ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ ISSR ของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทย

ISSR DNA FINGERPRINT OF DUCKWEED *Lemna aequinoctialis* IN THAILAND

ชลิตา ลัดดาพวง

ธนัชชา บุญสร้างสุข

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISSR DNA FINGERPRINT OF DUCKWEED *Lemna aequinoctialis* IN THAILAND

CHALITA LADDAPUANG

THANATCHA BUNSARNGSUK

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY) DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ ISSR ของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทย ISSR DNA fingerprinting of duckweed *Lemna aequinoctialis* in Thailand
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชลิตา ลัดดาพวง รหัสนักศึกษา 62050482 นางสาวธนัชชา บุญสร้างสุข รหัสนักศึกษา 62050495
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ ISSR ของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทย

ชื่อนักศึกษา นางสาวชลิตา ลัดดาพวง รหัสนักศึกษา 62050482

นางสาวธนัชชา บุญสร้างสุข รหัสนักศึกษา 62050495

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

Lemna aequinoctialis หรือมีชื่อภาษาไทยเรียกว่า แหน (Duckweed) เป็นพืชน้ำขนาดเล็กที่ลอยได้อิสระบนผิวน้ำ มีใบขนาดเล็ก กลม ไม่มีใบที่แท้จริง (เรียกว่า fronds) ใต้ใบมีรากฝอยเล็กๆ Lemna มีราก 1 รากต่อ 1 ใบ แหนที่พบในประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae แหนขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่ส่วนใหญ่จะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ *L. aequinoctialis* และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหนตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ที่เก็บมาได้ โดยเก็บรวบรวมแหนตัวอย่างในประเทศไทย จำนวน 5 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR 8 เส้น ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ ISSR 8 เส้น ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 73 แถบ มีจำนวนแถบดีเอ็น-เอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 60 แถบ มีเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 82.06% และมีค่าดัชนีความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.17 ถึง 0.75 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 เมื่อวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR โดยนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) สามารถจัดกลุ่มแหนตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม การทดลองจากโครงงานพิเศษนี้แสดงให้เห็นว่า การจัดกลุ่มด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR ทำให้เห็นว่าดีเอ็นเอของแหนตัวอย่างบางส่วนไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มา

คำสำคัญ : แหน, *Lemna aequinoctialis*, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title ISSR DNA fingerprint of Duckweed *Lemna aequinoctialis* in Thailand

Students Miss Chalita Laddapuang Student ID 62050482

Miss Thanatcha Bunsarngsuk Student ID 62050495

Degree Bachelor of Science (Biotechnology)

Department Biology

School Science

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

Academic Year 2565

Advisor Assoc.Prof.Dr.Chokchai Kittiwongwattana

Abstract

Lemna aequinoctialis, also known in Thai as duckweed, is a small aquatic plant that floats freely on the surface of the water. There are small, round, no real leaves (called fronds), under the leaves there are small capillary roots, *Lemna* has 1 root per 1 leaf. Belonging to the family Lemnaceae, duckweed multiply both sexually and asexually maturely, but most of them are asexual propagation by sprouting. The special project aims to find the right primer to create *L. aequinoctialis* DNA fingerprints and to study the relationship between the five samples collected. Five samples were collected in Thailand and then analyzed for genetic diversity using the 8 ISSR marker technique. The results showed that 8 ISSR primers gave a total of 73 bands, 60 bands showing genetic diversity, 82.06% of DNA bands showing diversity, and a difference index between 0.17 and 0.75, with an average of 0.48. When grouping with ISSR marking technique using DNA fingerprints to create phylogenetic tree using UPGMA, samples can be grouped into 3 groups. Experiments from this special project showed that grouping with the ISSR marker technique showed that the DNA of some samples had no relation to the source.

Keywords : Duckweed, *Lemna aequinoctialis*, Genetic diversity, DNA fingerprints, ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดและเสนอแนวทางของการแก้ปัญหาต่างๆ ในระหว่างการทำโครงงานพิเศษ อีกทั้งยังตรวจทานโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล และประธานกรรมการและกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาเพื่อให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่คอยอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ และให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ ขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้คำแนะนำต่างๆ รวมถึงให้กำลังใจตลอดการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยสนับสนุน ชี้แนะแนวทางที่ดี คอยช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งยังให้ความรักและกำลังใจเสมอมา

ชลิตา ลัดดาพวง
ธนัชชา บุญสร้างสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ลักษณะทั่วไปของแหน (*Lemna aequinoctialis*) 3
2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Marker) 4
2.2.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological Marker) 4
2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) 4
2.3 เครื่องหมาย Inter Simple Sequnce Repeat (ISSR) 4
2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 5
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 9
3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา 9
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง 9
3.3 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 10
3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 10
3.5 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 11
3.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม 12
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 13
4.1 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR 14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 21
5.1 สรุปผลการวิจัย 21
5.2 ข้อเสนอแนะ 21
เอกสารอ้างอิง 22
ภาคผนวก 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สถานที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของแหน *Lemna aequinoctialis* 5 ตัวอย่าง 9
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 8 เส้น 10
3.3 องค์ประกอบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR 11
3.4 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 11
4.1 การวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของแหนตัวอย่าง 13
4.2 ตารางผลการทดลองของไพรเมอร์ 8 เส้น 16
4.3 ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมของแหนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ 8 เส้น 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบและรากของแหน *Lemna aequinoctialis* 3
2.2 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่เข้าจับระหว่างบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค ISSR 5
4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแหนทั้ง 5 ตัวอย่าง 14
4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC817 (1-5), UBC818 (6-10) และ UBC825 (11-15) 14
4.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC827 (1-5), UBC855 (6-10) 15
4.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC856 (1-5), UBC857 (6-10) และ UBC873 (11-15) 15
4.5 แผนภูมิ phylogenetic tree ระหว่างแหนตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี UPGMA 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DNA	Deoxyribonucleic acid
UBC	University of British Columbia
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
ISSR	Inter-simple Sequence Repeat
PCR	Polymerase Chain Reaction
µM	Micromolar
mM	Millimolar
TBE	Tris-Borate EDTA
$MgCl_2$	Magnesium Chloride
No.	Number

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Lemna aequinoctialis หรือมีชื่อภาษาไทยเรียกว่า แหน (Duckweed) เป็นพืชน้ำขนาดเล็กที่ลอยได้อิสระบนผิวน้ำ มีใบขนาดเล็ก กลม ไม่มีใบที่แท้จริง (เรียกว่า fronds) เป็นใบเดี่ยวหรือสองใบถึงหลายใบติดกัน ใบยาว 0.05-1.5 ซม. และกว้าง 0.03-1 ซม. ใต้ใบมีรากฝอยเล็กๆ *Lemna* มีราก 1 รากต่อ 1 ใบ (Landolt, 1992) แหนที่พบในประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae แหนขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่ส่วนใหญ่จะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ทำให้เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (Gilbert et al, 2018) แหนพบได้ตามแหล่งน้ำทั่วไปและมีจำนวนมากกระจายกันไปทั่วพื้นที่ ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าแหนที่พบในพื้นที่ต่างๆอาจมีพันธุกรรมที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

โดยทั่วไปมักจะใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่ออธิบายลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภท Dominant markers จะประกอบไปด้วย Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) และ Random Amplified Length Polymorphisms (RAPD) ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภท co-dominant จะประกอบไปด้วย Simple Sequence Repeats (SSR), Restriction Fragment Length Poly-Poly (RFLP) และ Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) เครื่องหมาย ISSR นั้นแสดงความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี สามารถทำซ้ำได้ มีความเรียบง่ายและไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับจีโนมก่อนหน้า ก็รู้ว่ามีการแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ดี ซึ่งการทำ ISSR นั้นใช้ปริมาณดีเอ็นเอไม่มาก เมื่อนำมาเทียบกับเครื่องหมายอื่นๆ เช่น RFLP, SSR, RAPD จะพบว่า ISSR แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ดีที่สุด (Chen et al, 2020) เทคนิค ISSR จะคล้ายกับเทคนิค RAPD ในแง่ของหลักการทำงานคือ ไพรเมอร์ จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการสุ่มตำแหน่งต่างๆ บนจีโนม แต่เทคนิค ISSR จะมีความจำเพาะ สูงกว่า คือลำดับเบสของไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อบริเวณที่เข้าจับ ซึ่งจะเข้าจับกับบริเวณที่ติดกับยีนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR จึงมีส่วนที่เป็นลำดับเบสของยีนที่มีความจำเพาะอยู่ระหว่างไมโครแซทเทลไลต์ทั้งสอง (สุรเชษฐ และสุมาลี, 2563) และเนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอของแหนในประเทศไทย ทางคณะผู้จัดทำจึงเลือกใช้วิธีการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Inter simple sequence repeat (ISSR) เพื่อนำมาทดสอบกับแหนตัวอย่างที่เก็บในพื้นที่ต่างๆ เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) 2 ตำแหน่ง ไมโครแซทเทลไลต์ คือชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อกันในจีโนม แต่ละชุดไมโครแซทเทลไลต์ประกอบด้วย 1-6 นิวคลีโอไทด์ พบกระจายในบริเวณต่างๆ ของจีโนมของพืชชนิดต่างๆ (วริสรา และคณะ, 2557) ดังนั้นแล้วข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ISSR จึงทำให้สามารถตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ในหลายๆ บริเวณของจีโนม และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของจีโนม ดังนั้นเทคนิคนี้จึงมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมในการนำมาทดสอบกับแหน *L. aequinoctialis* ในประเทศไทยที่ยังไม่เคยมีการศึกษาข้อมูลลำดับเบสของจีโนมมาก่อน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* ด้วยเครื่องหมาย ISSR

