตามวิธีของ Jing *et al.* (2013) ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Eppendorf Mastercycler® ep. Gradient S มีขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอแสดง ดังตารางที่ 3.5 ตามวิธีของ Yang *et al.* (2012) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน สารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดย เปรียบเทียบกับ 100 bp plus DNA ladder (vivantis, Malaysia) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลผลแถบดีเอ็นเอเป็นค่าคะแนน Binary โดยให้ 1 คะแนนเมื่อเกิด แถบดีเอ็นเอ และให้ 0 คะแนนเมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ แล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี UPGMA ด้วย โปรแกรม NTSYSpc เวอร์ชัน 2.11X (Rohlf, 2000) สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) และ แผนภูมิการกระจายด้วยวิธี PCoA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP (Jing *et al.*, 2013)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Standard <i>Taq</i> reaction buffer	10x	2 μ l	1X
dNTPs	1.25 mM	3.3 μ l	200 μ M
MgCl ₂	50 mM	1 μ l	2.5 mM
Forward primer	20 μ M	1 μ l	1 μ M
Reverse primer	20 μ M	1 μ l	1 μ M
<i>Taq</i> DNA polymerase	5000 U/ml	0.2 μ l	1 U
DNA template	50 ng/ μ l	2 μ l	100 ng/ μ l
DI water	-	9.5 μ l	-
ปริมาตรรวม		20 μ l	

ตารางที่ 3.5 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP (Yang *et al.*, 2012)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP (Vos *et al.*, 1995)

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนโดยใช้เทคนิค AFLP จำนวน 36 ตัวอย่าง นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยทำการคัดเลือกหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ตัวอย่างกระท้อนจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ปุยฝ้าย (KT22) ชันทอง (KT27) เขียวหวาน (KT28) และ ทองกำมะหยี่ (KT40) โดยเลือกตัวอย่างกระท้อนที่มาทดสอบการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์จากการแบ่งกลุ่มใน dendrogram ที่ได้จาก SRAP

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ทำได้โดย ขั้นตอนแรกคือการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *EcoRI* และ *MseI* โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบแสดง ดังตารางที่ 3.6 ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex และ spin down นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง heat box จะได้ดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว (digested DNA) นำ digested DNA มาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ฮอกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 1 kb (Vivantis, Malaysia)

ตารางที่ 3.6 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (เจตยา, 2558)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Fast Digest buffer	10X	2 μ l	1X
<i>EcoRI</i>	1 FDU/ μ l	1 μ l	0.05 FDU
<i>MseI</i>	1 FDU/ μ l	1 μ l	0.05 FDU
DNA template	50 ng/ μ l	10 μ l	25 ng/ μ l
DI water	-	11 μ l	-
ปริมาตรรวม		20 μ l	

ขั้นตอนการเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adaptor 2 ชนิด ได้แก่ *EcoRI* adaptor และ *MseI* adaptor เติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในขั้นตอนนี้ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.7 แล้วผสมด้วยเครื่อง vortex และ spin down จากนั้นนำ digested DNA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมลงในสารเคมีที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มโดยใช้เครื่อง Thermal cycler หรือบ่มในกระบอกน้ำแข็งที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยเครื่อง heat box ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จะได้ ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adaptor แล้ว (ligated DNA)

ตารางที่ 3.7 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอนเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adaptor (เจติยา, 2558)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
T4 DNA ligase buffer	10X	2 μ l	0.5X
T4 DNA ligase	5 U/ μ l	0.2 μ l	0.025 U
<i>Eco</i> RI adaptor	5 pM/ μ l	1 μ l	0.125 pM
<i>Mse</i> I adaptor	25 pM/ μ l	2 μ l	1.25 pM
ATP	10 mM	2 μ l	0.5 mM
digested DNA	-	20 μ l	-
DI water	-	12.8 μ l	-
ปริมาตรรวม		40 μ l	

ขั้นตอน pre-selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และขั้นตอนเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย adaptor (ligated DNA) ในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ *Eco*RI-A และ *Mse*I-C โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในขั้นตอน pre-selective amplification ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.8 ผสมด้วยเครื่อง vortex และ spin down จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่อง Thermal cycler ซึ่งมีอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ ดังตารางที่ 3.9 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker ขนาด 100 bp plus DNA ladder (Vivantis, Malaysia) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในขั้นตอน pre-selective amplification มาทำการเจือจางเป็น 1 ต่อ 20 ได้โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติม TE buffer 95 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ขั้นตอน selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอน pre-selective amplification และเจือจางเป็น 1 ต่อ 20 ในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ชุด *Eco*RI-ANN และไพรเมอร์ชุด *Mse*I-CNN โดย NN คือนิวคลีโอไทด์ 2 ตัวสุดท้ายที่แตกต่างกันออกปอดังตารางที่ 3.2 จากนั้นเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในขั้นตอน selective amplification ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.10 โดยขั้นตอนนี้จะคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ *Eco*RI-ANN จำนวน 10 ไพร-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอร์ และ *MseI*-CNN จำนวน 4 ไพรเมอร์สามารถจับคู่ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ได้จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์

ตารางที่ 3.8 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอน pre-selective amplification (เจติยา, 2558)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
<i>Taq</i> DNA polymerase	5,000 U/ml	0.2 μ l	0.04 U
PCR buffer	10X	2.5 μ l	1X
<i>EcoRI</i> -A	5 pM/ μ l	1 μ l	0.2 pM
<i>MseI</i> -C	5 pM/ μ l	1 μ l	0.2 pM
MgCl ₂	50 mM	0.6 μ l	1.2 mM
dNTPs	2 mM	2.5 μ l	0.2 mM
ligated DNA	-	2 μ l	-
DI water	-	15.2 μ l	-
ปริมาตรรวม		25 μ l	

ตารางที่ 3.9 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอน pre-selective amplification (เจติยา, 2558)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	94	2	1
Denaturation	94	0.5	
Annealing	56	1	25
Extension	72	1	
Final extension	72	5	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.10 สารเคมี ความเข้มข้นเริ่มต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้าย ที่ใช้ในขั้นตอน selective amplification (เจดिया, 2558)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Taq DNA polymerase	5,000 U/ml	0.2 μ l	0.05 U
PCR buffer	10X	2 μ l	1X
EcoRI-ANN	5 pM/ μ l	1 μ l	0.25 pM
MseI-CNN	5 pM/ μ l	1 μ l	0.25 pM
MgCl ₂	50 mM	0.6 μ l	1.5 mM
dNTPs	2 mM	2 μ l	0.2 mM
diluted pre-selective PCR	1/20X	5 μ l	-
DI water	-	8.2 μ l	-
ปริมาตรรวม		20 μ l	

จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่อง Thermal cycler ซึ่งมีอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ ดังตารางที่ 3.11 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจล (ขนาด กว้างxยาวxหนา: 21x52.5x0.5 เซนติเมตร) มาทำให้สะอาด ด้วยการเช็ดด้วย absolute ethanol ให้สะอาดทั้งสองแผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลัง (กระจกแผ่นสีเหลี่ยม) ด้วย bind site (ประกอบด้วย bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้แผ่นเจลเกาะติดกับกระจกแผ่นหลัง และเช็ดกระจกแผ่นหน้า (กระจกแผ่นที่เป็นทึบ) ด้วย repel silane 1 มิลลิลิตร ถูจนแห้งให้ทั่วทั้งแผ่น ทั้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้แผ่นเจลไม่เกาะติดกระจกแผ่นหน้า นำกระจกทั้งสองแผ่นมาวางประกบเข้าหากัน คั่นด้วยแผ่น spacer (ขนาดกว้างxยาวxหนา: 2x52.5x0.1 เซนติเมตร) ไว้ทั้งสองด้านของกระจก แล้วจึงประกอบตัวล้อกระจกเพื่อป้องกันไม่ให้เจลรั่วซึมในขณะที่วางกระจกลงในแนวนอน จากนั้นเตรียมดีเจอรินพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ใน urea ความเข้มข้น 7.5 โมลาร์ ล้างเจลส่วนเกินให้สะอาดด้วยน้ำ แล้วประกอบกระจกเข้ากับชุด อิเล็กโทรโฟรีซิสแนวตั้ง และเติมบัฟเฟอร์ 1X TBE buffer ในช่องด้านบน และในฐานรองด้านล่างของชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า และทำ pre-run ที่ความต่างศักย์ 2,000 โวลต์ 200 มิลลิแอมป์ 40 วัตต์ นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาให้ปิดเครื่องแล้วใช้เข็มฉีดยาคูดับบัฟเฟอร์ล้างยูเรียในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด (สังเกตได้ว่าไม่มีตะกอนยูเรียในช่องหัว) แล้วจึงเตรียม DNA loading buffer (selective amplification product 8 ไมโครลิตร: AFLP loading buffer 3 ไมโครลิตร) และดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 50 bp DNA ladder (50 bp DNA ladder 1 ไมโครลิตร: deionized water 7 ไมโครลิตร: AFLP loading buffer 3 ไมโครลิตร) ทำการป้อน DNA loading buffer และดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ 98 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นหยอด DNA loading buffer ปริมาตร 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่อง โดยหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน ปริมาตร 11 ไมโครลิตร ที่ช่องแรกและช่องสุดท้าย เปิดเครื่องและทำการ run โดยใช้ความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ 200 มิลลิแอมป์ 40 วัตต์ นาน 2 ชั่วโมง 40 นาที ปิดเครื่อง แล้วแยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน โดยที่เจลจะเกาะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลัง แล้วนำกระจกแผ่นหลังไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่ มาแช่ในสารละลาย fixation ปริมาตร 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 5 นาที เขย่าไปมาเพื่อให้สารละลายทั่วถึงทั้งเจล หลังจากนั้นนำแผ่นกระจกที่มีเจลขึ้นแล้วแช่ลงในสารละลาย impregnation ปริมาตร 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 6-7 นาที เขย่าไปมาเพื่อให้สารละลายทั่วถึงทั้งเจล เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำแผ่นเจลไปแช่ไว้ในสารละลาย development ปริมาตร 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 10 นาที เขย่าไปมาให้สม่ำเสมอเพื่อให้แถบดีเอ็นเอมีสีสม่ำเสมอ และสารละลายทั่วถึงทั้งเจล หลังจากนั้นนำเจลขึ้นแล้วแช่เจลไว้ในสารละลาย stop ปริมาตร 1 ลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา เป็นระยะเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว โดยวิธีการเตรียมสารสำหรับเทคนิค AFLP สามารถศึกษาได้ในภาคผนวก ก นำแผ่นเจลมาฝังให้แห้งทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลผลแถบดีเอ็นเอเป็นค่าคะแนน Binary โดยให้ 1 คะแนนเมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอ และให้ 0 คะแนนเมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc เวอร์ชัน 2.11X (Rohlf, 2000) สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) และแผนภูมิการกระจายด้วยวิธี PCoA

ตารางที่ 3.11 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในขั้นตอน selective amplification (เจติยา, 2558)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	94	2	1
Denaturation	94	0.5	
Annealing	65	1	12
Extension	72	1	
Denaturation	94	0.5	
Annealing	56	1	23
Extension	72	1	
Final extension	72	5	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของการศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อน

การเก็บตัวอย่างผลกระท้อน จะทำการเก็บโดยสำรวจ และติดตามการออกผลหลังการเก็บตัวอย่างใบ โดยการเก็บตัวอย่างผลเพื่อศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อน จะเก็บตัวอย่างที่ไม่อ่อน หรือสุกงอมจนเกินไป โดยสามารถเก็บตัวอย่างผลกระท้อนได้ 27 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 4.1 จากนั้นนำผลกระท้อนมาศึกษาคุณภาพผลกระท้อน ได้แก่ น้ำหนักผล (กรัม) ความหนาเนื้อผล (เซนติเมตร) ความหวาน (องศาบริกซ์) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่าตัวอย่างที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย (KT47) โดยมีน้ำหนัก 758 กรัม ตัวอย่างที่มีน้ำหนักน้อยที่สุดคือ สายพันธุ์ทับทิม (KT26) มีน้ำหนัก 125 กรัม ค่าความหวานสูงสุดคือตัวอย่างสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย (KT33) มีค่าเท่ากับ 21 องศาบริกซ์ และตัวอย่างที่มีค่า pH ต่ำสุด คือสายพันธุ์อีล่า (KT12) มีค่าเท่ากับ 2.77 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

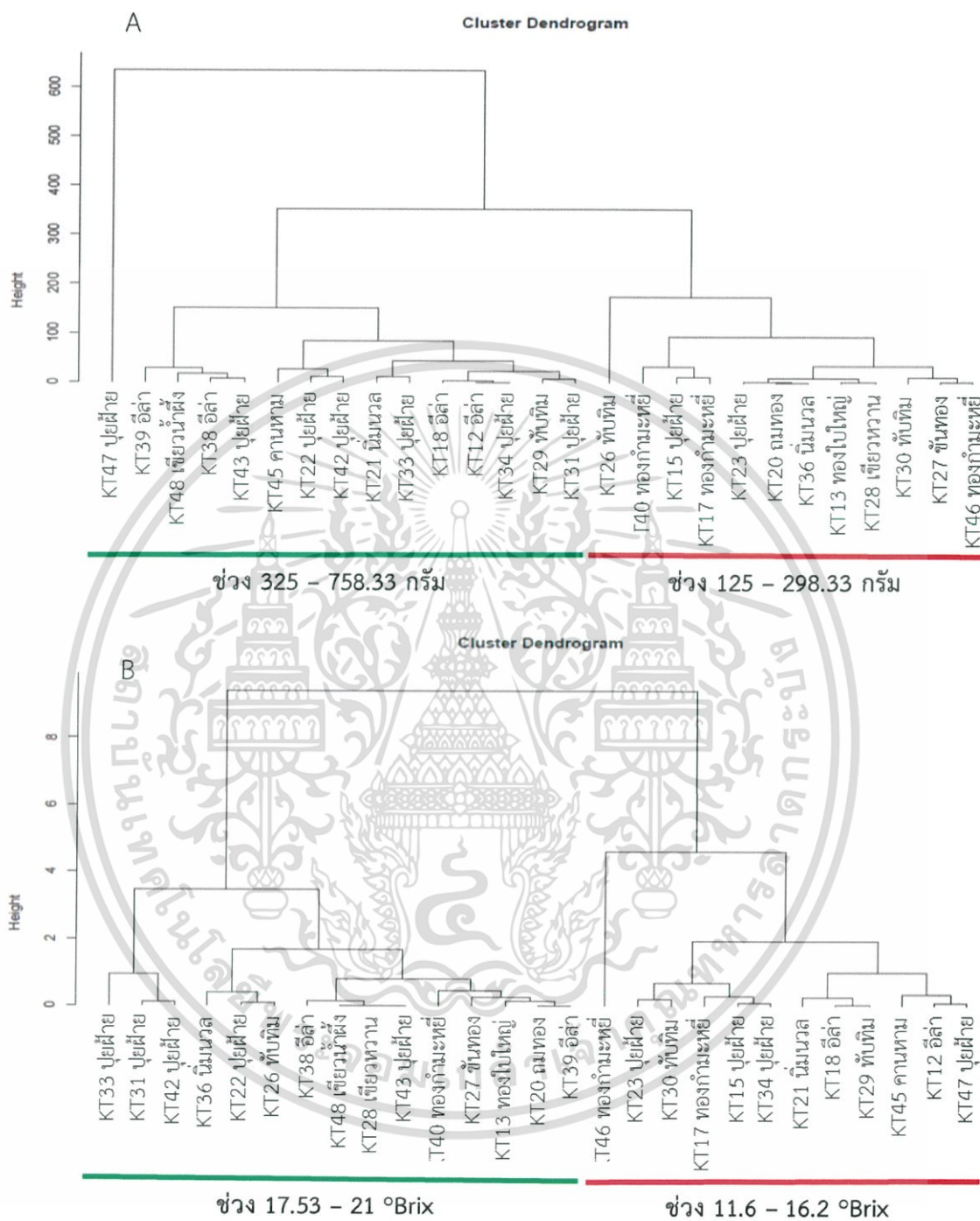
จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลอง มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R Studio เพื่อจัดกลุ่มตัวอย่าง จะได้ dendrogram ของคุณภาพผลกระท้อน พบว่าน้ำหนักของกระท้อนสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (รูปที่ 4.1A) นั่นคือกลุ่มของกระท้อนที่ให้ผลใหญ่ ได้แก่สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และคานหาม มีน้ำหนักในช่วง 325-758.33 กรัม และกระท้อนที่ให้ผลเล็ก ได้แก่สายพันธุ์ทับทิม ทองก้ามะหี นิ่มนวล ทองใบใหญ่ เขียวหวาน และชันทอง มีน้ำหนักในช่วง 125-298.33 กรัม เมื่อพิจารณา dendrogram ของค่าความหวานเนื้อพบสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย (KT22, KT31, KT33 และ KT43) นิ่มนวล (KT36) ทับทิม (KT26) อีล่า (KT38 และ KT39) เขียวน้ำผึ้ง (KT48) เขียวหวาน (KT28) ทองก้ามะหี (KT40) ชันทอง (KT27) ทองใบใหญ่ (KT13) และถมทอง (KT20) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความหวานมาก อยู่ในช่วง 17.53-21 องศาบริกซ์ และสายพันธุ์ทองก้ามะหี (KT17 และ KT46) ทับทิม (KT29 และ KT30) ปุ๋ยฝ้าย (KT15, KT23, KT34 และ KT47) นิ่มนวล (KT21) อีล่า (KT12 และ KT18) และ คานหาม (KT45) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความหวานน้อย อยู่ในช่วง 11.6-16.2 องศาบริกซ์ ดังรูปที่ 4.1B จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย นิ่มนวล ทับทิม อีล่า และทองก้ามะหี กระจายอยู่ทั้งในกลุ่มที่มีความหวานมากและความหวานน้อย และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับค่า pH ของผลกระท้อน ที่พบว่าสายพันธุ์เดียวกันจะกระจายอยู่ในกลุ่มที่มีค่า pH มาก (ช่วง pH 2.98-3.38) และมี pH น้อย (ช่วง pH 2.77-2.90) ดังแสดงในรูปที่ 4.2A ทำให้ทราบว่าค่าความหวาน และค่าความเป็นกรด-ด่างไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์กระท้อน ซึ่งค่าความหวานและค่าความเป็นกรด-ด่างของกระท้อนอาจเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น การบำรุงต้น และสภาพอากาศ เป็นต้น ทำให้ได้ผลกระท้อนที่มีค่าความหวาน และค่า pH ที่แตกต่างกันไป