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่าง *L. aequinoctialis*

1.2.3 เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแหนตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่างที่เก็บมาได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* อย่างน้อย 5 ตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครฯ และปริมณฑล ด้วยเครื่องหมาย ISSR

1.3.2 สร้างแผนผัง phylogenetic tree จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่าง *L. aequinoctialis* ที่นำมาศึกษาเพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบไพรเมอร์ ISSR ที่เหมาะสมนำมาใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis*

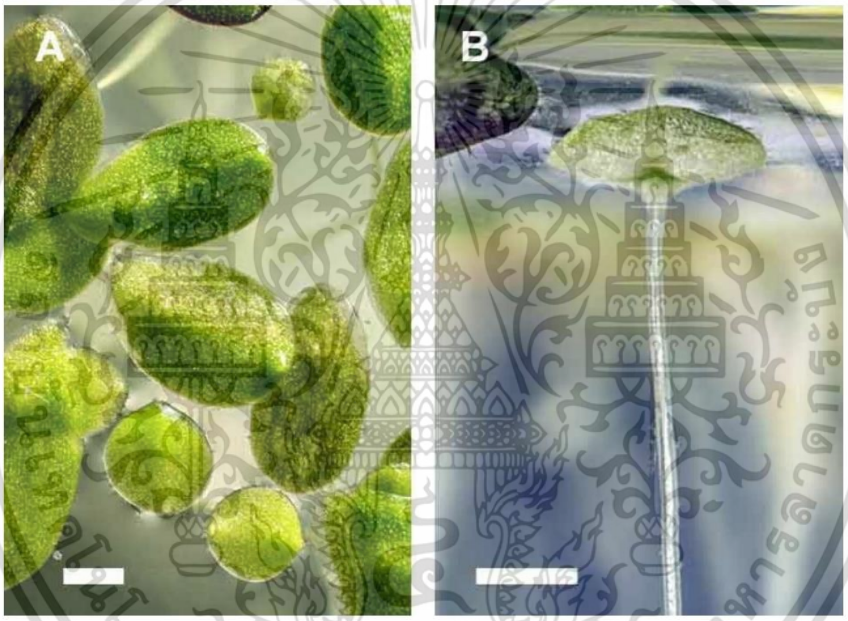
1.4.2 ทราบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหนตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของแหน (*Lemna aequinoctialis*)

แหนมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Lemna aequinoctialis* และจัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae เป็นพืชลอยน้ำอยู่ที่ผิวน้ำขนาดเล็ก กระจายไปทั่วมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยการขยายพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ (Acosta et al, 2021) มีใบเรียกว่า fronds เป็นใบเดี่ยวหรือสองใบติดกัน ความยาวใบ 0.05-1.5 เซนติเมตร และกว้าง 0.03-1 เซนติเมตร รากจะมี 1 รากต่อ frond (Landolt, 1992)



รูปที่ 2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบและรากของแหน *Lemna aequinoctialis*
A : แหน *Lemna aequinoctialis* B : ใบ (Frond) เดี่ยว
มาตราส่วนรูปภาพ 1 มิลลิเมตร
ที่มา : Lange et al. (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Marker)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นวิธีหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้อย่างแม่นยำ ทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สามารถนำมาวิเคราะห์และสร้างเป็นแผนภาพต้นไม้ (dendrogram) เพื่อจัดกลุ่มตัวอย่างทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน (อภิชา และสิริพร, 2558)

2.2.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological Marker)

การใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา เป็นสิ่งที่สามารถมองเห็นได้ทันที คือลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะสีตาหรือสีผมในมนุษย์ ลักษณะสีกลีบดอกของกุหลาบหรือดอกกล้วยไม้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดนี้จัดว่าเป็นเครื่องหมายที่มีความต้องการมากในวงการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะถ้าเป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิตสูง หรือต้านทานต่อโรคแมลง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ และข้อได้เปรียบของเครื่องหมายชนิดนี้คือ ไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาอยู่แล้ว (อุบลวรรณ และอรพินธุ์, 2561)

2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

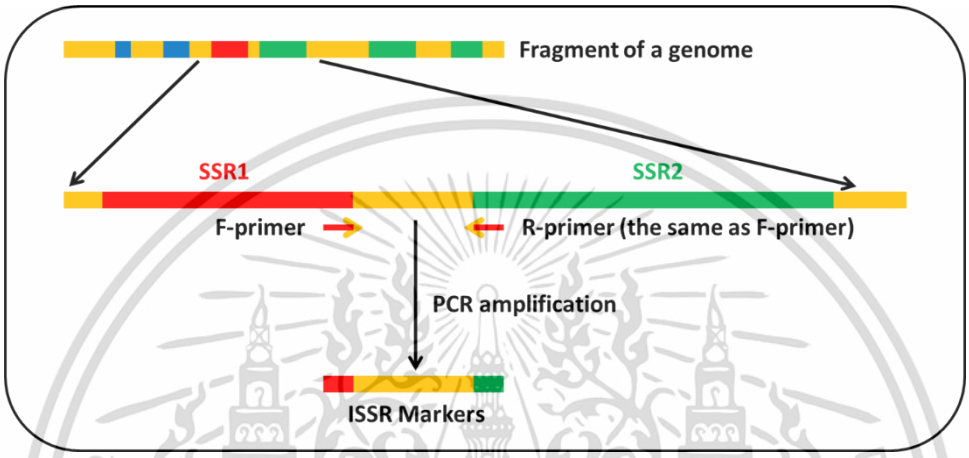
เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี่เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคที่เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ ที่สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุรีพร, 2546)

2.3 เครื่องหมาย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

เทคนิค ISSR (inter-simple sequence repeat) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ (micro-satellite) 2 ตำแหน่ง ไมโครแซทเทลไลต์ คือ ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันในจีโนม แต่ละชุดของไมโครแซทเทลไลต์ ประกอบด้วย 1-6 นิวคลีโอไทด์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (วริสรา และคณะ, 2557) ไมโครแซทเทลไลต์พบกระจายแบบไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งจีโนม จะพบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและส่วนใหญ่พบในบริเวณ ที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) ซึ่งเครื่องหมาย ISSR ต้องอาศัยหลักการของปฏิกิริยา PCR ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย ISSR มีลักษณะเป็นเบสซ้ำเป็นชุด ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่งที่มีลักษณะเป็นเบสซ้ำๆ เป็นเบสคู่สมกันบนจีโนมของ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งมีชีวิตบริเวณที่เรียกว่า Simple Sequence Repeat (SSR) หรือไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์จะกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต ทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับตำแหน่งต่างๆ บนจีโนมได้หลายบริเวณที่แตกต่างกัน (สุรเชษฐ และสุมาลี, 2563) ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์หรือสิ่งมีชีวิตเป็นตัวบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ (สุรีพร, 2546) ซึ่งความยาวของลำดับเบส (สุวิชญา, 2565) และจำนวนซ้ำของลำดับเบสในไพรเมอร์ทำให้แสดงความแตกต่างของดีเอ็นเอ (Kaya, 2015)



รูปที่ 2.2 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่เข้าจับระหว่างบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค ISSR

ที่มา : Sudarsono (2013)

ข้อดีของเทคนิค ISSR คือ มีความจำเพาะของตำแหน่งไพรเมอร์ที่เข้าจับกับสายดีเอ็นเอมากกว่าเทคนิคอื่น เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphism) สูง ใช้เวลาในการตรวจสอบน้อย วิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน ข้อมูลเชื่อถือได้ ใช้งบประมาณไม่สูงมาก (สุรเชษฐ และสุมาลี, 2563) ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษา ส่วนข้อด้อย คือ เป็นเครื่องหมายที่แสดงการข่มแบบสมบูรณ์ (complete dominant) (วริสรา และคณะ, 2557)

2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

หลังจากการทำ PCR เสร็จแล้วจะได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากนั้นให้คะแนนแถบดีเอ็นเอ (ขึ้นแถบ = 1, ไม่ขึ้นแถบ = 0) แล้วนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการจัดกลุ่มความสัมพันธ์จากการใช้เครื่องหมาย ISSR ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) โดยการทำ dendrogram หรือ phylogenetic tree เช่น งานวิจัยของ สุรเชษฐ์ และสุมาลี (2563) การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ในการศึกษาความ หลากหลายทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่าการใช้เครื่องหมาย ISSR เมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์พื้นเมือง 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ และกลุ่มพันธุ์การค้า 1 สายพันธุ์ และพบว่าสามารถจำแนกยาสูบพันธุ์การค้าออกจากยาสูบพันธุ์พื้นเมืองได้ ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวทำให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายหรือเทคนิค ISSR โดยการนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชนิดนั้นมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพ dendrogram ด้วยวิธี UPGMA แผนภูมิที่ได้มีลักษณะแยกเป็นเส้นสายซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของพืช

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของแหน เช่น งานวิจัยของ Xue et al. (2012) ที่ใช้เครื่องหมาย ISSR ในการวิเคราะห์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหนสกุล *Lemna* และ *Spirodela* ที่มีแหล่งทางภูมิศาสตร์ ที่แตกต่างกันโดยเก็บรวบรวมจากประเทศจีนและเวียดนาม จำนวน 27 กลุ่มประชากร ซึ่งประกอบ ด้วย กลุ่มประชากรของแหนสกุล *Lemna* 16 กลุ่ม และกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Spirodela* 11 กลุ่ม ซึ่งผลการทดลองพบว่าจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแหนทั้ง 2 สกุล ด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 เส้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเกิดแถบ ดีเอ็นเอของแหนสกุล *Lemna* ทั้งหมด 92 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงถึงความหลากหลายทาง พันธุกรรม (polymorphism) จำนวน 89 แถบ เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 96.74% และเกิดแถบของดีเอ็นเอของแหนสกุล *Spirodela* ทั้งหมด 99 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphic band) 98 แถบ เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.43% เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยการสร้างแผนภาพ dendrogram พบว่าตัวอย่างกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Lemna* แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม และ ตัวอย่างกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Spirodela* แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งแสดง ให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR สามารถแบ่งตัวอย่างกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Lemna* และตัวอย่าง กลุ่มประชากรของแหนสกุล *Spirodela* สอดคล้องกับแหล่งที่อยู่อาศัยหรือแหล่งทางภูมิศาสตร์ของพืช

และอีกหนึ่งตัวอย่างงานวิจัยของ EL-Kholy et al. (2015) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุ-กรรมของตัวอย่างแหน *Lemna gibba* 7 ตัวอย่าง และ *Lemna minor* 2 ตัวอย่าง ในพื้นที่สามเหลี่ยมปากแม่น้ำไนล์ จากเขต El-Gharbiya และ Kafr El-Sheikh โดยใช้เครื่องหมาย โมเลกุล ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) และใช้ไพรเมอร์ในการทดสอบทั้งหมด 5 เส้น เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วได้ผลการทดลองคือ ไพรเมอร์ทุกเส้นสามารถแสดงความแตกต่าง ได้ดี (polymorphic 100%) จำนวนแถบที่ขึ้นของไพรเมอร์อยู่ในช่วง 4-13 แถบ มีจำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด 47 แถบ เป็น polymorphic 47 แถบ แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธี UPGMA ได้ค่าดัชนีความแตกต่างกัน 1.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถแบ่งออก ได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม *L. minor* และกลุ่ม *L. gibba* จึงสรุปได้ว่าการกระจายทางภูมิ-ศาสตร์ของกลุ่มตัวอย่าง มีอิทธิพลอย่างชัดเจนต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม

เครื่องหมาย ISSR ยังถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น งานวิจัยของ ธีระชัย และคณะ (2563) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* ด้วยเทคนิค ISSR โดยจะศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง จากเมล็ดที่เก็บมาจากจังหวัดสกลนคร และอุดรธานี แล้วนำเมล็ดดังกล่าวมาเพาะปลูกที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต จากผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 10 เส้น เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 225 แถบ มีขนาด 515-3,000 คู่เบส โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างทั้งหมด และมีเปอร์เซ็นต์ ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100% เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยการสร้างแผนภาพ dendrogram พบว่าตัวอย่างของพืชคราม สกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค ISSR ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* มีประสิทธิภาพมากเนื่องจากผลที่ได้คือพืชคราม สกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่เก็บเมล็ดจากจังหวัดสกลนคร และอุดรธานีมาเพาะปลูก พบว่ามีความความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์ ในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ ของ สุรเชษฐ และสุมาลี (2563) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR หรือ Inter Simple Sequence Repeats จำนวนไพรเมอร์ 5 เส้น นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS พบแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด 26 แถบ ให้แถบที่แตกต่างกัน 16 แถบ (59.34%) แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น มีขนาด 400-1300 คู่เบส มีค่าดัชนี ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.45 ถึง 0.97 เมื่อวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ โปรแกรม NTSYS-pc 2.1 ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity coefficient) เมื่อวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแล้ว สามารถจำแนก ยาสูบได้ 2 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า ซึ่งมีความสอดคล้องกับ แหล่งที่มาของยาสูบ

การใช้เครื่องหมาย ISSR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอใน งานวิจัยของ สุทวัฒน์ และคณะ (2557) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ จำนวน 32 สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเป็นสายพันธุ์จากเขตอเมริกาเหนือ เขตแปซิฟิก ด้วยเครื่องหมาย ISSR จากการทดสอบไพรเมอร์ 60 เส้น พบว่าไพรเมอร์ 57 เส้น สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ดี โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 240 แถบ (39%) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 160-3,000 คู่เบส ค่าดัชนีความเหมือน อยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.98 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี UPGMA และนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถจัดมะละกอออกเป็น 3 กลุ่ม สายพันธุ์มะละกอที่มีถิ่นกำเนิดแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ ถูกแยกออกมาจากกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอ

และการศึกษาการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของมัลเบอร์รี่ ระหว่าง *Morus alba* 14 ตัวอย่าง และ *Morus lhou* (ser) *koidz* 2 ตัวอย่าง โดยเก็บมาจากประเทศเกาหลีใต้ มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของมัลเบอร์รี่โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR ของ Kalpana et al. (2012) ในเทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ 40 เส้น เมื่อนำไปทำ PCR ได้ผลการทดลองคือ ค่าแสดงความแตกต่าง (polymorphism) มีค่าเท่ากับ 66.67% และเทคนิค ISSR ใช้ไพรเมอร์ 10 เส้น ได้ค่าแสดงความแตกต่างเท่ากับ 55.05% และนำผลที่ได้ไปหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของเทคนิค RAPD อยู่ในช่วง 0.123-0.378 และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของเทคนิค ISSR คือ 0.095-0.285 สรุปได้ว่าการใช้เทคนิค RAPD สามารถแสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี แต่ไม่สามารถนำผลดังกล่าวมาเทียบกับเทคนิค ISSR ได้เนื่องจากใช้จำนวนไพรเมอร์ไม่เท่ากัน จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

เก็บรวบรวมแหนตัวอย่าง *Lemna aequinoctialis* ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ในเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครและปริมณฑล ได้แก่ เขตบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร เขตรังสิต จังหวัดปทุมธานี เขตบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ และเขตบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สถานที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของแหน *Lemna aequinoctialis* 5 ตัวอย่าง

แหนตัวอย่าง	สถานที่ตั้ง	ละติจูด	ลองจิจูด
1	บางเสาธง	13°41’02.8”	100°47’43.2”
2	ลาดกระบัง	13°43’46.1”	100°46’32.9”
3	รังสิต	14°04’27.3”	100°37’43.7”
4	บางบ่อ	13°41’10.1”	100°52’47.3”
5	บางพลี	13°40’17.5”	100°47’20.8”

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง

นำต้นพืชมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Plant Genomic DNA Mini Kit (GP100) โดยนำต้นพืชมาล้างให้สะอาดแล้วซับน้ำออกแล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ ปริมาณ 60 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube แล้วเทไนโตรเจนเหลวไปให้ท่วม บดพืชให้ละเอียด จากนั้นเติม GP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติม RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างที่บ่ม ให้กลับหลอดทดลองไปมา 2 ครั้ง ทุกๆ 2 นาที จากนั้นเติม GP2 buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นวาง filter column ใน collection tube ใส่สารผสมลงไปใน filter column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 xg เป็นเวลา 1 นาที ย้าย supernatant จาก collection tube ไปยัง Microcentrifuge tube หลอดใหม่ ทิ้ง filter column และ collection tube จากนั้นเติม GP3 buffer 1.5 เท่าของปริมาตร supernatant โดยพืชตัวอย่างแต่ละหลอดจะใส่ไม่เท่ากัน ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง จากนั้นวาง GD column ใน Collection tube ใหม่ ใส่สารผสมลงไปใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้ววาง GD column ลง collection tube เดิม เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้ววาง GD column ลง collection tube เดิม เติม Wash Buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้ววาง GD column ลง collection tube เดิม และเติม Wash Buffer ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อปั่นให้สารละลายออกจาก GD column ให้หมด จากนั้นนำ GD column ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 45 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่นกรองของ GD column วางทิ้งไว้ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