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าน้ำหนัก ความหนาเนื้อเปลือก ความหวาน และความเป็นกรด-ด่าง ของ
กระท้อน

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	ความหนาเนื้อผล (เซนติเมตร)	ความหวานปุย (องศาบริกซ์)	pH เนื้อผล
KT12 อีล่า	368.33	13.58	15.2	2.77
KT13 ทองใบใหญ่	290.00	12.83	18.00	3.15
KT15 ปุยฝ้าย	216.67	11.76	16.00	3.13
KT17 ทองกำมะหยี่	205.00	11.10	16.20	3.13
KT18 อีล่า	365.00	13.77	14.53	3.10
KT20 ถมทอง	296.67	12.94	18.13	3.12
KT21 นิ่มนวล	396.67	12.68	14.27	3.29
KT22 ปุยฝ้าย	351.67	14.90	18.80	2.90
KT23 ปุยฝ้าย	298.33	11.30	15.73	3.05
KT26 ทับทิม	125.00	9.47	18.87	2.98
KT27 ชั้นทอง	263.33	14.65	17.87	3.01
KT28 เขียวหวาน	288.33	12.24	17.53	2.99
KT29 ทับทิม	380.00	15.52	14.50	3.17
KT30 ทับทิม	275.00	13.60	15.53	3.23
KT31 ปุยฝ้าย	388.33	14.56	20.17	3.17
KT33 ปุยฝ้าย	408.33	15.01	21.00	2.83
KT34 ปุยฝ้าย	368.33	16.93	15.93	3.02
KT36 นิ่มนวล	296.67	13.67	19.20	3.15
KT38 อีล่า	466.67	17.67	17.67	3.38
KT39 อีล่า	448.33	17.07	18.13	3.07
KT40 ทองกำมะหยี่	236.67	13.31	18.33	3.29
KT42 ปุยฝ้าย	340.00	13.35	20.07	3.01
KT43 ปุยฝ้าย	460.00	20.10	17.53	3.18
KT45 คามหาม	325.00	12.74	14.93	2.79
KT46 ทองกำมะหยี่	265.00	13.59	11.60	3.27
KT47 ปุยฝ้าย	758.33	20.33	15.27	3.27
KT48 เขียวน้ำผึ้ง	476.67	12.89	17.54	2.85

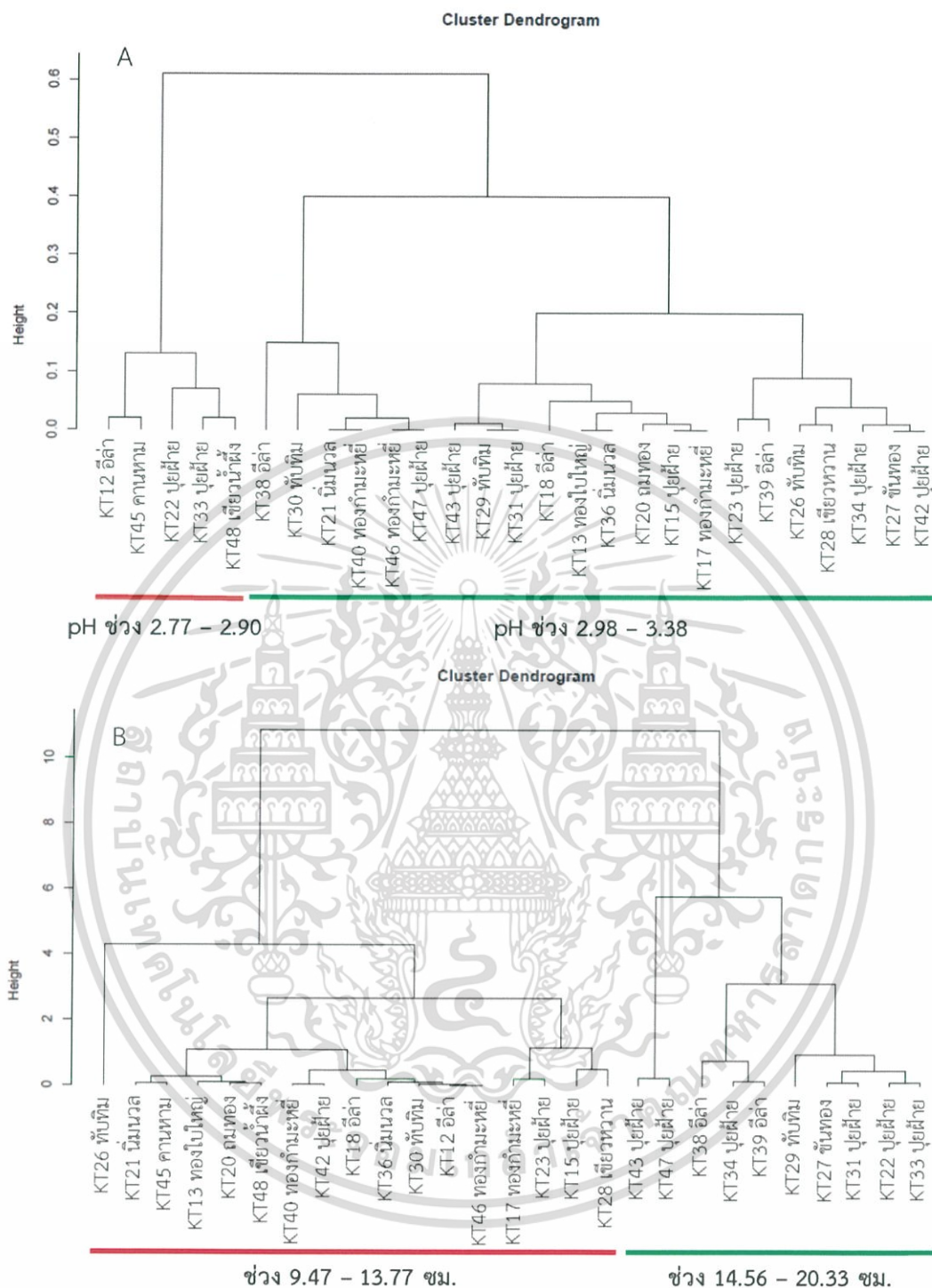
หมายเหตุ ตัวอย่าง KT16, KT19, KT44, KT49, KT50, KT51, KT52, KT54 และ KT55 ไม่สามารถ
เก็บผลกระท้อนได้ เนื่องจากไม่ออกผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 Dendrogram ของคุณภาพผลกระทอน (A) ค่าน้ำหนักผลกระทอน และ (B) ค่าความหวานเนื้อปุย ของตัวอย่างกระทอนจำนวน 27 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RStudio

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 Dendrogram ของคุณภาพผลกระทอน (A) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเนื้อผล และ (B) ค่าความหนาเนื้อผล ของตัวอย่างกระทอนจำนวน 27 ตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม RStudio

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณา dendrogram จากความหนาของเนื้อผลกระทันพบว่า สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย (KT22, KT31, KT33, KT34, KT43, KT47) อีล่า (KT38 และ KT39) ทับทิม (KT29) และชันทอง (KT27) จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความหนาของเนื้อผลมาก อยู่ในช่วง 14.56-20.33 เซนติเมตร และตัวอย่างที่เหลือจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความหนาเนื้อผลน้อย อยู่ในช่วง 9.47-13.77 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2B จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย ส่วนใหญ่มีเนื้อผลหนา และสายพันธุ์ทองใบใหญ่ ทองกำมะหยี่ เขียวหวาน และนิ่มนวล มีความหนาของเนื้อผลน้อย อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถใช้ลักษณะนี้จำแนกได้อย่างเที่ยงตรง เนื่องจากยังพบตัวอย่างของสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้ายบางตัวอย่าง ทับทิม และอีล่า กระจายอยู่ในทั้งสองกลุ่ม จากการทดลองพบว่า เป็นไปตามหนังสือคู่มือปฏิบัติงานสำหรับสมาชิกผู้ขอใช้สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ “กระทันห่อบางกร่าง” ที่แบ่งสายพันธุ์กระทันออกเป็นกระทันสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ เช่น ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และกระทันสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก เช่น ทองกำมะหยี่ เขียวหวาน นิ่มนวล ทับทิม ชันทอง เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังพบการแบ่งกลุ่มที่คลาดเคลื่อนอยู่ โดยพบว่ามีบางตัวอย่างที่เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก แต่ปนอยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ และกระทันสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ ปนในกลุ่มกระทันสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก ซึ่งอาจเกิดจากการระบุสายพันธุ์ของกระทันคลาดเคลื่อนตั้งแต่เริ่มเพาะปลูก

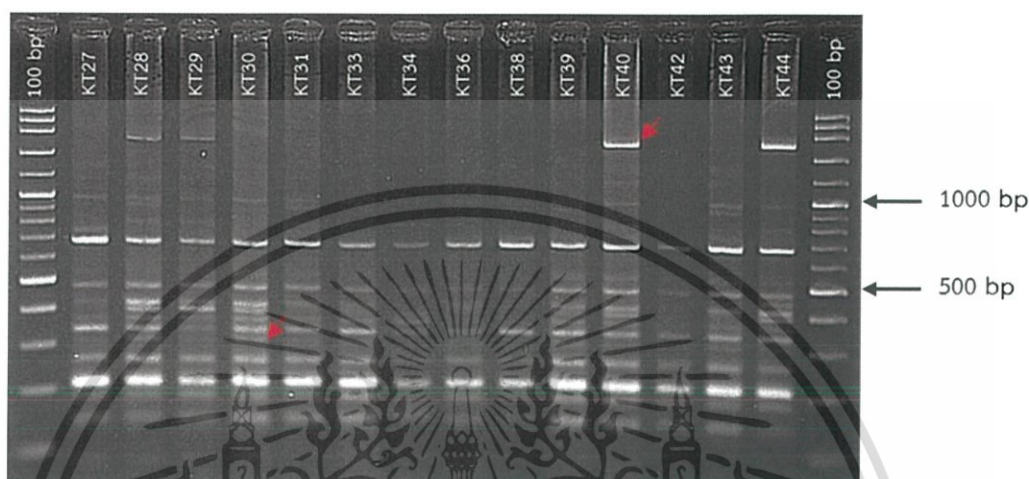
4.2 ผลของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระทันด้วยเทคนิค SRAP

4.2.1 ผลการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ และการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

จากการทดลองโดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ (ดังตารางที่ 3.3) กับกระทันจำนวน 2 ตัวอย่าง โดยเลือกตัวอย่างจากลักษณะที่แตกต่างกันของผลกระทัน ได้แก่ ปุ๋ยฝ้าย (KT22) ที่มีลักษณะผลขนาดใหญ่ และเขียวหวาน (KT28) ที่มีลักษณะผลขนาดเล็ก พบว่ามี 9 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ME1/EM3, ME1/EM5, ME2/EM5, ME2/EM6, ME3/EM3, ME3/EM4, ME4/EM1, ME5/EM2 และ ME5/EM4 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างใน 2 ตัวอย่าง จึงนำคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกจำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระทันทั้งหมดจำนวน 36 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้คู่ไพรเมอร์แต่ละชนิด ดังตัวอย่างในรูปที่ 4.3 เป็นตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ ME5/EM4 พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน จำนวน 16 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (ลูกศรสีแดง) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่ไพรเมอร์ จะได้ข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 4.2 พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันโดยมีจำนวนน้อยที่สุด 11 แถบ ในคู่ไพรเมอร์ ME1/EM5 และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มากที่สุดคือ 17 แถบ ในคู่ไพรเมอร์ ME5/EM2 และได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 128 แถบ เฉลี่ย 14.22 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 100 คู่เบส (คู่ไพรเมอร์ ME5/EM2) ถึง 1,900 คู่เบส (คู่ไพรเมอร์ ME5/EM4 และ ME3/EM4) โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 128 แถบ พบว่ามี polymorphic band ในกระต่อนทั้ง 36 ตัวอย่าง จำนวน 53 แถบ เฉลี่ยอยู่ที่ 5.89 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ (คิดเป็น 41.41 เปอร์เซ็นต์) โดยคู่ไพรเมอร์ ME5/EM2 ให้ เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands สูงที่สุดคือ 58.82 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองที่ เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands เท่ากับ 41.41 เปอร์เซ็นต์ พบมีค่าที่ต่ำเนื่องจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกัน



รูปที่ 4.3 แถบดีเอ็นเอของกระต่อนจำนวน 14 ตัวอย่าง จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ME5/EM4 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ลูกศรสีแดงแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง

4.2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระต่อนด้วยเทคนิค SRAP

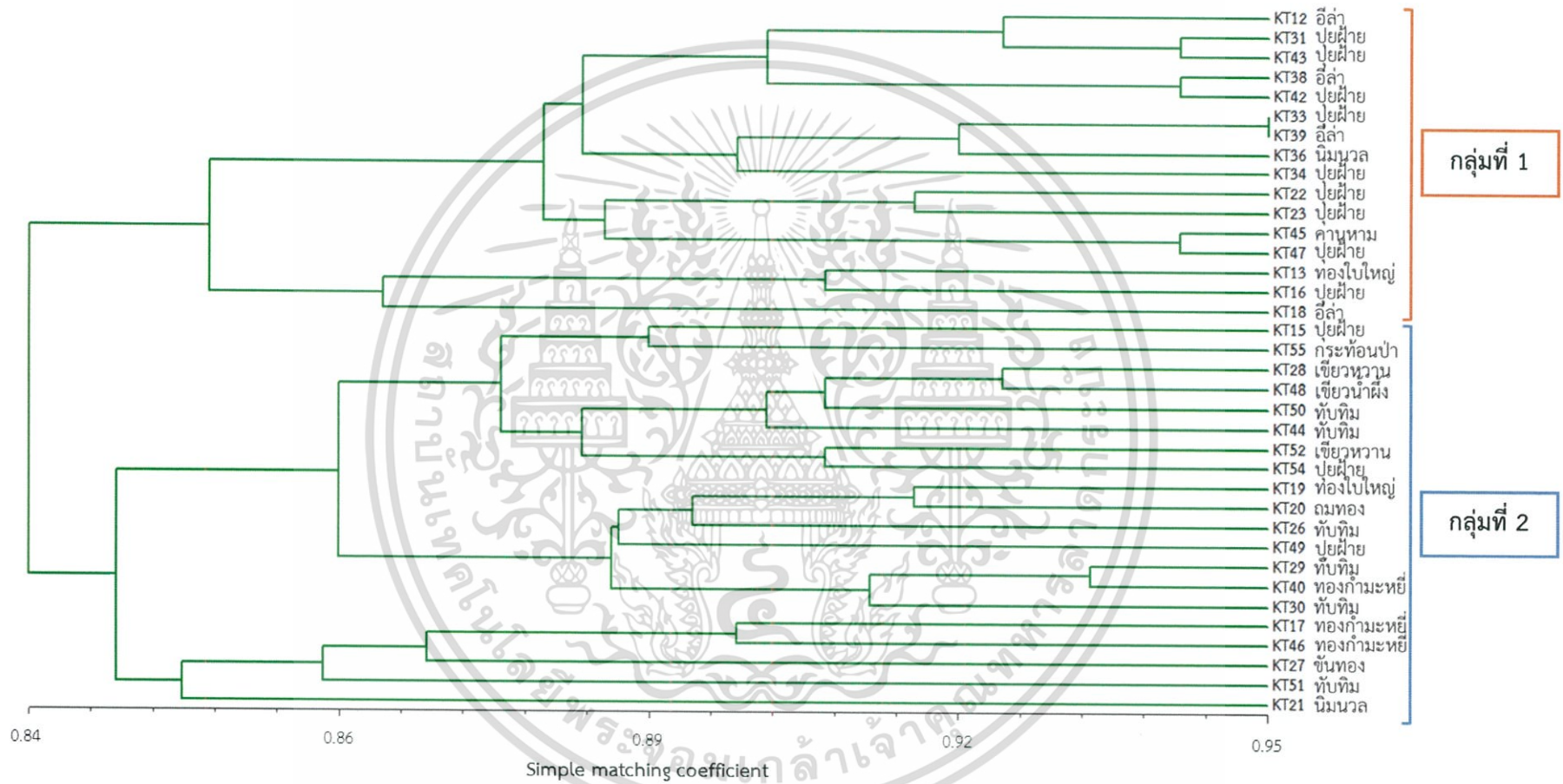
เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP ของกระต่อนจำนวน 36 ตัวอย่าง จำนวน 128 แถบจาก 9 คู่ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน simple matching ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ซึ่งเป็นการคำนวณค่าคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity) ของแต่ละตัวอย่าง พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.84-0.95 และเมื่อนำข้อมูลมาสร้าง dendrogram ของกระต่อนจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยวิธี UPGMA พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.84 สามารถแบ่งกลุ่มของกระต่อนได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ปูฝ้าย 9 ตัวอย่าง (KT16, KT22, KT23, KT31, KT34, KT37, KT42, KT43 และ KT47) สายพันธุ์อีล่า 4 ตัวอย่าง (KT12, KT18, KT38 และ KT39) สายพันธุ์น้มนวล 1 ตัวอย่าง (KT36) สายพันธุ์คานหาม 1 ตัวอย่าง (KT45) และสายพันธุ์ทองใบใหญ่ 1 ตัวอย่าง (KT13) และกลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ปูฝ้าย 3 ตัวอย่าง (KT15, KT49 และ KT54) กระต่อนป่า 1 ตัวอย่าง (KT55) สายพันธุ์เขียวหวาน 2 ตัวอย่าง (KT28 และ KT52) สายพันธุ์เขียวน้ำผึ้ง 1 ตัวอย่าง (KT48) สายพันธุ์ทับทิม 6 ตัวอย่าง (KT26, KT29, KT30, KT44, KT50 และ KT51) สายพันธุ์ทองใบใหญ่ 1 ตัวอย่าง (KT19) สายพันธุ์มทอง 1 ตัวอย่าง (KT20) สายพันธุ์ทองกำมะหยี่ 3 ตัวอย่าง (KT40, KT17 และ KT18) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต ไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตาม หากมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ KT46) สายพันธุ์ชั้นทอง 1 ตัวอย่าง (KT27) และสายพันธุ์น้มนวล 1 ตัวอย่าง (KT21) ดังรูปที่ 4.4 อย่างไรก็ตามยังมีกระท้อนสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย (KT15, KT49 และ KT54) กระจายตัวอยู่ในกลุ่มที่ 2 และมีสายพันธุ์น้มนวล (KT21 และ KT36) และทองใบใหญ่ (KT13 และ KT19) กระจายตัวอยู่ที่ 2 กลุ่ม จาก dendrogram ที่ได้พบว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์กระท้อนที่ให้ผลกระท้อนที่มีขนาดใหญ่ ส่วนตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 เป็นกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก

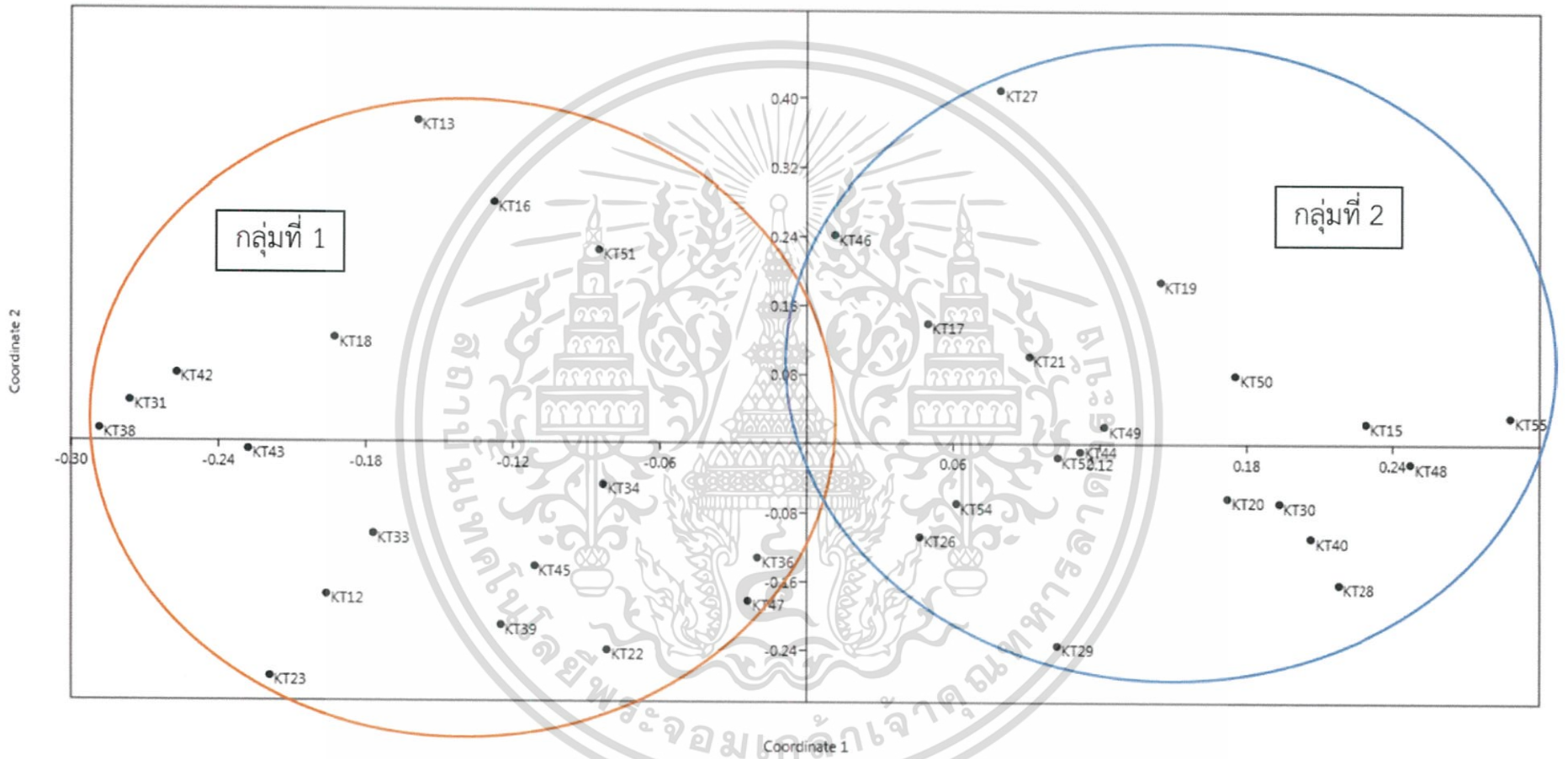
ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP จากตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic band	เปอร์เซ็นต์ polymorphic band
ME1/EM3	15	4	26.67
ME1/EM5	11	3	27.27
ME2/EM5	13	4	30.77
ME2/EM6	12	4	33.33
ME3/EM3	15	6	40.00
ME3/EM4	16	5	31.25
ME4/EM1	13	8	61.54
ME5/EM2	17	10	58.82
ME5/EM4	16	9	56.25
รวม	128	53	
เฉลี่ย	14.22	5.89	41.41

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP มาใช้วิเคราะห์การกระจาย (PCoA) ของตัวอย่างกระท้อน โดยใช้โปรแกรม Past version 3.14 จะได้แผนภูมิการกระจายของตัวอย่างกระท้อน ดังรูปที่ 4.5 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างกระท้อนออกได้เป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มตาม dendrogram ในรูปที่ 4.4 โดยเมื่อพิจารณาร่วมกับ dendrogram ที่ได้จากข้อมูลนี้ นักผลพบว่า การแบ่งกลุ่มของเทคนิค SRAP สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มของคุณภาพผลในด้านของน้ำหนัก จึงอาจกล่าวได้ว่า เทคนิค SRAP มีแนวโน้มในการจัดกลุ่มตัวอย่างตามน้ำหนักผลของแต่ละสายพันธุ์



รูปที่ 4.4 Dendrogram ของกระท้อน จำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ด้วยวิธี UPGMA



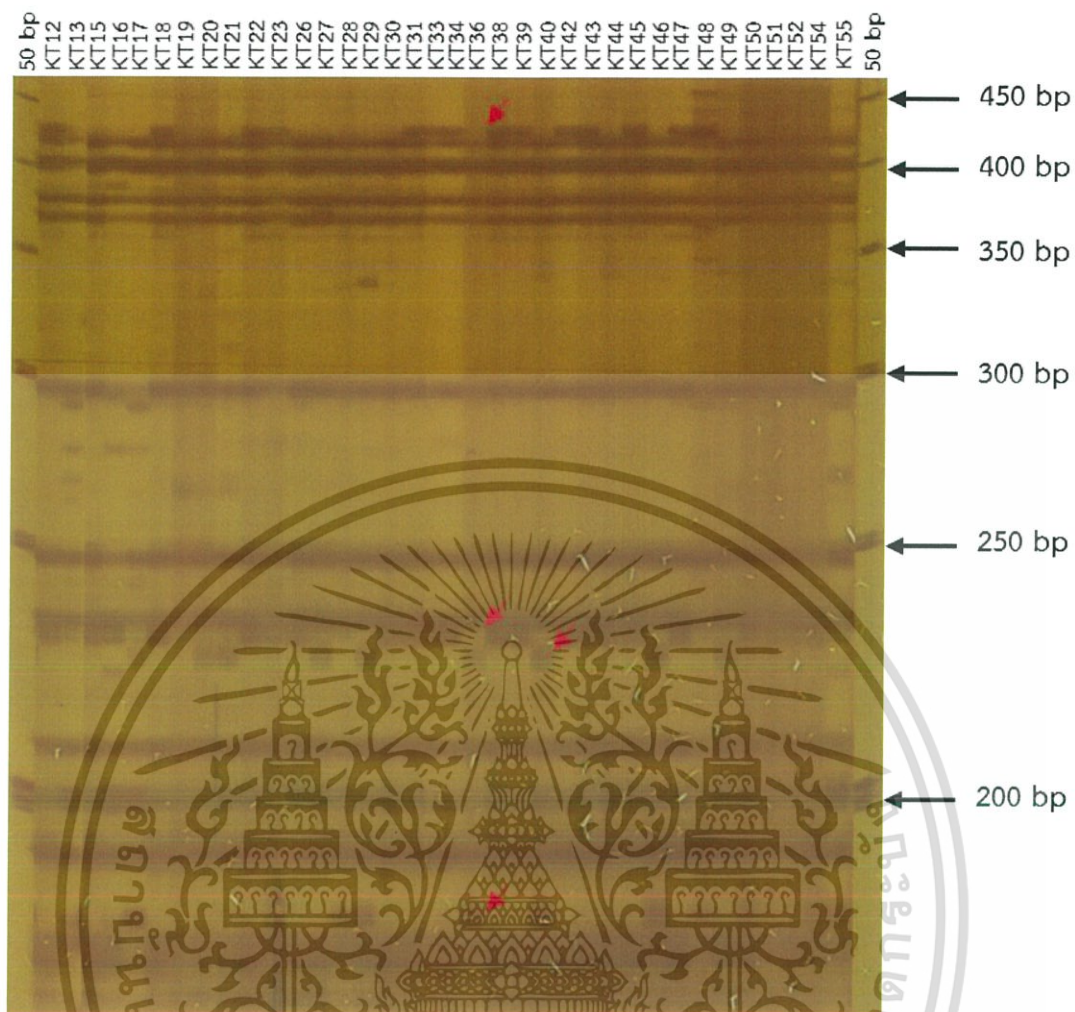
รูปที่ 4.5 แผนภูมิการกระจายของกระต้อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP

4.3 ผลของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค AFLP

4.3.1 ผลการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ และการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

จากการทดลองโดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์ (ดังตารางที่ 3.2) กับกระท้อนจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยเลือกตัวอย่างกระท้อนที่นำมาทดสอบการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์จากการแยกออกจากกันอยู่คนละกิ่งของ dendrogram ที่ได้จากเทคนิค SRAP ได้แก่ ปุยฝ้าย (KT22) ชันทอง (KT27) เขียวหวาน (KT28) และทองกำมะหยี่ (KT40) ซึ่งทำให้การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นจากการทดลองพบว่า มี 7 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ *MseI*-CAA/*EcoRI*-ACA, *MseI*-CAA/*EcoRI*-ACC, *MseI*-CAA/*EcoRI*-ACT, *MseI*-CAA/*EcoRI*-AGC, *MseI*-CAA/*EcoRI*-AGG, *MseI*-CAC/*EcoRI*-AAG และ *MseI*-CAC/*EcoRI*-ACA ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในทั้ง 4 ตัวอย่าง จึงนำคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกจำนวน 7 คู่ไพรเมอร์นี้ มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนทั้งหมดจำนวน 36 ตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้คู่ไพรเมอร์แต่ละชนิด โดยในรูปที่ 4.6 เป็นตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ *MseI*-CAA/*EcoRI*-AGC พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจำนวน 31 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (ลูกศรสีแดง) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ไพรเมอร์ ทำให้ได้ข้อมูลของแถบดีเอ็นเอดังตารางที่ 4.3 พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันโดยจำนวนน้อยที่สุดจำนวน 14 แถบในคู่ไพรเมอร์ *MseI*-CAA/*EcoRI*-ACT และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มากที่สุดจำนวน 31 แถบในคู่ไพรเมอร์ *MseI*-CAA/*EcoRI*-AGC และ *MseI*-CAA/*EcoRI*-AGG และได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 171 แถบ เฉลี่ย 24.43 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 150 คู่เบส ถึง 916 คู่เบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ในจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 171 แถบ พบว่ามี polymorphic band ในกระท้อนทั้ง 36 ตัวอย่าง จำนวน 91 แถบ เฉลี่ยอยู่ที่ 13 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ (คิดเป็น 53.22 เปอร์เซ็นต์) โดยคู่ไพรเมอร์ *MseI*-CAA/*EcoRI*-ACT ให้เปอร์เซ็นต์ polymorphic band สูงที่สุดคือ 71.43 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 4.3)