3.3 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพที่ดีจะต้องขึ้นแถบที่ชัดเจน และชิ้นดีเอ็นเอไม่มีการแตกหัก วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากต้นพืช ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ วัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.80-2.00 และค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของคาร์โบไฮเดรต หรือสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 2.00 ถึง 2.20 ซึ่งดีเอ็นเอที่ดีจะต้องไม่มีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน มาตรฐานความเข้มข้นของดีเอ็นเอควรมีค่าความเข้มข้นตั้งแต่ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ขึ้นไป จากนั้นเตรียมสารละลายดีเอ็นเอโดยเจือจางด้วย Sterilized Milli-Q Water ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ใช้ไพรเมอร์ UBC817 UBC818 UBC825 UBC827 UBC855 UBC856 UBC857 และUBC873 ดังตารางที่ 3.2 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแหนตัวอย่างโดยการทำปฏิกิริยา PCR โดยผสมส่วนผสม ดังตารางที่ 3.3 ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร และนำไป spin down ในเครื่อง Microcentrifuge เพื่อให้สารผสมตกมาอยู่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal Cycler ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน แสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 8 เส้น

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’→3’)	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5’→3’)
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A

หมายเหตุ : Y คือเบสไพริมิดีน (เบส T และ C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบสำหรับทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
1. Water	5.35
2. 10X buffer	1.00
3. Primer 5 µM	1.00
4. dNTP 2 mM	1.00
5. $MgCl_2$ 25 mM	0.60
6. DNA Taq Polymerase	0.05
7. DNA Template	1.00
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

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

3.5 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ชั่งผงอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.3 กรัม นำมาละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ด้วยไมโครเวฟ เมื่อผงอะกาโรสละลายหมดแล้วโดยสังเกตว่าสารละลายจะมีสีใสและเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้อุ่น หรือทำให้เย็นเร็วขึ้นโดยหล่อน้ำเย็น แล้วจึงใส่สี Neo green ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นเทเจลลงในถาดเจลแล้วเสียบหวีเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ วางถาดเจลไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อแผ่นเจลแข็งตัวแล้วให้ดึงหวีออก แล้วนำถาดเจลใส่ลงใน Electrophoresis Chamber ที่มี 1X TBE buffer นำดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (loading dye) ปริมาตร 2

ไมโครลิตร นำไป spin down เพื่อผสมให้เข้ากัน แล้วหยอดลงไปในหลุมเจล และนำ DNA Ladder ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสีย้อม (loading dye) 2 ไมโครลิตร และ1X TBE buffer ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หยอดลงไปในหลุมแรกของเจล จากนั้นต่อ Electrophoresis Chamber เข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าจากตัวจ่ายกระแสไฟฟ้าเป็น 140 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลเข้าเครื่อง Gel documentation system เพื่อดูแถบดีเอ็นเอ

3.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

นับแถบดีเอ็นเอแล้วให้คะแนนในระบบ 1 และ 0 คือ เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และเมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ในโปรแกรม DARwin version 6 (ดาวน์โหลดจากเว็บไซต์ : https://darwin.cirad.fr/) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

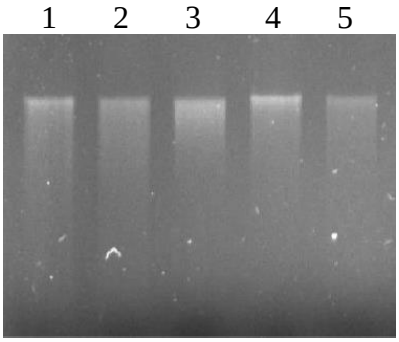
4.1 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากแหนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ได้แก่ เขตบางเสาธง (1), เขตลาดกระบัง (2), เขตรังสิต (3), เขตบางบ่อ (4) และ เขตบางพลี (5) ด้วยชุด Plant Genomic DNA Mini Kit (GP100) แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบหาค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000c โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 280 และ 230 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.1 พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 28.0 ถึง 76.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของ โปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 1.92 ถึง 2.00 โดยดีเอ็นเอของแหนตัวอย่างทั้งหมดมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 1.80 ถึง 2.00 ซึ่งเป็นช่วงค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม บ่งบอกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนของโปรตีนต่ำและดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปใช้ และค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของคาร์โบไฮเดรตหรือสิ่งเจือปนอื่นๆที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 1.83 ถึง 2.36 โดยดีเอ็นเอของแหนตัวอย่างที่ 1 2 4 และ 5 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.84 2.36 2.27 1.83 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของแหนตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างมีการปนเปื้อนของ คาร์โบไฮเดรตหรือสิ่งเจือปนอื่นๆ เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมนั้นควรอยู่ในช่วง 2.00 ถึง 2.20 บ่งบอกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรต หรือสิ่งเจือปนอื่นๆ ต่ำ และดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปใช้ ดังดีเอ็นเอของแหนตัวอย่างที่ 3 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.03 ดังตารางที่ 4.1 จากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพ ด้วยการทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพไม่ดีนัก โดยพบรอยสเมียร์ด้านล่างของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่แสดงว่าดีเอ็นเอมีการฉีกขาด ดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของแหนตัวอย่าง

แหนตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280})	อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตร (A_{260}/A_{230})
1	34.8	1.92	1.84
2	76.2	1.94	2.36
3	40.4	1.93	2.03
4	28	2.00	2.27
5	29	1.95	1.83

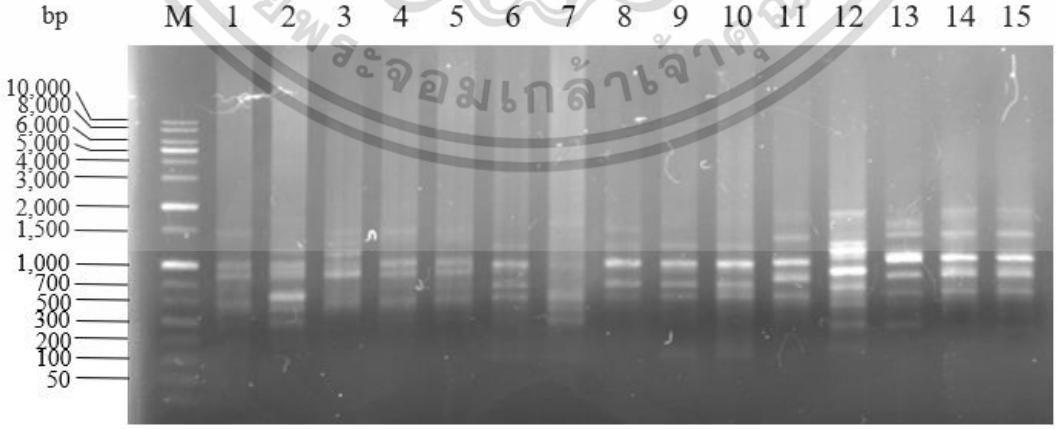
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแหนทั้ง 5 ตัวอย่าง
1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, 5 = บางพลี

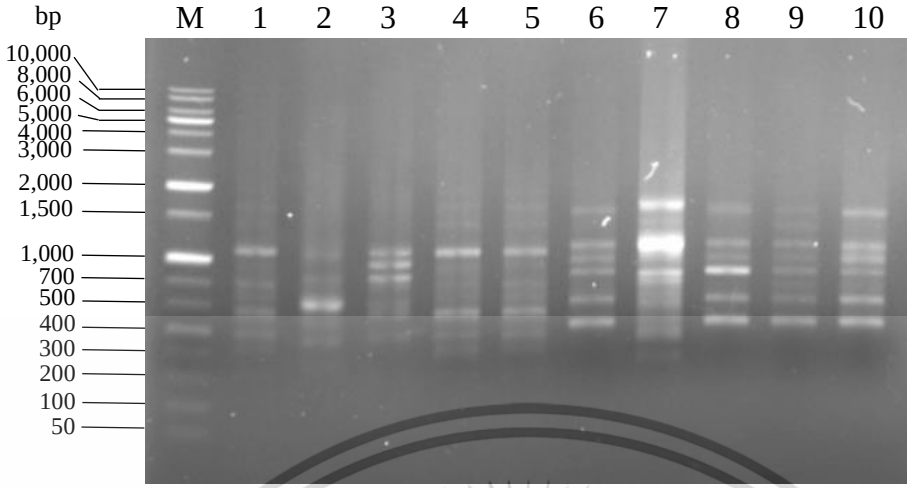
4.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR

แหนตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ในประเทศไทยทั้งหมด 5 ตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 8 เส้น ได้แก่ UBC817 UBC818 UBC825 UBC827 UBC855 UBC856 UBC857 UBC873 ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 8 เส้น ให้จำนวนแถบที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 73 แถบ มีจำนวนแถบที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 60 แถบ ดังรูปที่ 4.2 4.3 และ4.4 และมีค่าเฉลี่ยของ จำนวนแถบที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ที่ 82.06% ดังตารางที่ 4.2 เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค ISSR มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมของแหนตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA ผ่านโปรแกรม DARwin version 6 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง ของ Jaccard ในการสร้างตารางค่าดัชนีความแตกต่างทาง พันธุกรรมของแหนดังตารางที่ 4.3 และสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC817 (1-5), UBC818 (6-10) และ UBC825 (11-15) M = 1 Kb DNA Ladder, 1,6 และ11 = บางเสาธง, 2,7 และ12 = ลาดกระบัง, 3,8 และ 13 = รังสิต, 4,9 และ14 = บางบ่อ, 5,10 และ15 = บางพลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC827 (1-5), UBC855 (6-10)
M = 1 Kb DNA Ladder, 1,6 = บางเสาธง, 2,7 = ลาดกระบัง, 3,8 = รังสิต,
4,9 = บางบ่อ, 5,10 = บางพลี