รูปที่ 4.6 แถบดีเอ็นเอของกระถ่อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค AFLP โดยใช้คูไพรเมอร์ *MseI*-CAV*EcoRI*-AGC เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ลูกศรสีแดงแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในเทคนิค AFLP จากตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic band	เปอร์เซ็นต์ polymorphic band
<i>MseI</i> -CAA/ <i>EcoRI</i> -ACA	22	11	50.00
<i>MseI</i> -CAA/ <i>EcoRI</i> -ACC	21	10	47.62
<i>MseI</i> -CAA/ <i>EcoRI</i> -ACT	14	10	71.43
<i>MseI</i> -CAA/ <i>EcoRI</i> -AGC	31	14	45.16
<i>MseI</i> -CAA/ <i>EcoRI</i> -AGG	31	21	67.74
<i>MseI</i> -CAC/ <i>EcoRI</i> -AAG	30	14	46.67
<i>MseI</i> -CAC/ <i>EcoRI</i> -ACA	22	11	50.00
รวม	171	91	
เฉลี่ย	24.43	13	53.22

4.3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค AFLP

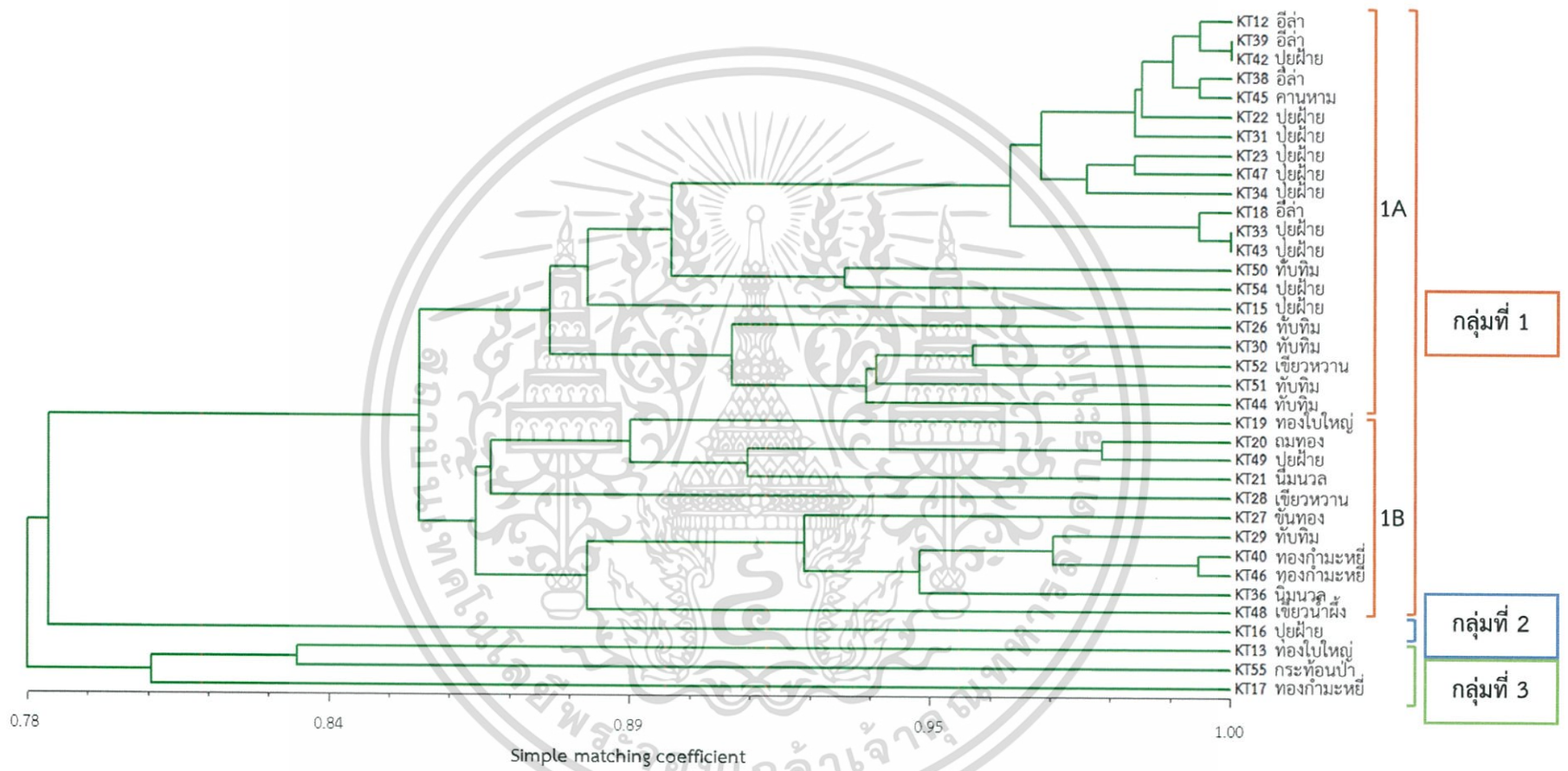
เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP ของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่าง จำนวน 171 แถบจาก 7 คู่ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน simple matching ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X พบว่าผลการทดลองจากคู่ไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ไพรเมอร์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.78-1.00 และเมื่อนำข้อมูลมาสร้าง dendrogram ของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยวิธี UPGMA พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.79 สามารถแบ่งกลุ่มของกระท้อนได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างเกือบทั้งหมด (32 ตัวอย่าง) ซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 มีเพียงตัวอย่างเดียวคือ สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย (KT16) และกลุ่มที่ 3 ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ทองใบใหญ่ 1 ตัวอย่าง (KT13) กระท้อนป่า 1 ตัวอย่าง (KT55) และสายพันธุ์ทองกำมะหยี่ 1 ตัวอย่าง (KT17) ดังรูปที่ 4.7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง KT13 และ KT17 มีความใกล้ชิดกับกระท้อนป่า (KT55)

เมื่อพิจารณากลุ่มที่ 1 จะสามารถแบ่งตัวอย่าง ได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ดังรูปที่ 4.7 ได้แก่กลุ่ม 1A ซึ่งประกอบไปด้วยตัวอย่างสายพันธุ์อีล่า 4 ตัวอย่าง (KT12, KT38, KT39 และ KT18) สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย 10 ตัวอย่าง (KT15, KT22, KT23, KT31, KT33, KT34, KT42, KT43, KT47 และ KT54) สายพันธุ์คานหาม 1 ตัวอย่าง (KT45) สายพันธุ์ทับทิม 5 ตัวอย่าง (KT26, KT30, KT44, KT50 และ KT51) และสายพันธุ์เขียวหวาน 1 ตัวอย่าง (KT52) ซึ่งจะพบการจับกลุ่มกันของตัวอย่างสายพันธุ์อีล่า ปุ๋ยฝ้าย และคานหาม ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ และกลุ่มของสายพันธุ์ทับทิม และเขียวหวาน ซึ่งให้ผลขนาดเล็ก และกลุ่ม 1B ซึ่งประกอบไปด้วยตัวอย่างสายพันธุ์ทองใบใหญ่ 1 ตัวอย่าง (KT19)

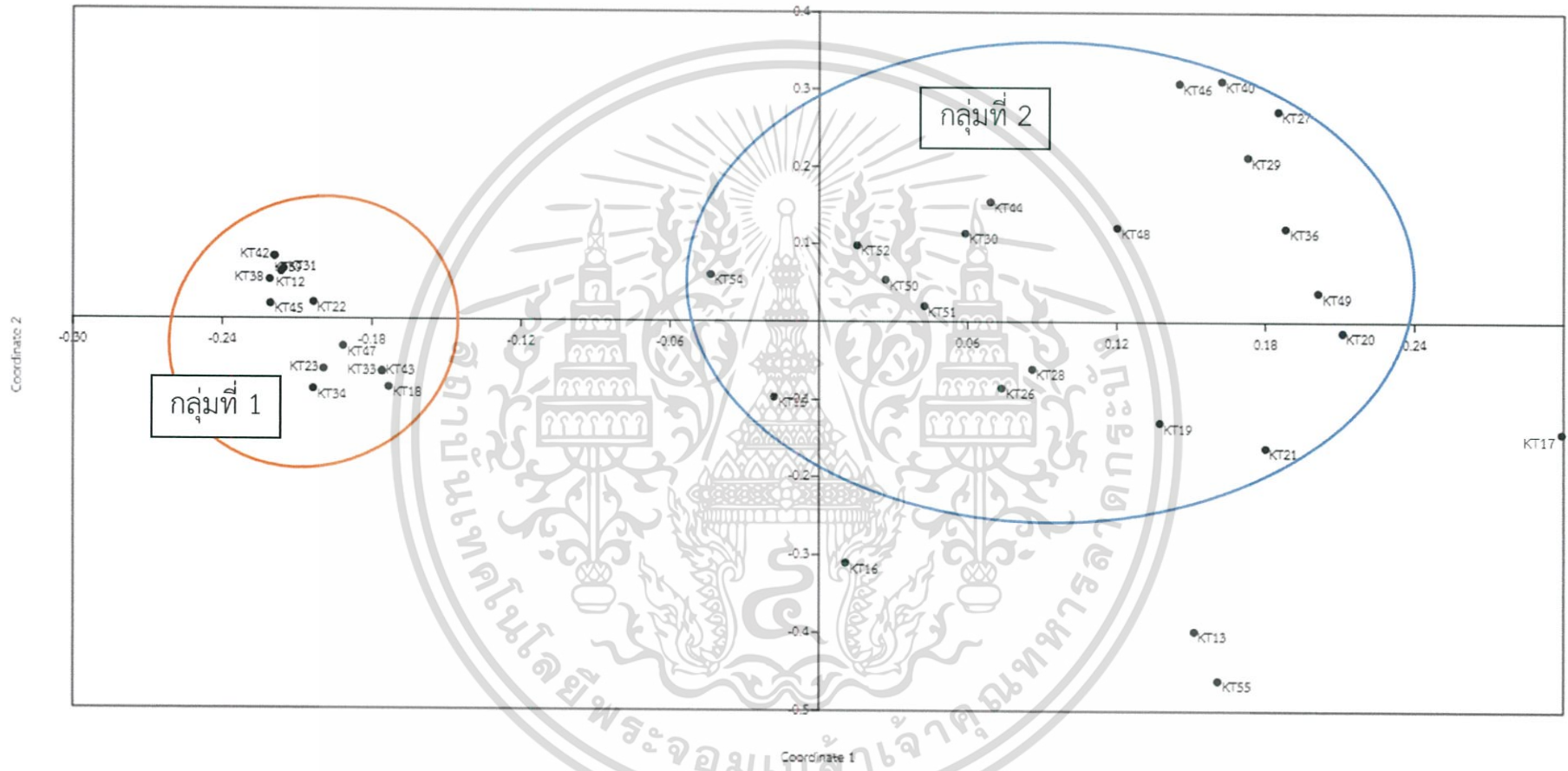
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์มทอง 1 ตัวอย่าง (KT20) สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย 1 ตัวอย่าง (KT49) สายพันธุ์นิ่มนวล 2 ตัวอย่าง (KT21 และ KT36) สายพันธุ์เขียวหวาน 1 ตัวอย่าง (KT28) สายพันธุ์ชันทอง 1 ตัวอย่าง (KT27) สายพันธุ์ทับทิม 1 ตัวอย่าง (KT29) สายพันธุ์ทองกำมะหยี่ 2 ตัวอย่าง (KT40, KT46) และสายพันธุ์เขียวน้ำผึ้ง 1 ตัวอย่าง (KT48) ในกลุ่ม 1B นี้มีข้อสังเกตคือชื่อตัวอย่างสายพันธุ์กระท้อนในกลุ่มนี้ มีคำว่าทองอยู่ในชื่อสายพันธุ์ อาจกล่าวได้ว่าผลกระท้อนในกลุ่มนี้มีเจดสีที่แตกต่างจากกระท้อนกลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามในการศึกษารั้งนี้ไม่ได้เก็บข้อมูลเกี่ยวกับเจดสีของผลกระท้อนไว้ จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์เจดสีได้

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP มาใช้วิเคราะห์การกระจาย (PCoA) ของตัวอย่างกระท้อน โดยใช้โปรแกรม Past version 3.14 จะได้แผนภูมิการกระจายของตัวอย่างกระท้อน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างกระท้อนออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยกระท้อนสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และคานหาม ซึ่งเป็นกระท้อนที่มีผลขนาดใหญ่ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างที่หลากหลายสายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นกระท้อนที่ให้ผลขนาดเล็ก และพบตัวอย่างที่กระจายออกไปเดี่ยวๆ ได้แก่ ทองใบใหญ่ (KT13) ปุ๋ยฝ้าย (KT13) ทองกำมะหยี่ (KT17) และกระท้อนป่า (KT55) ดังรูปที่ 4.8 จากแผนภูมิการกระจายที่ได้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค AFLP มีความสามารถในการแบ่งกลุ่มสายพันธุ์กระท้อนตามขนาดของผลกระท้อน อีกทั้งยังพบส่วนที่แตกต่างจาก dendrogram คือการกระจายตัวของตัวอย่าง KT26, KT30, KT44, KT50, KT51 และ KT52 ซึ่งเป็นตัวอย่างสายพันธุ์ทับทิม และเขียวหวาน โดยกระท้อน 2 สายพันธุ์นี้เป็นกระท้อนสายพันธุ์ที่มีผลขนาดเล็ก กระจายตัวอยู่ใกล้กับกลุ่มที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ทับทิม และเขียวหวานที่มีผลขนาดเล็กเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.7 Dendrogram ของกระท้อน จำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค AFLP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ด้วยวิธี UPGMA



รูปที่ 4.8 แผนภูมิการกระจายของกระต่อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค AFLP