รูปที่ 4.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC856 (1-5), UBC857 (6-10), UBC873 (11-15)
M = 1 Kb DNA Ladder, 1,6 และ11 = บางเสาธง, 2,7 และ12 = ลาดกระบัง, 3,8 และ
13 = รังสิต, 4,9 และ14 = บางบ่อ, 5,10 และ15 = บางพลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ตารางผลการทดลองของไพรเมอร์ทั้ง 8 เส้น

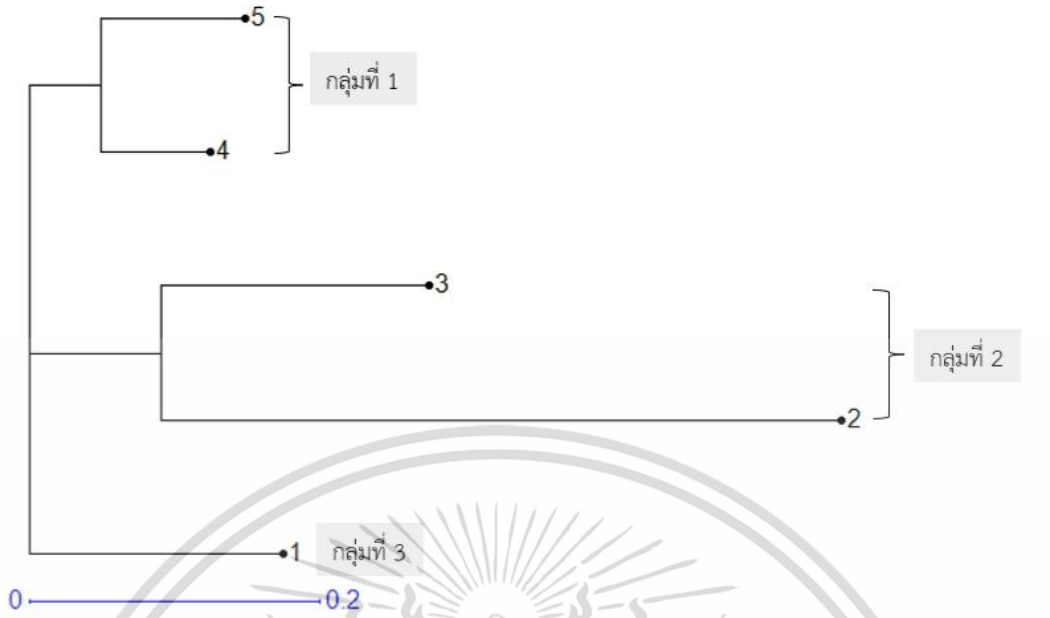
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบทั้งหมด	จำนวนแถบที่แสดงความหลากหลาย	เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (%)
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	8	5	62.50
UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	7	5	71.43
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	13	12	92.31
UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	8	7	87.50
UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	10	7	70.00
UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	11	8	72.73
UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	8	8	100.00
UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A	8	8	100.00

ตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า แหนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.17 ถึง 0.75 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 เมื่อวิเคราะห์ค่าดัชนีความแตกต่าง พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแหนตัวอย่างที่ 4 และ5 มีค่าดัชนีความแตกต่างต่ำที่สุด คือ 0.18 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 4 และ5 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูงที่สุด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแหนตัวอย่างที่ 1 และ2 มีค่าดัชนีความแตกต่างสูงที่สุด คือ 0.75 แสดงให้เห็นว่าแหนตัวอย่างที่ 1 และ2 มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.3 ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมของแหนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ 8 เส้น ตัวอย่างที่ 1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, 5 = บางพลี

ตัวอย่าง	1	2	3	4
2	0.75			
3	0.43	0.65		
4	0.29	0.67	0.43	
5	0.33	0.70	0.41	0.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แผนภาพ phylogenetic tree ระหว่างแหนตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี UPGMA

1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, 5 = บางพลี

จากรูปที่ 4.5 แผนภาพนี้สามารถจัดกลุ่มแหนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ได้โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 5 เขตบางพลี และตัวอย่างที่ 4 เขตบางบ่อ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 3 เขตรังสิต และตัวอย่างที่ 2 เขตลาดกระบัง และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 เขตบางเสาธง เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาพบว่ากลุ่มที่ 1 และ 2 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องกับแหล่งที่มา แต่กลุ่มที่ 3 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มา เนื่องจากแหน *L. aequinoctialis* ที่เก็บมาจากเขตบางเสาธงอาจเกิดการกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ ทำให้มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากแหนที่เก็บจากบริเวณใกล้เคียง

เมื่อนำผลการทดลองของโครงงานพิเศษนี้มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Xue et al. (2012) ที่ใช้เครื่องหมาย ISSR ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหนสกุล *Lemna* และ *Spirodela* ที่มีแหล่งทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน โดยเก็บรวบรวมจากประเทศจีน และเวียดนาม จำนวน 27 กลุ่มประชากร ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Lemna* 16 กลุ่ม และกลุ่ม ประชากรของแหนสกุล Spirodela 11 กลุ่ม ซึ่งผลการทดลองพบว่าจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ แหนทั้ง 2 สกุล ด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 เส้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเกิดแถบดีเอ็นเอของแหนสกุล *Lemna* ทั้งหมด 92 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่ แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) จำนวน 89 แถบ เปอร์เซ็นต์ของแถบ ดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 96.74% และเกิดแถบของดีเอ็นเอของแหนสกุล Spirodela ทั้งหมด 99 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphic band) 98 แถบ เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 98.43% เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UPGMA ด้วยการสร้างแผนภาพ dendrogram พบว่า ตัวอย่างกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Lemna* แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม และตัวอย่างกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Spirodela* แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR สามารถแบ่งตัวอย่างกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Lemna* และตัวอย่างกลุ่มประชากรของแหนสกุล *Spirodela* สอดคล้องกับแหล่งที่อยู่อาศัยหรือแหล่งทางภูมิศาสตร์ของพืช แต่ไม่สอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้

งานวิจัยของ EL-Kholy et al. (2015) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ตัวอย่างแหน *Lemna gibba* 7 ตัวอย่าง และ *Lemna minor* 2 ตัวอย่าง ในพื้นที่สามเหลี่ยม ปากแม่น้ำไนล์ จากเขต El-Gharbiya และ Kafr El-Sheikh โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) และใช้ไพรเมอร์ในการทดสอบทั้งหมด 5 เส้น เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอแล้ว ได้ผลการทดลองคือไพรเมอร์ทุกเส้นสามารถแสดงความแตกต่างได้ดี (polymorphic 100%) จำนวนแถบที่ขึ้นของไพร-เมอร์อยู่ในช่วง 4-13 แถบ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 47 แถบ เป็น polymorphic 47 แถบ แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธี UPGMA ได้ค่าดัชนีความแตกต่างกัน 1.52 สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม *L. minor* และกลุ่ม *L. gibba* จึงสรุปได้ว่าการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกลุ่มจึงสรุปได้ว่าการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกลุ่มตัวอย่างมีอิทธิพลอย่างชัดเจนต่อความหลากหลายทางพันธุ-กรรม แต่ไม่สอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้

งานวิจัยของ ธีระชัย และคณะ (2563) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* ด้วยเทคนิค ISSR โดยจะศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง จากเมล็ดที่เก็บมาจากจังหวัดสกลนคร และอุดรธานี แล้วนำเมล็ดดังกล่าวมาเพาะปลูกที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต จากผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 10 เส้น เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 225 แถบ มีขนาด 515-3,000 คู่เบส โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างทั้งหมด และมีเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100% เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยการสร้างแผนภาพ dendrogram พบว่าตัวอย่างของพืชคราม สกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค ISSR ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* มีประสิทธิภาพมากเนื่องจากผลที่ได้คือพืชคราม สกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่เก็บเมล็ดจากจังหวัดสกลนครและอุดรธานีมาเพาะปลูก พบว่ามีความความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และงานวิจัยนี้มีผลไม่สอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้

และงานวิจัยของ สุทวัฒน์ และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอ จำนวน 32 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์จากการทดสอบไพรเมอร์ 60 เส้น พบว่า 57 เส้น สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 612 แถบ มีแถบที่แสดงความแตกต่าง 240 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 39% ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 160-3,000 คู่เบส ค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.47-0.98 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะละกอด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน สามารถจัดมะละกอออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 อยู่ในเขตอเมริกาเหนือ กลุ่มที่ 2 และ 3 อยู่ในเขตแปซิฟิก ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดของมะละกอ