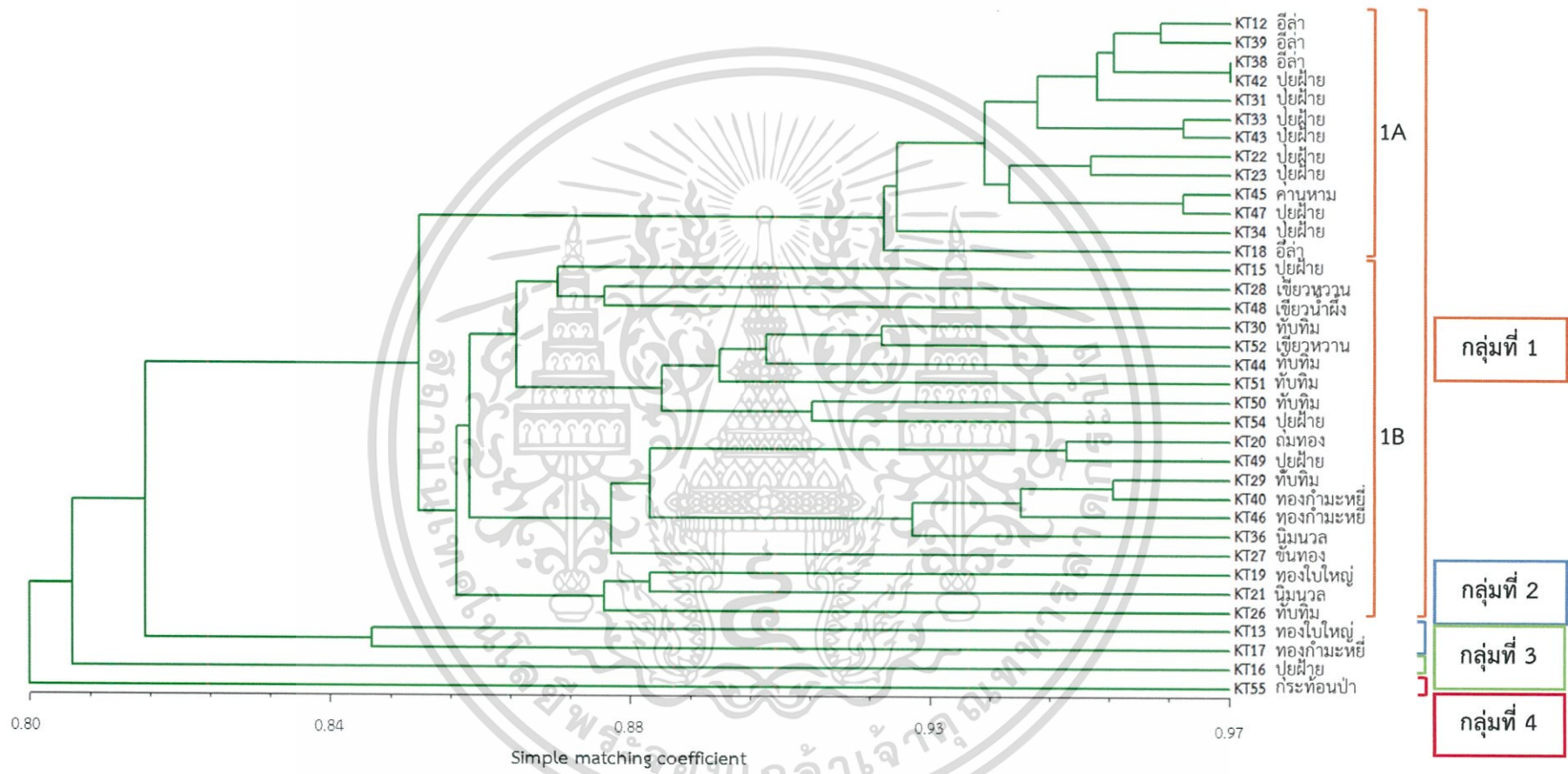
4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP ของกระท้อน 36 ตัวอย่าง จำนวน 128 แถบ จาก 9 คู่ไพรเมอร์ และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP ของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่าง จำนวน 171 แถบจาก 7 คู่ไพรเมอร์ รวมจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP และ AFLP เท่ากับ 299 แถบ นำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน simple matching ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.80-0.97 เมื่อนำข้อมูลมาสร้าง dendrogram ของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยวิธี UPGMA พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.82 สามารถแบ่งตัวอย่างได้ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังรูปที่ 4.9 ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างกระท้อนเกือบทั้งหมด กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ทองใบใหญ่ 1 ตัวอย่าง (KT13) และสายพันธุ์ทองกำมะหยี่ 1 ตัวอย่าง (KT17) กลุ่มที่ 3 มีเพียง 1 ตัวอย่างได้แก่สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย (KT16) และกลุ่มที่ 4 มีเพียง 1 ตัวอย่างได้แก่กระท้อนป่า (KT55)

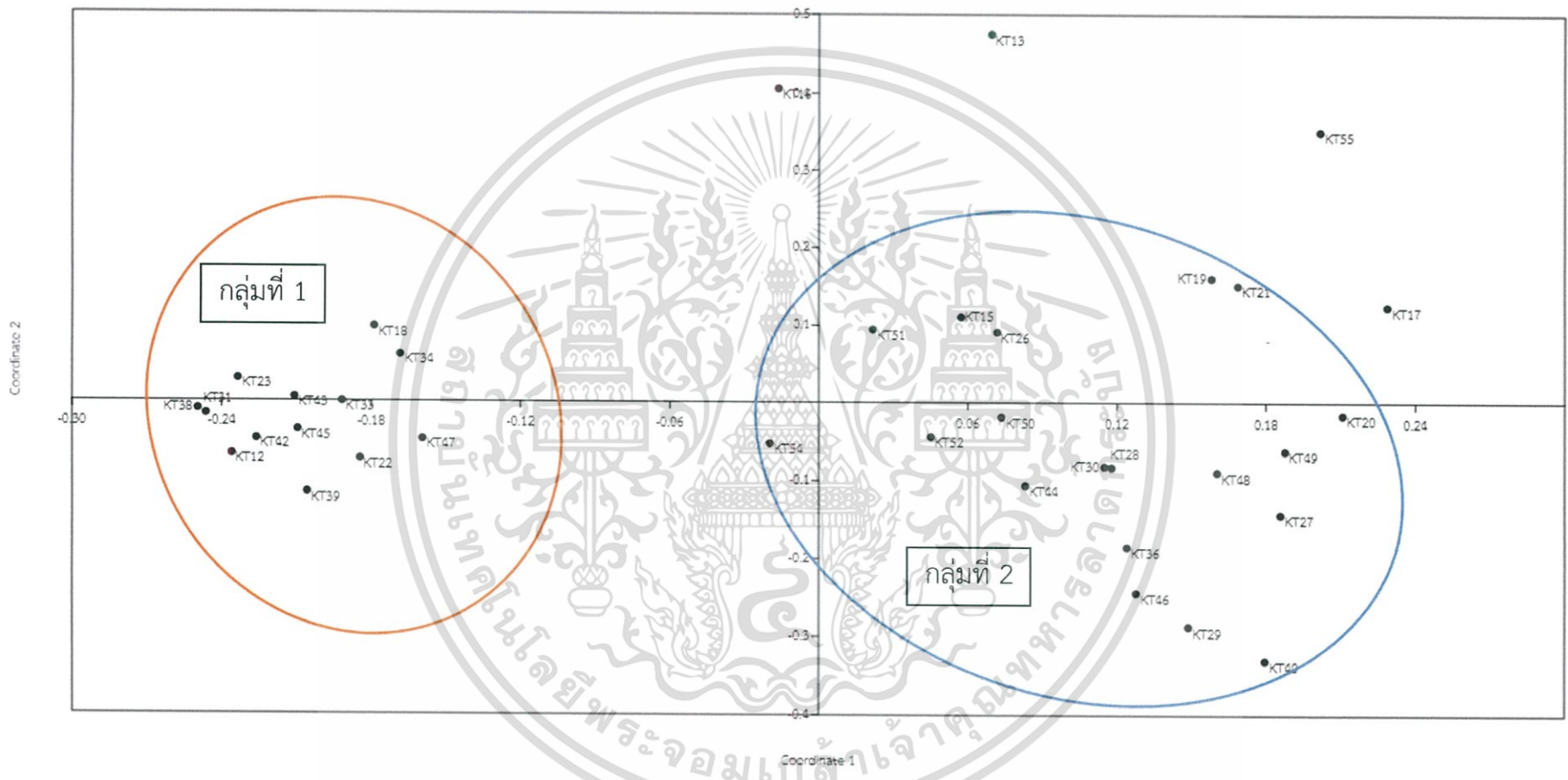
เมื่อพิจารณาตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างภายในกลุ่มที่ 1 ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่กลุ่ม 1A ซึ่งประกอบไปด้วยตัวอย่างสายพันธุ์อีล่า 4 ตัวอย่าง (KT12, KT38, KT39 และ KT18) สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย 8 ตัวอย่าง (KT22, KT23, KT31, KT33, KT34, KT42, KT43 และ KT47) และสายพันธุ์คานหาม 1 ตัวอย่าง (KT45) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ และกลุ่ม 1B ซึ่งประกอบไปด้วยตัวอย่างสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย 3 ตัวอย่าง (KT15, KT49 และ KT54) สายพันธุ์เขียวหวาน 2 ตัวอย่าง (KT28 และ KT52) สายพันธุ์เขียวน้ำผึ้ง 1 ตัวอย่าง (KT48) สายพันธุ์ทับทิม 6 ตัวอย่าง (KT29, KT29, KT30, KT44, KT50 และ KT51) สายพันธุ์ถมทอง 1 ตัวอย่าง (KT20) สายพันธุ์ทองกำมะหยี่ 2 ตัวอย่าง (KT40 และ KT46) สายพันธุ์นิ่มนวล 2 ตัวอย่าง (KT21 และ KT36) สายพันธุ์ชันทอง 1 ตัวอย่าง (KT27) และสายพันธุ์ทองใบใหญ่ 1 ตัวอย่าง (KT19) ซึ่งเป็นกระท้อนที่ให้ผลขนาดเล็ก

เมื่อพิจารณากลุ่ม 1B พบว่าประกอบด้วยตัวอย่างกระท้อนหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลที่มีขนาดเล็ก และพบการจับกลุ่มกันของตัวอย่างที่เป็นสายพันธุ์เขียวหวานและทับทิม แสดงถึงความใกล้ชิดกันของสายพันธุ์ดังกล่าว อีกทั้งยังพบข้อสังเกตถึงการจับกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าว่าทองอยู่ภายในชื่อของสายพันธุ์เช่นเดียวกันกับ dendrogram ที่ได้จากเทคนิค AFLP อีกด้วย

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP มาวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิค AFLP จะทำให้ได้แผนภูมิการกระจายของตัวอย่างกระท้อนโดยใช้โปรแกรม Past version 3.14 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างกระท้อนออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยกระท้อน



รูปที่ 4.9 Dendrogram ของกระท้อน จำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ด้วยวิธี UPGMA



รูปที่ 4.10 แผนภูมิการกระจายของกระต้อนจำนวน 36 ตัวอย่างจากเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP

สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และคานหาม โดยกระท้อนในกลุ่มนี้เป็นกระท้อนที่ให้ผลใหญ่ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งเป็นกระท้อนที่ให้ผลเล็ก และพบการกระจายของตัวอย่าง ทองใบใหญ่ (KT13) ปุ๋ยฝ้าย (KT16) ทองกำมะหยี่ (KT17) และ กระท้อนป่า (KT55) ออกจากกลุ่ม จากแผนภูมิการกระจายนี้ จะสังเกตเห็นได้ว่าการแบ่งกลุ่มของตัวอย่างที่ใกล้เคียงกับ dendrogram และแผนภูมิการกระจายของเทคนิค AFLP (รูปที่ 4.8)

จากผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP มีการแบ่งกลุ่มที่สอดคล้องกับผลของการแบ่งกลุ่มโดยใช้คุณภาพของผลกระท้อนในด้านน้ำหนักผลกระท้อน อาจกล่าวได้ว่ากระท้อนสามารถแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ได้ตามน้ำหนักของผล ส่วนคุณภาพผลในด้านความหนาของเนื้อเปลือก ความหวาน และค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่า ไม่สัมพันธ์กับผลที่ได้จากเทคนิคทั้ง 3 ชนิด

4.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (analysis of molecular variance; AMOVA) ของเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP โดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.5.2.2 พบว่าหากแบ่งกลุ่มประชากรโดยพิจารณาจากจังหวัดที่เป็นถิ่นที่อยู่ของตัวอย่างกระท้อน จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มประชากร ได้แก่ กลุ่มประชากรจากจังหวัดลพบุรี นนทบุรี นครนายก และปราจีนบุรี จะได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันของเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากรอยู่ที่ 4.23 3.52 และ 3.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากรอยู่ที่ 95.77 96.48 และ 96.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 จากการทดลองที่สอดคล้องกันนี้แสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกระท้อนระหว่างกลุ่มประชากร หรือระหว่างจังหวัดไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งแตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากร แสดงให้เห็นว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกระท้อนภายในกลุ่มประชากรสูง หรือกล่าวได้ว่า สถานที่อยู่ของต้นกระท้อนไม่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่สายพันธุ์ที่หลากหลายของกระท้อนในแต่ละจังหวัดนั้นมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนภายในกลุ่มประชากรที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจากการที่เกษตรกรได้คัดเลือกสายพันธุ์กระท้อนที่ต้องการเพาะปลูก และมีหลากหลายสายพันธุ์ในพื้นที่เดียวกัน โดยค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากรที่น้อยกว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากรนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abedian *et al.* (2012) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชอร์รี่ (*Prunus mahaleb* และ *Prunus avium*) โดยใช้เทคนิค SRAP โดยพบว่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยพิจารณาแบ่งกลุ่มประชากรจากความสูงของต้นเชอร์รี่พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร (2.5 เปอร์เซ็นต์) น้อยกว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากร (97.5 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาค่า F_{st} ซึ่งเป็นค่าที่แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าค่า F_{st} ที่ได้จากเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP ให้ค่าที่สอดคล้องกันนั้นคือ 0.042, 0.035 และ 0.038 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำของกระท้อน โดย Diaz-matallana *et al.* (2009) ได้ให้ความหมายของค่า F_{st} ในช่วง 0.00-0.05 คือมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ สาเหตุที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนต่ำ อาจเกิดจากการใช้วิธีขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศของเกษตรกรที่ต้องการเพิ่มปริมาณกิ่งพันธุ์ ซึ่งส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนต่ำ

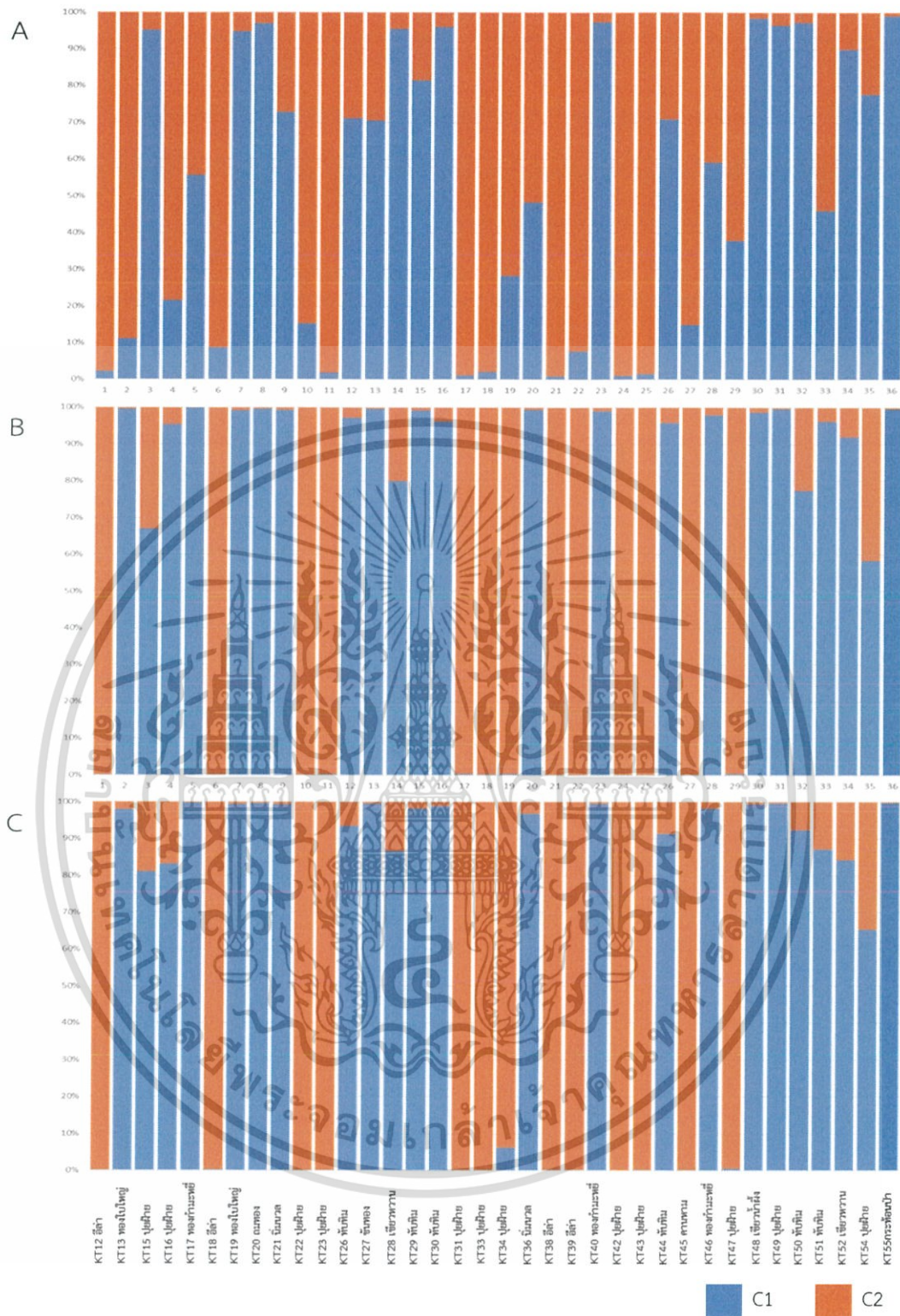
ตารางที่ 4.4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (AMOVA) ของเทคนิค SRAP, AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP

แหล่งของความแปรปรวน	เทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP		
	SRAP	AFLP	AFLP
เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวน			
1. ระหว่างกลุ่มประชากร	4.23	3.52	3.83
2. ภายในกลุ่มประชากร	95.77	96.48	96.17
ค่า F_{st}	0.042	0.035	0.038

4.6 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP ของกระท้อนจำนวน 36 ตัวอย่าง จำนวน 171 แถบจาก 7 คู่ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Structure version 2.3.4 จะได้กราฟโครงสร้างทางพันธุกรรม (Structure) ของกระท้อนจากเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP ดังรูปที่ 4.11A-C ตามลำดับ พบว่ารูปแบบประชากรของกระท้อนประกอบไปด้วย 2 รูปแบบ

เมื่อพิจารณาจากทั้ง 3 เทคนิคพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน นั่นคือสามารถแบ่งโครงสร้างทางพันธุกรรมออกเป็น 2 รูปแบบ (K=2) คือ C1 และ C2 โดยตัวอย่างที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมแบบ C1 (สีฟ้า) เป็นส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ทองคำมะหี๋ย ทองใบใหญ่ ถมทอง นิ่มนวล ทับทิม ขันทอง เขียวหวาน เขียวน้ำผึ้ง และกระท้อนป่า ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้เป็นสายพันธุ์ของกระท้อนพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก และตัวอย่างที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมแบบ C2 (สีส้ม) ประกอบไปด้วยกระท้อนสายพันธุ์อีล่า ปุยฝ้าย และคานหามซึ่งเป็นกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ อีกทั้งยังสอดคล้องกับการจัดกลุ่มของ dendrogram และแผนภูมิการกระจายของแต่ละเทคนิคอีกด้วย อย่างไรก็ตามโครงสร้างทางพันธุกรรมของกระท้อนโดยใช้เทคนิค SRAP ยังมีตัวอย่างที่เป็นสายพันธุ์ปุยฝ้าย (KT15, KT49 และ



รูปที่ 4.11 โครงสร้างทางพันธุกรรมของตัวอย่างกระถ่อนจำนวน 36 ตัวอย่างจาก (A) เทคนิค SRAP (B) เทคนิค AFLP และ (C) เทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP โดยมีโครงสร้างทางพันธุกรรม 2 แบบ คือ C1 (สายพันธุ์ที่มีผลขนาดเล็ก) และ C2 (สายพันธุ์ที่มีผลขนาดใหญ่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KT54) ซึ่งเป็นกระถ่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ แต่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมแบบ C1 อยู่ อาจเป็นไปได้ว่ามีความคลาดเคลื่อนในเรื่องการระบุสายพันธุ์ของเกษตรกรตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกตัวอย่างดังกล่าว อีกทั้งยังพบตัวอย่าง KT13 และ KT36 ซึ่งเป็นกระถ่อนสายพันธุ์ทองใบใหญ่ และนิ่มนวลปนอยู่ในโครงสร้างทางพันธุกรรมแบบ C2 อีกด้วย ยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิค SRAP ที่ไม่สามารถแยกตัวอย่างสายพันธุ์ทองใบใหญ่ และนิ่มนวลออกจากกลุ่มที่ให้ผลขนาดใหญ่ได้ ดังรูปที่ 4.10A ส่วนโครงสร้างทางพันธุกรรมของเทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP ดังรูปที่ 4.10B และ C มีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก

จากการทดลองที่ได้นี้ หากพิจารณารูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมโดยพิจารณาจากตัวอย่างพบว่าสามารถแบ่งรูปแบบของพันธุกรรมออกเป็น 2 แบบ คือรูปแบบ C1 เป็นรูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมแบบกระถ่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดเล็ก ซึ่งสังเกตได้จากตัวอย่างที่มีรูปแบบ C1 นี้เป็นกระถ่อนที่มีขนาดผลขนาดเล็ก ให้ผลเร็ว และรูปแบบ C2 เป็นรูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมแบบกระถ่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ เนื่องจากตัวอย่างที่มีรูปแบบ C2 เป็นกระถ่อนที่มีขนาดผลใหญ่ ให้ผลช้ากว่ากระถ่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yang *et al.* (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวง (*Nelumbo sp.*) โดยใช้เทคนิค SSR และ SRAP โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของบัวหลวง พบว่าบัวหลวงมีโครงสร้างทางพันธุกรรม 3 รูปแบบได้แก่ รูปแบบ C1 เป็นรูปแบบที่เป็นบัวให้ราก รูปแบบ C2 เป็นรูปแบบที่เป็นบัวให้เมล็ด โดยทั้ง 2 รูปแบบนี้เป็น *N. nucifera* ทั้งหมด และรูปแบบ C3 เป็นรูปแบบที่เป็น *N. lutea* ทั้งหมด อีกทั้งเมื่อพิจารณารูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ได้จากเทคนิค SSR เทคนิค SRAP และ เทคนิค SSR ร่วมกับ SRAP พบว่าให้รูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมของบัวหลวงที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า เทคนิคทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์โครงสร้าง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวได้เป็นอย่างดี

4.7 ผลการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระถ่อนระหว่างเทคนิค

SRAP และ AFLP

จากข้อมูล dendrogram ที่ได้จากเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP (รูปที่ 4.4 4.7 และ 4.9) แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของการจัดกลุ่มตัวอย่างกระถ่อน โดยพบว่า dendrogram ทั้ง 3 แบบ มีประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มตัวอย่างกระถ่อนออกเป็นกลุ่มของกระถ่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ และสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา dendrogram ที่ได้จากเทคนิค SRAP จะพบว่ามี การแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกับ dendrogram อื่นๆ นั่นคือมีตัวอย่างสายพันธุ์นิ่มนวล และทองใบใหญ่จับกลุ่มอยู่ร่วมกับสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เทคนิค SRAP ไม่สามารถแยกตัวอย่าง 2 สายพันธุ์นี้ออกจากกระถ่อนกลุ่มสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ (สายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และคานทาม) ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ dendrogram ที่ได้จากเทคนิค AFLP และ เทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP มีความสามารถในการจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่

และสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็กออกจากกันได้อย่างชัดเจน อีกทั้งยังสามารถแยกกระต่อนป่าออกจากกลุ่มตัวอย่างกระต่อนทั้งหมดได้อีกด้วย เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP พบว่าช่วงของค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของทั้ง 3 เทคนิคมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP มีค่าใกล้เคียงกันมากกว่า

จากแผนภูมิการกระจายที่ได้จากเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP (รูปที่ 4.5, 4.8 และ 4.10) พบว่าการแบ่งกลุ่มตัวอย่างของเทคนิค SRAP มีความแตกต่างกับเทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP อย่างเห็นได้ชัด นั่นคือเทคนิค SRAP สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มตัวอย่างที่เป็นกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดเล็ก และกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ แต่มีการกระจายตัวของตัวอย่างมาก ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP ที่สามารถแบ่งตัวอย่างกระต่อนออกจากกันเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดใหญ่ และกลุ่มตัวอย่างกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลขนาดเล็ก อีกทั้งยังพบการกระจายตัว ไม่รวมกลุ่มของตัวอย่างกระต่อนป่า (KT55) ซึ่งกระต่อนป่าเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็กกว่ากระต่อนทั่วไป จากการสอบถามคุณชาตรี ไสวรรณตระกูล เจ้าของสวนละอองฟ้าพบว่ากระต่อนป่ามีอยู่ภายในสวนนานมาแล้วก่อนที่จะตนเองจะได้ที่แปลงนี้มา ตนเองไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับที่มาที่ไปของกระต่อนต้นนี้ อีกทั้งยังมีลักษณะลำต้นสูง ให้ผลเล็ก และจำนวนมากกว่ากระต่อนทั่วไป จึงได้เรียกกระต่อนต้นนี้ว่ากระต่อนป่า จากผลที่ได้นี้ ยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิค AFLP ที่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการทดสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมของตัวอย่างกระต่อนที่ได้จากเทคนิค SRAP และเทคนิค AFLP (รูปที่ 4.11A และ B) พบว่ามีโครงสร้างทางพันธุกรรม 2 รูปแบบ ($K=2$) ได้แก่ รูปแบบ C1 ที่เป็นรูปแบบของกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก และรูปแบบ C2 ที่เป็นรูปแบบของกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ จากผลที่ได้นี้ยืนยันประสิทธิภาพในการแบ่งตัวอย่างกระต่อนของทั้ง 2 เทคนิค อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางพันธุกรรมของเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างทางพันธุกรรมของเทคนิค AFLP มากกว่า ของเทคนิค SRAP

จากการศึกษาทำให้ทราบว่า เทคนิค SRAP และ AFLP มีความสามารถในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างกระต่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา dendrogram และแผนภูมิการกระจายของเทคนิค AFLP พบว่าสามารถแยกกระต่อนป่าออกจากกลุ่มได้ รวมถึงการแยกตัวอย่างสายพันธุ์ทองใบใหญ่ และนิมมวล ซึ่งเป็นกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก ออกจากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นกระต่อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ได้อย่างชัดเจน จากผลที่กล่าวมานี้ ทำให้ทราบว่า เทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพในการแบ่งกลุ่มกระต่อนที่สูงกว่าเทคนิค SRAP อีกทั้งเมื่อพิจารณาผลที่ได้จากเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP ไม่ว่าจะเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน dendrogram การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม แผนภูมิการกระจาย และโครงสร้างทางพันธุกรรม ล้วนมีความคล้ายคลึงกับผลที่ได้จากเทคนิค AFLP ทั้งสิ้น จากข้อสังเกตนี้เป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเทคนิค AFLP ที่มีมากกว่าเทคนิค SRAP ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ammar *et al.* (2015) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุกรรมของถั่วปากอ้า (*Vicia faba* L.) โดยใช้เทคนิค SRAP และ AFLP อีกทั้งยังเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคทั้ง 2 พบว่าเทคนิคทั้ง 2 นี้ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาจาก dendrogram ของเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP พบว่า dendrogram ที่ได้จากเทคนิค AFLP มีความคล้ายคลึงกับ เทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP มากกว่าเทคนิค SRAP อีกทั้งเมื่อพิจารณาการแบ่งตัวอย่างจากคุณภาพของถั่ว พบว่า dendrogram ที่ได้จากเทคนิค AFLP สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามคุณภาพของถั่วได้ดีกว่าเทคนิค SRAP



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของกระท้อนโดยการสร้าง dendrogram จากโปรแกรม R Studio พบว่า สายพันธุ์กระท้อนสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มชัดเจน คือกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และคานทาน และกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็กได้แก่ สายพันธุ์ทับทิม ทองกำมะหยี่ นิ่มนวล ทองใบใหญ่ เขียวหวาน และชันทอง

จากการทดลองศึกษาความหลากหลายของกระท้อนโดยใช้เทคนิค SRAP และ AFLP พบว่า เทคนิคทั้ง 2 มีประสิทธิภาพสูงในการจัดกลุ่มตัวอย่างกระท้อน โดยสามารถจัดกลุ่มกระท้อนออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่กระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ ประกอบด้วยสายพันธุ์ปุ๋ยฝ้าย อีล่า และคานทาน และกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก ประกอบด้วยสายพันธุ์ทับทิม ทองกำมะหยี่ นิ่มนวล ทองใบใหญ่ เขียวหวาน และชันทอง อีกทั้งยังพบว่าเทคนิค AFLP มีความสามารถในการแยกกระท้อนป่า และตัวอย่างที่ใกล้ชิดกับกระท้อนป่า ออกจากกลุ่มได้ เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเทคนิคทั้ง 2 พบว่าเมื่อแบ่งกลุ่มตัวอย่าง โดยพิจารณาจากแหล่งที่อยู่ของตัวอย่างกระท้อนออกเป็น 4 จังหวัด พบว่าจังหวัดที่อยู่ของต้นกระท้อนไม่มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่สายพันธุ์ที่หลากหลายของกระท้อนในแต่ละจังหวัดนั้นก็มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า F_{ST} พบว่ากระท้อนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค SRAP ร่วมกับเทคนิค AFLP ทำให้ประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มของกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ และสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็กมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังสามารถแยกกระท้อนป่าออกจากตัวอย่างกระท้อนทั้งหมดได้ จากผลการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่าเทคนิคทางโมเลกุลแต่ละชนิดมีข้อเด่นและข้อด้อยแตกต่างกัน และมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อใช้เทคนิคทางโมเลกุลร่วมกันเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชได้ดีกว่าเทคนิคทางโมเลกุลเดี่ยว อย่างไรก็ตามจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า การแบ่งกลุ่มของกระท้อนโดยใช้เทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP มีความคล้ายคลึงกับการแบ่งกลุ่มของกระท้อนโดยใช้เทคนิค AFLP มากกว่า เทคนิค SRAP จึงสามารถสรุปได้ว่า เทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพในการใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนมากกว่าเทคนิค SRAP

จากโครงสร้างทางพันธุกรรมของเทคนิค SRAP เทคนิค AFLP และเทคนิค SRAP ร่วมกับ AFLP พบว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมมีทั้งหมด 2 รูปแบบ โดยเมื่อพิจารณาตัวอย่างแล้วทำให้ทราบว่าทั้ง 2 รูปแบบนั้นคือกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่ และกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก จากผลการทดลองที่ได้ยืนยันการแบ่งกระท้อนเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยใช้คุณภาพผลกระท้อน และยืนยันการแบ่งสายพันธุ์กระท้อนโดยใช้ dendrogram และแผนภูมิการกระจายจากเทคนิค SRAP และ AFLP ได้เป็นอย่างดี

จากงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่าเทคนิคทางโมเลกุลชนิด SRAP และ AFLP มีประสิทธิภาพในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน ทำให้สามารถอธิบายลักษณะการแบ่งกลุ่มของสายพันธุ์กระท้อนได้อย่างถูกต้อง การใช้เทคนิคทางโมเลกุลร่วมกัน ทำให้ประสิทธิภาพในศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนเพิ่มขึ้น จากการศึกษาวิจัยนี้เป็นรากฐานสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อน การระบุสายพันธุ์ และแผนการปรับปรุงพันธุ์กระท้อน ซึ่งอาจเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของกระท้อนต่อไปในอนาคต