จากการเปรียบเทียบโครงงานพิเศษกับงานวิจัยของ Xue et al. (2012) และ EL-Kholy et al. (2015) และ ธีระชัย และคณะ (2563) และ สุทวัฒน์ และคณะ (2557) พบว่างานวิจัยดังกล่าวให้ผลไม่สอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้ เนื่องจากโครงงานพิเศษนี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ไม่สอดคล้องกับแหล่งกำเนิดในบางตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 1 บางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ แต่ในงานวิจัยดังกล่าวมีผลการทดลองของการจัดกลุ่มของแหน และมะละกอสอดคล้องกับแหล่งกำเนิด และผลการทดลองการจัดกลุ่มของพืชครามสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับแหล่งกำเนิดตามผลของโครงงานพิเศษนี้

นอกจากเทคนิคเครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม และจัดกลุ่มของพืชตัวอย่าง ยังมีเทคนิคเครื่องหมายอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทาง พันธุกรรมได้เช่นกัน จากงานวิจัยของ ศาสตรา และคณะ (2561) ศึกษาเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปาง โดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 17 เส้น ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จำนวน 5 เส้น คือ OPA11 OPI02 OPI12 OPI14 และ OPI18 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 115 แถบ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-1,500 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.01-0.50 และ ผลจาก Dendrogram พบว่าสามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปางได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ อำเภอเถิน แจ้ห่ม วังเหนือ แม่ทะ แม่เมาะ เมือง งาว สบปราบ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ อำเภอห้างฉัตร แม่พริก เสริมงาม กลุ่มที่ 3 ได้แก่ อำเภอเมืองปาน และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ อำเภอเกาะคา จากการวิจัยเห็นได้ว่าพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปางมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม อาจเนื่องมาจากการผสมข้ามโดยธรรมชาติ หรือการกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ การกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ เกิดจาก 2 ปัจจัยใหญ่ๆ ได้แก่ ปัจจัยภายในพืชและปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ปัจจัยภายในพืช เช่น องค์ประกอบทางพันธุกรรม เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นในจีโนไทป์ของพืชเอง ซึ่งผลการทดลองของ ศาสตรา และคณะ มีความสอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้ที่มีแหนตัวอย่างบางตัวอย่างคือ ตัวอย่างที่ 1 บางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ ไม่ได้ถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับแหนตัวอย่างบางพลี และบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ ที่มีแหล่งกำเนิดใกล้เคียงกัน

และงานวิจัยของ Kalpana et al. (2012) การศึกษาการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของมัลเบอร์รี่ระหว่าง *Morus alba* 14 ตัวอย่าง และ *Morus lhou* (ser) *koidz* 2 ตัวอย่าง โดยเก็บมาจากประเทศเกาหลีใต้ เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของมัลเบอร์รี่โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR ซึ่งในเทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ 40 เส้น เมื่อนำไปทำ PCR ได้ผลการทดลองคือ ค่าแสดงความแตกต่าง (polymorphic) มีค่าเท่ากับ 66.67% และ เทคนิค ISSR ใช้ไพรเมอร์ 10 เส้น ได้ค่าความแตกต่างเท่ากับ 55.05% และนำผลที่ได้ไปหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของเทคนิค RAPD อยู่ในช่วง 0.123-0.378 และ ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของเทคนิค ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ 0.095-0.285 สรุปได้ว่าการใช้เทคนิค RAPD สามารถแสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดีกว่าเทคนิค ISSR จะเห็นได้ว่าจากงานวิจัยของ Kalpana et al. แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค RAPD สามารถแสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี แต่ไม่สามารถนำผลดังกล่าวมาเทียบกับเทคนิค ISSR ได้เนื่องจากใช้จำนวนไพรเมอร์ไม่เท่ากัน จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งในโครงงานพิเศษนี้ใช้เทคนิค ISSR ในการหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้ควรจะนำเทคนิค RAPD มาเปรียบเทียบร่วมด้วย เพื่อประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

โครงงานพิเศษนี้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหนตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในประเทศไทย เมื่อนำแหนตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคเครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 8 เส้น ให้จำนวนแถบที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 73 แถบ มีจำนวนแถบที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 60 แถบ และมีเปอร์เซ็นต์ของแถบที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ที่ 82.06% เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบแผนภูมิ phylogenetic tree โดยใช้วิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มแหนได้ โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 บางพลี และบางบ่อ มีตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ที่ใกล้กัน กลุ่มที่ 2 รังสิต และลาดกระบัง มีตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ที่ใกล้กัน และกลุ่มที่ 3 บางเสาธง มีตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ใกล้เคียงกันกับ บางพลี และบางบ่อ แต่ไม่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแหนทั้ง 5 ตัวอย่าง จากข้อมูล ISSR พบว่าดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งทางภูมิศาสตร์บางส่วน ดังนั้นการจัดกลุ่มด้วยเครื่องหมาย ISSR สามารถสะท้อนให้เห็นถึงแหล่งที่มาของแหนตัวอย่างได้บางส่วน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทอื่นๆ เช่น เครื่องหมาย RAPD เครื่องหมาย AFLP เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

5.2.2 ควรเก็บรวบรวมพืชตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยสุ่มตัวอย่างจากหลายๆ พื้นที่ทั่วประเทศไทยและเก็บในพื้นที่ที่ห่างกันมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธีระชัย ธนานันต์, ศุภรัตน์ บัวบาน และ นฤมล ธนานันต์. 2563. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์. Thai Journal of Science and Technology. 9: 388-396.

วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. 2557. การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (Aerides) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี และไอเอสเอสอาร์. Thai Journal of Science and Technology. 3: 103-107.

ศาสตรา ลาดปะละ, พรอนันต์ บุญก่อน และ หฤทัย ไทยสุชาติ. 2561. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปางโดยใช้เทคนิค RAPD. แก่นเกษตร. 1: 468-474.

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์, ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, คำรพ รัตนสุต และ อรุโณทัย ชาววา. 2557. การใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะละกอ. แก่นเกษตร. 3: 210-215.

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และ สุมาลี พิมพันธุ์. 2563. การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยาสูบ 9 สายพันธุ์. Khon Kaen Agriculture Journal. 48: 567-574.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. Journal of Ubonratchathani University. 2: 38.

สุวิชญา จันทรสาขา. 2565. ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของลำไยเถา. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อภิชา ไชยเหล็ก และ สิริพร โรจน์อารยานนท์. 2558. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากด้วยเทคนิค Sequence Related Amplified Polymorphism. KKU Science Journal. 43: 403-412.

อุบลวรรณ หงษ์อินทร์ และอรพินธุ์ สฤษดิ์นำ. 2561. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ. Khon Kaen Agriculture Journal. 46: 350-354.

Acosta, K., Appenroth, K., Borisjuk, L., Edelman, M., Heinig, U., Jansen, M., Oyama, T., Pasaridu, B., Schubert, I., Sorrels, S., Sree, K., Xu, S., Michael, T. and Lam, E. 2021. Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the genomics and postgenomics era. The Plant Cell. 33: 3207-3234.

Chen, H., Guo, A., Wang, J., Gao, J., Zhang, S., Zheng, J., Huang, X., Xi, J. and Yi, K. 2020. Evaluation of genetic diversity within asparagus germplasm based on morphological traits and ISSR markers. Physiology and Molecular Biology of Plants. 26: 305.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EL-Kholy, A., Youssef, M. and Eid, E. 2015. Genetic diversity of *Lemna gibba* L. and *L. minor* L. populations in Nile delta based on biochemical and ISSR Markers. The Egyptian Society of Experiment Biology. 11: 11-19.

Gilbert, S., Xu, J., Acosta, K., Poulev, A., Lebeis, S. and Lam, E. 2018. Bacterial production of indole related compounds reveals their role in association between duckweed and endophytes. Frontiers in Chemistry. 6: 3.

Kalpana, D., Choi, S., Choi, T., Senthil, K. and Lee, Y. 2012. Assessment of genetic diversity among varieties of mulberry using RAPD and ISSR fingerprinting. Scientia Horticulturae. 134: 79-87.

Kaya, E. 2015. ISSR Analysis for Determination of Genetic Diversity and Relationship in Eight Turkish Olive (Olea europaea L.) Cultivars. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 43: 96-99.

Landolt, E. 1992. Lemnaceae duckweed family. Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science. 26: 10-14.

Lange, P., Gardner, R. and Lange, T. 2014. The vegetation and flora of 'Matukureia Swamp', Puhinui, South Auckland – with notes on *Ranunculus macropus*. Auckland Botanical Society. 69: 64-74.

Sudarsono, S. 2013. What is ISSR Marker and How to Generate the Marker. [Online]. https://pmblab.wordpress.com/2013/10/10/qa-in-agh635-course-what-is-issr-marker-and-how-to-generate-the-marker/.

Xue, H., Xiao, Y., Jin, Y., Li, X., Fang, Y., Zhao, H., Zhao, Y. and Guan, J. 2012. Genetic diversity and geographic differentiation analysis of duckweed using inter-simple sequence repeat markers. Molecular Biology Report. 39: 547-554.