5.1 ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าการแบ่งกลุ่มของกระท้อนจะสามารถแบ่งได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามยังพบการปนของตัวอย่างกระท้อนสายพันธุ์ที่ให้ผลใหญ่บางตัวอย่างในกลุ่มของสายพันธุ์ที่ให้ผลเล็ก ซึ่งอาจเกิดจากความเข้าใจผิดในเรื่องของสายพันธุ์ของเกษตรกรเมื่อเริ่มต้นเพาะปลูก อย่างไรก็ตามควรมีการเพิ่มตัวอย่างในการทดลองให้มากขึ้น อาจช่วยในการจัดกลุ่มของตัวอย่าง และการระบุสายพันธุ์ได้ดียิ่งขึ้น และควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เพื่อค้นหาเทคนิคทางโมเลกุลที่เหมาะสม และมีความสามารถระบุสายพันธุ์ของกระท้อนได้ดีต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- เจติยา ด้านธนวานิช. 2558. หลักฐานของเครื่องหมายระดับโมเลกุลสำหรับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปลูพืชล วายุอัคคี. 2531. การปลูกกระท้อน. สำนักพิมพ์รุ่งพิมพ์เอเชีย. กรุงเทพฯ
สำนักงานพาณิชย์จังหวัดนนทบุรี. ม.ป.ป. “คู่มือปฏิบัติงานสำหรับสมาชิกผู้ใช้สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ “กระท้อนห่อบางกร่าง””
- Abedian, M. Talebi, M. Golmohammadi, H.R. Sayed-Tabatabaei, B.E. 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: 112-117.
- Amar, M.H. Biswas, M.K. Zhang, Z. and Guo, W.W. 2011. “Exploitation of SSR SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection.” *Scientia Horticulturae*. 128: 220-227.
- Ammar, M.H. Alghamdi, S.S. Migdadi, H.M. Khan, M.A. El-Harty, E.H. and Al-Faif, S.A. 2015. “Assessment of genetic diversity among faba bean genotypes using agromorphological and molecular markers.” *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22: 340-350.
- Babaei, S. Talebi, M. Bahar, M. and Zeinali, and H. 2014. “Analysis of genetic diversity among saffron (*Crocus sativus*) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers.” *Scientia Horticulturae*. 171: 27-31.
- Diaz-Matallana, M. Schuler-García, I. Ruiz-García, M. and Jaramillo, E.H. 2009. “Analysis of diversity among six populations of Colombian mango (*Mangifera indica* L. cvar. Hilacha) using RAPDs markers.” *Electronic Journal of Biotechnology*. 12: 1-8.
- Doyle, J.J. and Doyle J.L. 1990. “Isolation of plant DNA from fresh tissue.” *Focus*. 12: 13-15.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. “Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.” *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Figueiredoa, E. Canhotoa, J. and Ribeirob, M.M. 2013. "Fingerprinting and genetic diversity of *Olea europaea* L. ssp. *europaea* accessions from the cultivar Galega using RAPD markers." *Scientia Horticulturae*. 156: 24-28.
- Hammer, Ø. Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. 2001. "PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis." *Palaeontologia Electronica*. 4(1): 9.
- Hu, J.H. Pan, L. Liu, H.G. Wang, S.Z. Wu, Z.H. Ke, W.D. and Ding, Y. 2012. "Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers." *Journal of Molecular Biology*. 39: 3637-3647.
- Inza, M.V. Zelener, N. Fornes, L. and Gallo, L.A. 2012. "Effect of latitudinal gradient and impact of logging on genetic diversity of *Cedrela lilloi* along the Argentine Yungas Rainforest." *Ecology and Evolution*. 2: 2722-2736.
- Jemelkova, M. Kitner, M. Kristkova, E. Beharav, A. and Lebeda, A. 2015. "Biodiversity of *Lactuca aculeata* germplasm assessed by SSR and AFLP markers, and resistance variation to *Bremia lactucae*." *Biochemical Systematics and Ecology*. 61: 344-356.
- Jing, Z. Cheng, J. Guo, C. and Wang, X. 2013. "Seed traits, nutrient elements and assessment of genetic diversity for almond (*Amygdalus* spp.) endangered to China as revealed using SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 49: 51-57.
- Li, G. and Quiros, C.F. 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*. 103: 455-461.
- Liao, B. Wang, F. Chen, L. Li, P. Ouyang, K. Pian, R. Liu, M. Que, Q. Zhou, X. Xi, W. and Chen, X. 2016. "Population structure and genetic relationships of *Melia taxa* in china assayed with sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers." *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. 7: 1-15.
- Lim, T.K. 2012. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 3, Fruits*. New York: Springer Science and Business Media.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Liu, M.Q. Ding, M.M. Chen, L.J. Ouyang, K.X. Hui, W.K. Li, J.C. and Chen, X.Y. 2014. "Genetic diversity and relationships among *Canavalia ensiformis* (L.) DC. accessions as revealed by sequence-related amplified polymorphism markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 57: 242-249.
- Miyashita, T. Kunitake, H. Yotsukura, N. and Hoshino, Y. 2015. "Assessment of genetic relationships among cultivated and wild *Rubus* accessions using AFLP markers." *Scientia Horticulturae*. 193: 165-173.
- Powell, W. Machray, G.C. and Provan, J. 1996. "Polymorphism revealed by simple sequence repeats." *Trends in Plant Science*. 1: 215-222.
- Pritchard, J.K. Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. "Inference of population structure using multilocus genotype data." *Genetics*. 155: 945-959.
- Quezada, M. Pastina, M.M. Ravest, G. Silva, P. Vignale, B. Cabrera, D. Hinrichsen, P. Garcia, A.A.F. and Pritsch, C. 2014. "A first genetic map of *Acca sellowiana* based on ISSR, AFLP and SSR markers." *Scientia Horticulturae*. 169: 138-146.
- Rind, N.A. Aksoy, O. Dahot, M.U. Dikilitas, S. Rafiq, M. and Tütünoğlu, B. 2016. "Evaluation of genetic diversity among *Melia azedarach* L. (meliaceae) with RAPD markers." *Fresenius Environmental Bulletin*. 7: 2374-2382.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. New York: Exeter Publications.
- Subpayakom, N. Poeaim, S. Poeaim, A. and Vanijajiva, O. 2016. "An efficient protocol for genomic DNA extraction from Santol (*Sandoricum koetjape*) for SRAP marker analysis." *International Journal of Agricultural Technology*. 12: 1475-1482.
- Torre, A. Lo'pez, C. Yglesias, E. and Cornelius, J. 2008. "Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon." *Forest Ecology and Management*. 255: 334-339.
- Vos, P. Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, Van de Lee, T. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J. Peleman, J. Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Wang, X. Xing, S. Sun, L. Liu, X. and Kong, Q. 2015. "Genetic diversity of *Styrax obassia* Sieb. et Zucc. based on AFLP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 61: 28-34.
- Williams, J.G.K. Kubelik, A.R. Livak, K.J. Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Xie, Q. Liu, Z.H. Wang, S.H. and Li, Z.Q. 2015. "Genetic diversity and phylogenetic relationships among five endemic *Pinus taxa* (Pinaceae) of China as revealed by SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 62: 115-120.
- Yang, M. Han, Y. Xu, L. Zhao J. and Liu, Y. 2012. "Comparative analysis of genetic diversity of lotus (*Nelumbo*) using SSR and SRAP markers." *Scientia Horticulturae*. 142: 185-195.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

วิธีเตรียมสารเคมี

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

สารเคมีที่ใช้

1. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	2	กรัม
2. 0.5 M NaCl	0.4	กรัม
3. 0.5 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	4	มิลลิลิตร
4. 1 M Tris-HCl (Tris-Hydrochloride)	10	มิลลิลิตร
5. Polyvinyl pyrolidone (PVP)	1	กรัม
6. Deionized water	1	กรัม

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง CTAB 2 กรัม 0.5 M NaCl 0.4 กรัม และ PVP 1 กรัม ผสมกัน
2. ปิเปตสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. ผสมสารทั้งหมดข้างต้นให้เข้ากันในบีกเกอร์ จากนั้นปรับให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วย Deionize water

2. การเตรียม 0.5 M EDTA (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	96.03	กรัม
2. น้ำกลั่น		

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง EDTA 93.06 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ละลาย EDTA ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนด้วย magnetic bar จนสารละลายใส
2. ปรับค่าเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 8
3. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียม TE buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. 0.5 M EDTA	2	มิลลิลิตร
2. 1 M Tris-HCl	10	มิลลิลิตร
3. Deionized water		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. ผสมสารละลายเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วย Deionized water

4. การเตรียม 10X TBE buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Tris base	108	กรัม
2. Boric acid	55	กรัม
3. 0.5 M EDTA	40	กรัม
4. น้ำกลั่น		

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ผสมกัน
2. ปิเปตสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
3. ผสมสารเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
4. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้มีค่าเท่ากับ 8
5. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียม 1X TBE buffer (500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

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

ขั้นตอนการเตรียม

ปิเปต 10X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร

6. การเตรียม Ethidium bromide staining (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

1. Ethidium bromide (10 µg/ml)	0.5	มิลลิลิตร
2. 1X TBE buffer	499.5	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตสารละลาย Ethidium bromide เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
2. ผสมกับ 1X TBE buffer ปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร

7. การเตรียม 1% Agarose gel (ปริมาตร 40 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|------------------|-----|-----------|
| 1. Agarose gel | 0.4 | กรัม |
| 2. 1X TBE buffer | 40 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Agarose 0.4 กรัม ผสมกับ 1X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
2. นำไปให้ความร้อนเพื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เทใส่ถาดที่มีหัว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เจลแข็งตัว

8. การเตรียมโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารเคมีที่ใช้

- | | | |
|-------------|------|-----------|
| 1. NaCl | 0.85 | กรัม |
| 2. น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
2. ใส่ในขวดนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. การเตรียมสารที่ใช้ในเทคนิค AFLP

1. *EcoRI* adaptor (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร) และ *MseI* adaptor (25 พิโคโมล/ไมโครลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

การเตรียม adaptor สายคู่ที่จำเพาะต่อจุดตัดของเอนไซม์ *EcoRI* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำได้โดยเตรียม stock *EcoRI* A1 และ *EcoRI* A2 ให้ได้ความเข้มข้น 10 พิโคโมล โดยดูตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร และเติม deionized water ปริมาตร 90 ไมโครลิตร (เตรียมแยกกัน) จากนั้นผสม *EcoRI* A1 และ *EcoRI* A2 เข้าด้วยกัน โดยการดูด *EcoRI* A1 ความเข้มข้น 10 พิโคโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ *EcoRI* A2 ความเข้มข้น 10 พิโคโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จะได้ *EcoRI* adaptor ความเข้มข้น 5 พิโคโมล/ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก (ต่อ)

การเตรียม adaptor สายคู่ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ *MseI* adaptor ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เริ่มจากเตรียม stock *MseI* A1 และ *MseI* A2 ให้ได้ความเข้มข้น 50 พิโคโมล โดยดูตามอย่างละ 50 ไมโครลิตร และเติม deionized water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (เตรียมแยกกัน) จากนั้นผสม *MseI* A1 และ *MseI* A2 เข้าด้วยกัน โดยการดูด *MseI* A1 ความเข้มข้น 50 พิโคโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ *MseI* A2 ความเข้มข้น 50 พิโคโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จะได้ *MseI* adaptor ความเข้มข้น 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร

2. ดีเนเจอร์ริงพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 6% (ใน 7.5 โมลาร์ urea) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

ชั่ง urea 18.03 กรัม ละลาย urea ในน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จน urea ละลายหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้องจึงเติม 40% acrylamide: bisacrylamide ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และ 10X TBE ปริมาตร 4 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน แล้วเติม 10% APS ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทใส่ในช่องกระจกจนเต็ม จากนั้นเสียบหัวที่ด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวทิ้งไว้ข้ามคืน

3. AFLP loading buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่ง bromophenol blue 10 มิลลิกรัม และ xylene cyanol 10 มิลลิกรัม เติม formamide 9.8 มิลลิลิตร และ EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

4. สารละลาย fixation ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตวง absolute ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน (สารละลาย fixation ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

5. สารละลาย impregnation ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง AgNO_3 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติม 37% formaldehyde ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และคนให้สารละลายเข้ากัน (สารละลาย impregnation สามารถใช้ซ้ำได้ 2 ครั้ง โดยก่อนใช้งานในครั้งที่ 2 ต้องเติม 37% formaldehyde ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร)

ภาคผนวก (ต่อ)

6. สารละลาย development ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง NaOH 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในปิ๊กเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติม 37% formaldehyde ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และคนให้สารละลายเข้ากัน (สารละลาย development ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

7. สารละลาย stop ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

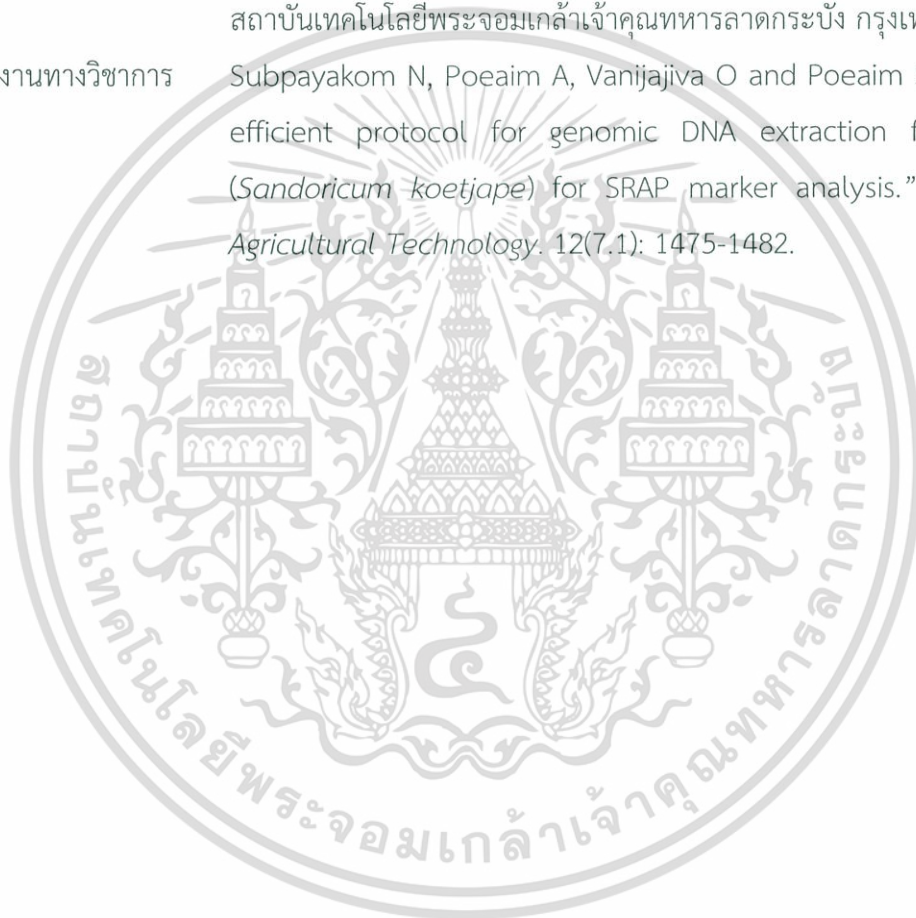
ตวง absolute ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในปิ๊กเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน (สามารถใช้สารละลาย fixation ได้)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายนพวงศ์ ทรัพย์าคม
วัน เดือน ปีเกิด	30 มีนาคม พ.ศ. 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	81/18 หมู่บ้านปรีญลักษณ์ ถนนนวมินทร์ แขวงคลองกุ่ม เขตบึงกุ่ม กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10240
ประวัติการศึกษา	(2557) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 2.90 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร (2560) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
ผลงานทางวิชาการ	Subpayakom N, Poeaim A, Vanijajiva O and Poeaim S. 2016. "An efficient protocol for genomic DNA extraction from Santol (<i>Sandoricum koetjape</i>) for SRAP marker analysis." <i>Journal of Agricultural Technology</i> . 12(7.1): 1475-1482.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

An efficient protocol for genomic DNA extraction from Santol (*Sandoricum koetjape*) for SRAP marker analysis

Navapong Subpayakom¹, Anurag Poeaim¹, Ongkarn Vanijajiva² and Supattra Poeaim^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand.

²Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University, Bangkok, 10220, Thailand.

Subpayakom, N., Poeaim, S., Poeaim, A. and Vanijajiva, O. (2016). An efficient protocol for genomic DNA extraction from Santol (*Sandoricum koetjape*) for SRAP marker analysis. Journal of Agricultural Technology 12(7.1):1473-1480.