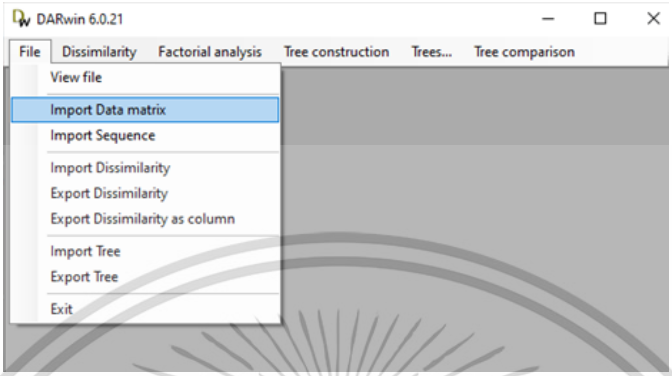
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

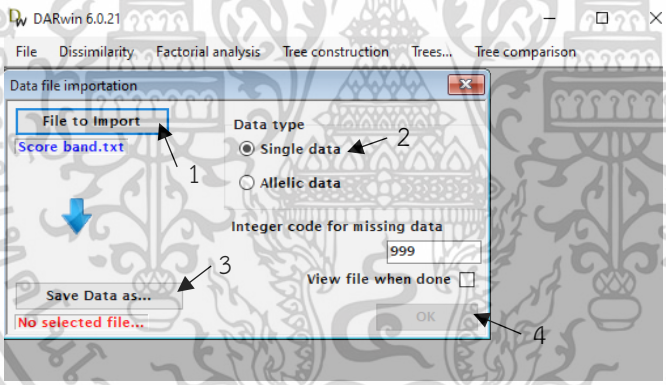
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

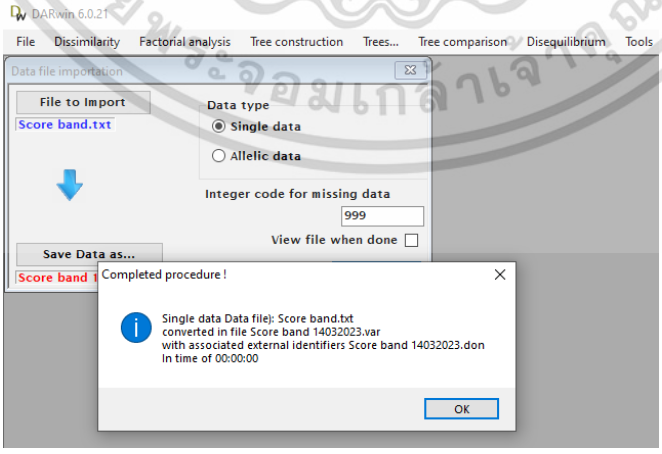
1. วิธีการใช้โปรแกรม DARwin version 6

1.1 เมื่อเปิดโปรแกรมแล้ว กดเลือก File จากนั้นกดเลือก Import data matrix



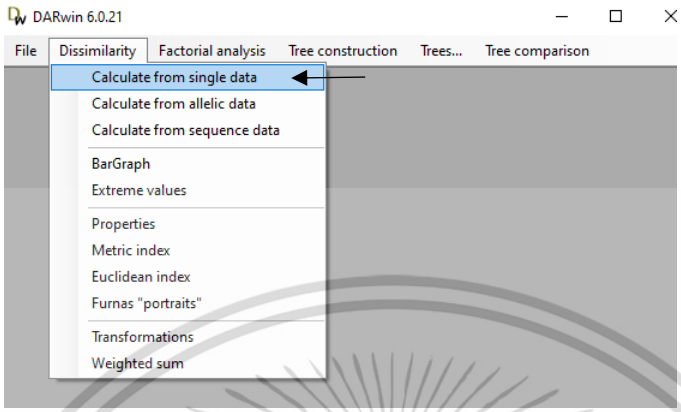
1.2 กด File to Import เลือกไฟล์ score band ที่เป็นสกุล .txt => เลือก Single data =>กด Save Data as... => กด OK หลังจากนั้นจะมีหน้าต่าง Completed procedure ! ขึ้นมา ให้กด OK



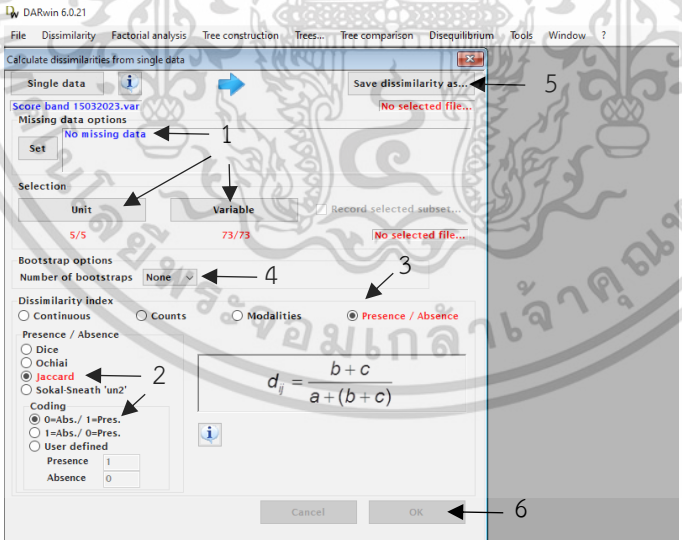


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 กดเลือก Dissimiarity แล้วเลือก Calculate from single data

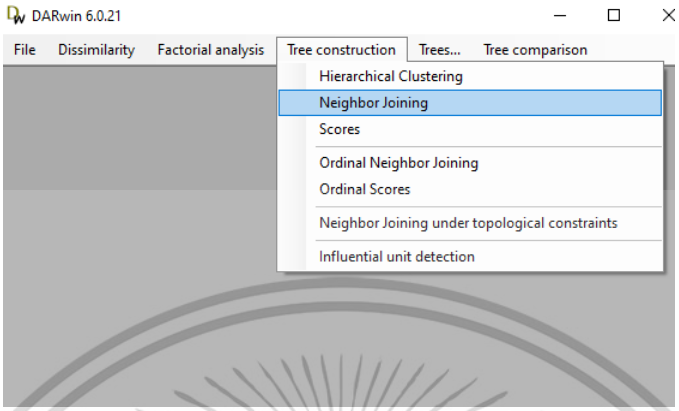


1.4 กด Single data เลือกไฟล์สกุล .var แล้วช่อง Missing data options จะขึ้นว่า No missing data แล้วเช็ค Selection ว่าตัวเลขของ Unit ตรงกับจำนวนตัวอย่างของเราหรือไม่ และดูตัวเลขของ Variable ว่าตรงกับจำนวนมาร์คเกอร์ของเราหรือไม่ => Dissimilarity Index เลือก Presence/Absence => Presence/Absence แล้วเลือก Jaccard => Coding แล้วเลือก 0=Abs./ 1=Pres. => กด Save dissimilarty as... => กด OK

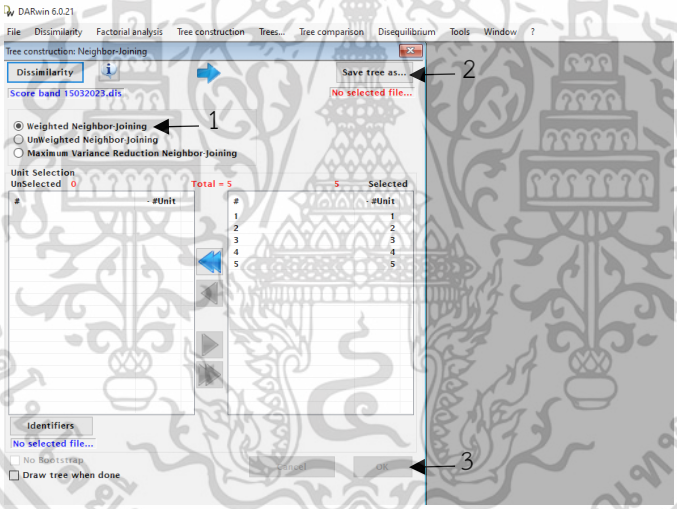


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

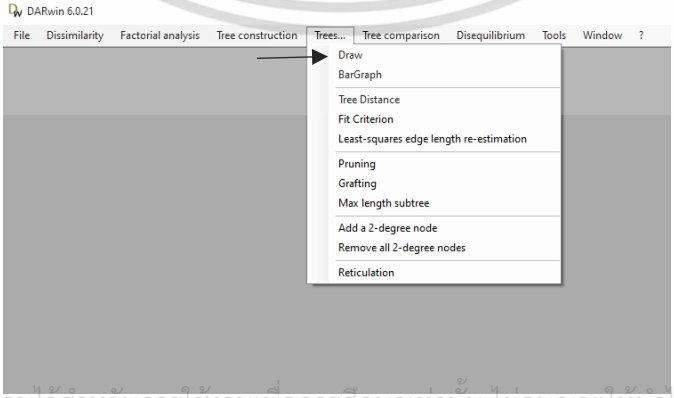
1.5 กดเลือก Tree constuction แล้วเลือก Neighbor



1.6 กด Dissimilarity เลือกไฟล์ สกุล .dis => กดเลือก Weighteds Neighbor Joining => กด Save tree as... => กด OK