Santol (*Sandoricum koetjape*) belonging to the family of Meliaceae which is a common fruit crop and fruit processing in Thailand. The large numbers of santol varieties have been under cultivation and a few of molecular markers have been used to evaluate genetic diversity. PCR-based techniques require high quality and sufficient quantity of DNA. However, Santol contains high amounts of polyphenol and other secondary metabolites. Therefore, the present study was aimed to establish efficient protocol for DNA extraction and evaluate genetic diversity using Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. Three stages of leaves, include young, immature and mature leaves were tested and optimized for high quality DNA. Standard CTAB method was modified by adding step to crush sample with 2x CTAB with an aim to remove phenolic compounds. DNA purification was carried on only for young leaves before experiments. Preliminary study of SRAP marker, two varieties were selected to analyse with thirty sets of primer combinations. The number of SRAP bands were observed with an average of 9.7 bands per primer combinations, sizes ranged from 100 to 2500 base pairs. Nine primer combinations showed reproducible fragments with easily recordable bands and gave polymorphisms. Therefore, those primer combinations were selected for further genetic diversity analysis.

Keywords: DNA extraction, *Sandoricum koetjape*, Santol, SRAP

Introduction

Santol or cottonfruit (*Sandoricum koetjape* (Burm.F.) Merr.) belongs to the family Meliaceae which is a tropical fruit grown in Southeast Asia. In Thai name, this fruit is called Kraton (กระท้อน) that is one of fruit were making much more income for farmers. There are over 10 different named varieties of Kraton

*Corresponding Author: poeaim@hotmail.com

such as Puifai, Tubtim, Khunthong, Khiaowan, Nimnuan, Thongbaiyai, Thongkammayi and Ela. The sweet varieties such as Puifai and Ela have gained popularity for eating fresh fruit. On the other hand, the fruit from native varieties such as Tubtim and Nimnuan tends to be smaller size and sour tasting fruit. The higher value of fruit can be added by processed into delicious product like a dried santol peel candy and chilled santol in syrup (Kathon Loy Kaew). Furthermore, morphological characters alone are not sufficient to distinguish those varieties as well as varieties names. Including, a few of molecular markers have been used to evaluate genetic diversity in this plant. DNA-based molecular techniques are require high quality and sufficient quantity of DNA. However, Kratol contains high amounts of polyphenol and other secondary metabolites that interfere with DNA extraction as well as PCR reaction (Rajakani *et al.*, 2013). Therefore, the present study was aimed to evaluate efficient protocol for DNA extraction and to screen primers for sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker.

Materials and methods

Collections and DNA extraction

The young, immature and mature fresh leaves of 4 samples (KT22: Puifai, KT24: Tubtim, KT27: Khunthong, KT28: Khiaowan) of *S. koetjape* were collected from Nonthaburi, Thailand. The leaves transported to the laboratory in an icebox and stored in -80°C until used. The CTAB method as described by Doyle and Doyle (1990) and its modifications have been used to obtain good quality DNA. First, grind plant tissue into a fine powder in liquid nitrogen. The samples were homogenized in CTAB buffer using a mortar and pestle before incubate the samples at 65°C in water bath. The chloroform: isoamyl alcohol (24:1) step was repeated at least four times. The precipitated DNA was dissolved in 100 µL of TE buffer. Finally, the DNA concentration and quality was observed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

PCR amplification and DNA sequencing

The ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) gene that in the chloroplast genome was amplified using the *rbcLN* and 840R primers (Yamashita and Tamura 2000). The PCR reaction contained a final concentration of 1X PCR buffer, 0.8 µM each primer, 0.2 mM dNTPs, 1U Taq DNA polymerase and 100 ng DNA template and add ddH₂O to a final volume of 25 µL. The PCR reaction was performed in Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf) using one denaturation step at 94°C for 3 min followed by 35

cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min 20 s and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were determined by electrophoresis in 1% agarose gels in 1X TBE buffer. The quality of PCR product was purified with a GF-1 gel DNA recovery kit (Vivantis) prior to sequencing at First Base Laboratories (Malaysia).

SRAP marker

Thirty combinations of five forward primers (ME1-ME5) and six reverse primers (EM1-EM6) (Li and Quiros, 2001) were initially screened in KT22 and KT28. The PCR reaction was carried out in a final volume of 20 μ l with 100 ng template DNA, 0.8 μ M each primer, 0.25 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1U Taq DNA polymerase and 1X PCR buffer. The PCR amplification program was as follows: 3 min of denaturation at 94°C; five cycles of 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 35°C, and 1 min of elongation at 72°C, then 35 cycles of 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 50°C, and 1 min of elongation at 72°C followed by one final extension of 10 min at 72°C. The amplified SRAP fragments were separated on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and made SRAP profile by PowerPoint program.

Results and Discussions

DNA extraction

Generally, the mature leaves were collected for DNA extraction due to their continued availability whole year round. On the other hand, the young leaves are not always available from limit the time of collection. However, mature leaves are not preferred for DNA extraction due mainly to the presence of high concentrations of polysaccharides, polyphenols, and other secondary metabolites (Souza *et al.*, 2012; Moreira and Oliveira, 2011). These compounds bind tightly to nucleic acids during the isolation of DNA and interfere with subsequent reactions. Like, the isolation of genomic DNA from mature leaves in Meliaceae was complicated due to high contamination of polyphenolics, polysaccharides and proteins (Rawat *et al.*, 2016). Therefore, most of the reported DNA extraction protocols use young leaves for DNA extraction.

Initiation for genomic DNA extraction, the fresh young (Fig. 1A), immature (Fig. 1B) and mature (Fig. 1C) leaves of *S. koetjape* were collected and isolated from 2 varieties, KT24 (Tubtim) and KT27 (Khunthong). When leaves crushed using liquid nitrogen, the young leaves powder turned dark brown color (Fig. 1D). While, the immature and mature leaves powder were are

dark green (Fig. 1E-F). After the homogenization step, the color of solution were deep brown and deep green (Fig. 1G-I). Finally, the genomic DNA from immature and mature leaves were white color pellet. The light brown color were observed only in the DNA pellet of young leaves showing very high contamination of polyphenolics (Fig. 1J-L). This is according to previous reported of Kit and Chandran (2010) which found in Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) extraction. The quality and quantity of extracted DNA were checked by agarose gel electrophoresis. The higher amount of genomic DNA can be observed from young leaves follow by immature and mature leaves, respectively as in Fig. 2.

PCR amplification and DNA sequencing

First step, modified CTAB extraction protocol by crush sample with 2x CTAB before incubated in water bath and 4 times repeat of chloroform: isoamyl alcohol (24:1). DNA samples were used as template for PCR with *rbcLN* (5'-ATGTCACCACAAACAGAAACT-3') and 840R (5'-TTGTCGCGGCAATAA TGAGCC-3') primers. The result shown that DNA from immature and mature leaves were showed good amplification. The averages of PCR products size was 900 bp. While, no PCR product was obtained from young leaves DNA (Fig. 3A). Next, we attempted to modify the protocol for young leaves DNA with purified DNA by GF-1 Gel DNA Recovery Kit (Vivantis, Malaysia). PCR amplification was successful after DNA pass purification (Fig. 3B). No inhibition of Taq DNA polymerase activity was observed. So, the polysaccharides and polyphenols are problematic contaminants associated with DNA isolated from young leaves. In contrast, other reports that accumulation of polyphenolics increases with leaf development and it reduces DNA quality in mature leaves than in young leaves (Kit and Chandran, 2010; Moreira and Oliveira, 2011). From this study, indicated that DNA extraction from Santol young leaves that have secondary metabolites reduce the quality of the DNA. By *rbcL* region sequencing, the size of the DNA fragments are 840 bp and the results obtained using BLASTn program to identify the species. Sequence similarity searching, the entire query has coverage only in the *S. koetjape* (DQ238068) (Muellner *et al.*, 2006) with 100% identity.

SRAP marker profile

To develop markers for reliable and rapid detection and to investigate the genetic diversity using Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) marker. In a preliminary study, two varieties, KT22 (Puifai) and KT28 (Khiaowan) which have different fruit size were selected to study. Thirty sets of primer combinations that were combined by 5 forward primers and 6 reverse

primers were screened, out of which only 9 primers combinations showed reproducible fragments with easily recordable bands and gave polymorphisms. These distinguish banding patterns can be successfully, especially in 5 primer combinations (Fig. 4). The number of SRAP bands were observed with an average of 9.7 bands per primer combination, size of the amplification products ranged from 100 to 2500 base pairs. Therefore, nine primer combinations were selected for further genetic diversity analysis of Santol varieties.

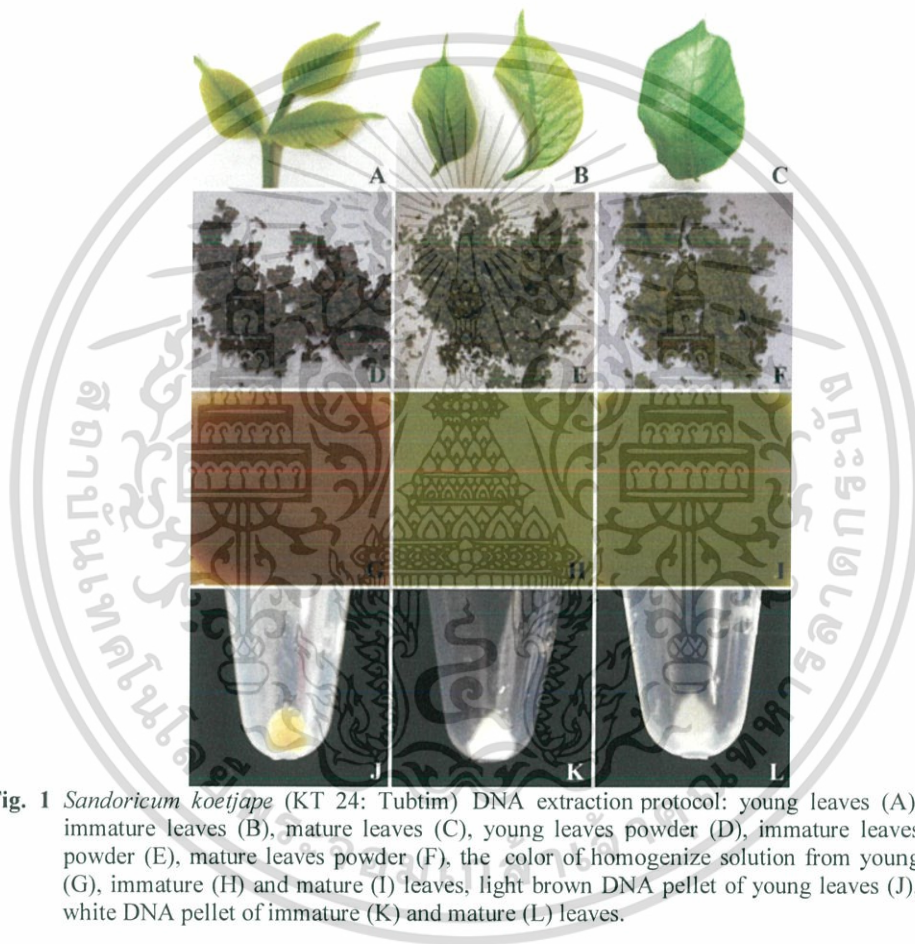


Fig. 1 *Sandoricum koetjape* (KT 24: Tubtim) DNA extraction protocol: young leaves (A), immature leaves (B), mature leaves (C), young leaves powder (D), immature leaves powder (E), mature leaves powder (F), the color of homogenize solution from young (G), immature (H) and mature (I) leaves, light brown DNA pellet of young leaves (J), white DNA pellet of immature (K) and mature (L) leaves.

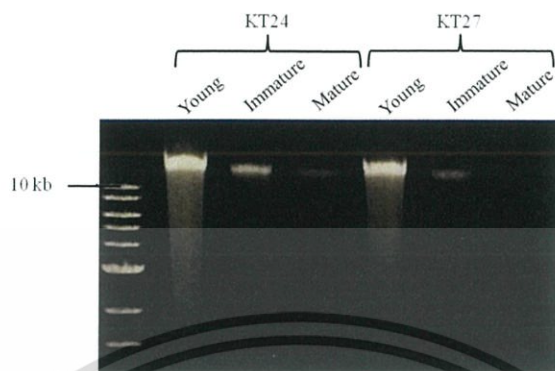


Fig. 2 Genomic DNA isolated from young, immature and mature *S. koetjape* leaves: 1 kb marker (lane 1), KT24 sample (lane 2-4) and KT27 sample (lane 5-7) resolved under 1% agarose gel.



Fig. 3 Electrophoresis analysis of PCR products: from the isolated DNA by the modified CTAB method without purification (A) and with purification (B).

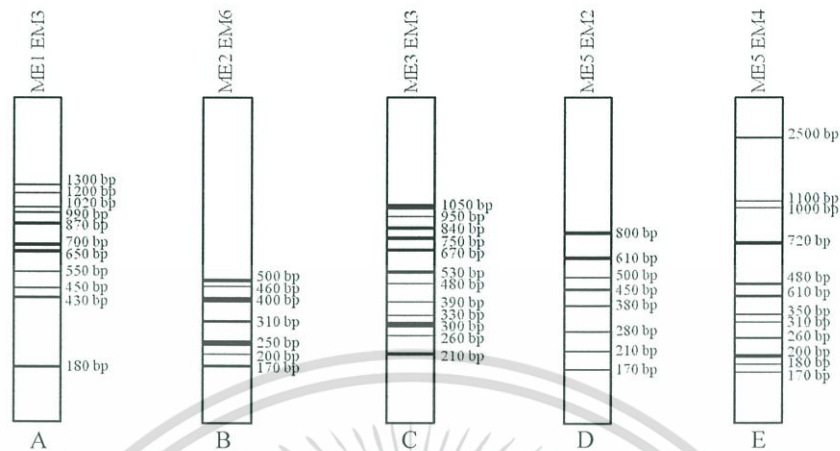


Fig. 4 SRAP profiles ME1EM3 (A), ME2EM6 (B), ME3EM3 (C), ME5EM2 (D) and ME5EM4 (E) of two different Santol varieties: KT22 and KT28.

Conclusion

Generally, young leaves are the first choice to obtain good quality DNA. Because of the mature leaves contain high levels of secondary metabolite such as polyphenols, tannins and polysaccharides which makes it very difficult to isolate DNA of good quality. However, DNA extraction from Santol young leaves have secondary metabolites reduce the quality of the DNA. So, DNA extraction of santol is necessary to consider leaf age of the santol. For SRAP marker, thirty primer combinations were screened. Those quality DNA is quite suitable for investigating the genetic profile. Nine primer combinations showed reproducible fragments with easily recordable bands and gave polymorphisms which were selected for further genetic diversity analysis.

Acknowledgement

This research was supported by Biodiversity-Based Economy Development Office (Public Organization) (BEDO) for fiscal year 2015.

References

- Doyle, J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
 Kit, Y.S. and Chandran, S. (2010). A simple, rapid and efficient method of isolating DNA from Chokanan mango (*Mangifera indica* L.). *African Journal of Biotechnology*. 9(36): 5805-5808.

- Li, G. and Quiros, C. F. (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*. 103: 455–461.
- Moreira, P.A. and Oliveira, D.A. (2011). Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 10: 353-358.
- Muellner, A.N., Savolainen, V., Samuel, R. and Chase, M.W. (2006). The mahogany family 'out-of-Africa': divergence time estimation, global biogeographic patterns inferred from plastid *rbcL* DNA sequences, extant, and fossil distribution of diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40(1): 236-250.
- Rajakani, R., Narnoliya, L., Sangwan, N.S., Sangwan, R.S. and Gupta, V. (2013). Activated charcoal-mediated RNA extraction method for *Azadirachta indica* and plants highly rich in polyphenolics, polysaccharides and other complex secondary compounds. *BioMed Central Research Notes*. 6: 125.
- Rawat, S., Joshi, G., Annapurna, D., Arunkumar, A.N. and N. Karaba, N.N. (2016). Standardization of DNA extraction method from mature dried leaves and ISSR-PCR conditions for *Melia dubia* Cav. A fast growing multipurpose tree species. *American Journal of Plant Sciences*. 7: 437-445.
- Souza, H.A.V., Muller, L.A.C., Brandão, R.L. and Lovato, M.B. (2012). Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research*. 11: 756-764.
- Yamashita, J. and Tamura, N.M. (2000). Molecular phylogeny of the Convallariaceae (Asparagales). *Monocots: Systematic and Evolution*. 387-400.