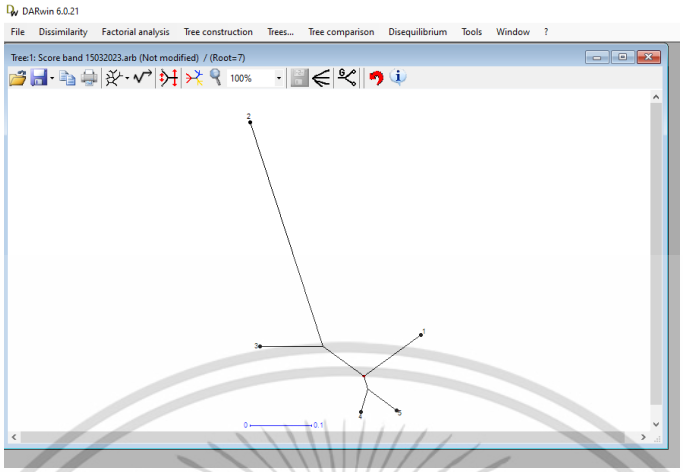


1.7 เลือก Trees... แล้วเลือก Draw เพื่อสร้าง Tree

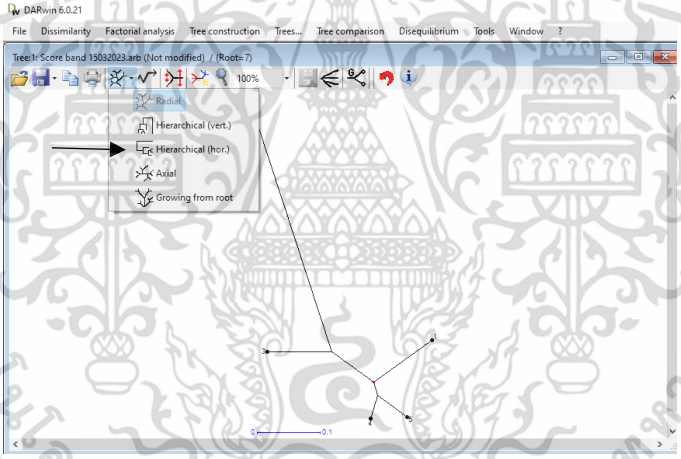


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

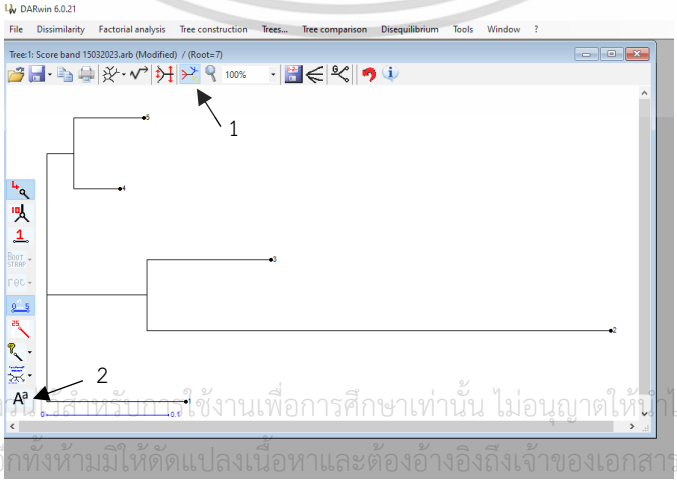
1.8 ได้ Tree ที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม



1.9 การเปลี่ยนรูปแบบของ Tree โดยคลิกที่ไอคอน Type of tree representation แล้วเลือก Hierarchical (Hor.)

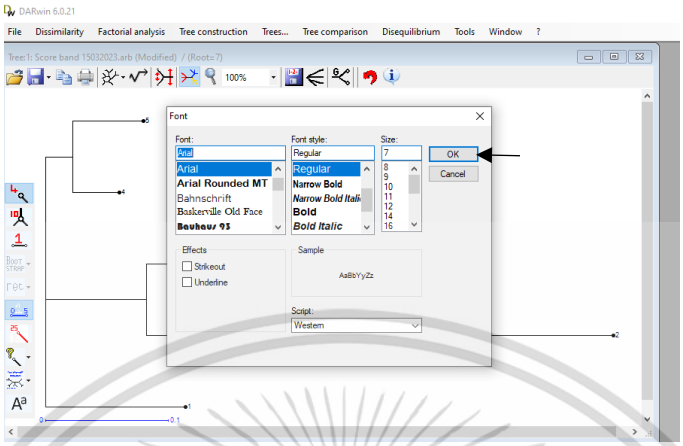


1.10 การเปลี่ยนขนาดตัวอักษร และฟอนต์ คลิกที่ไอคอน identification and illustration จะขึ้นเป็นแถบอุปกรณ์ด้านซ้ายล่าง จากนั้นคลิกที่ไอคอนรูปตัว A^a

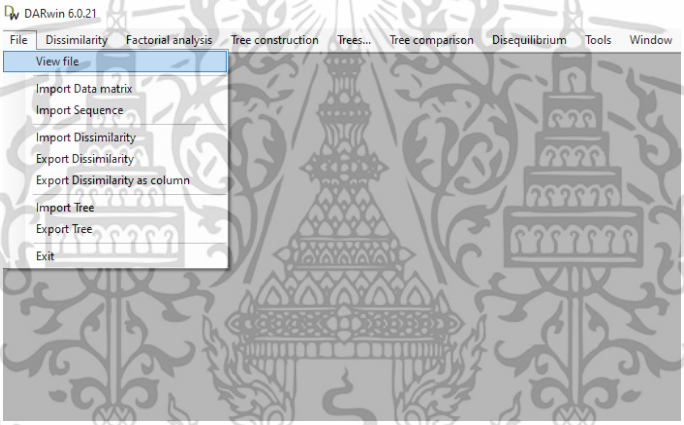


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

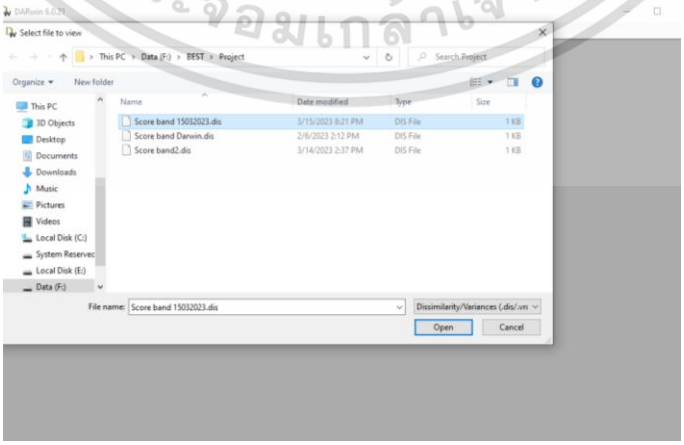
1.11 จากนั้นจะขึ้นเป็นหน้าต่างใหม่ สามารถแก้ไขฟอนต์และขนาดตัวอักษรได้ เมื่อแก้ไขเสร็จแล้วให้คลิกที่ OK



1.12 การแสดงค่าดัชนีความแตกต่าง คลิกที่ File แล้วเลือก View file

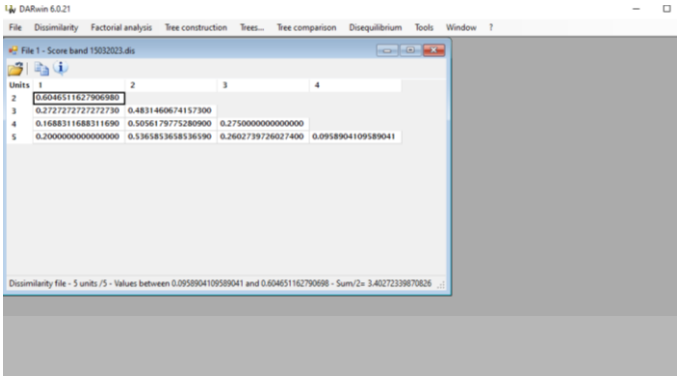


1.13 เลือกไฟล์ที่ได้จากการสร้าง Phylogenetic Tree ที่มีนามสกุลไฟล์เป็น .dis

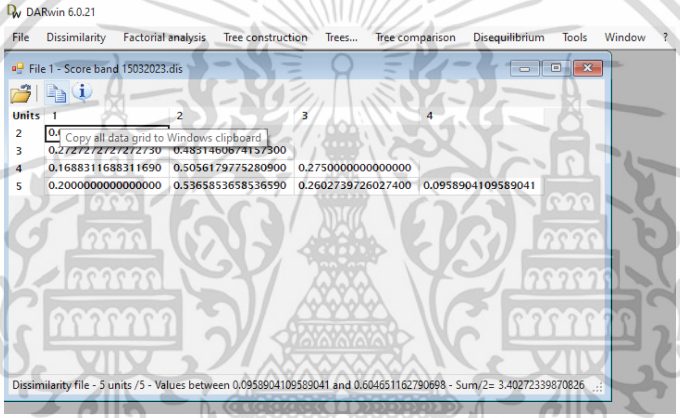


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

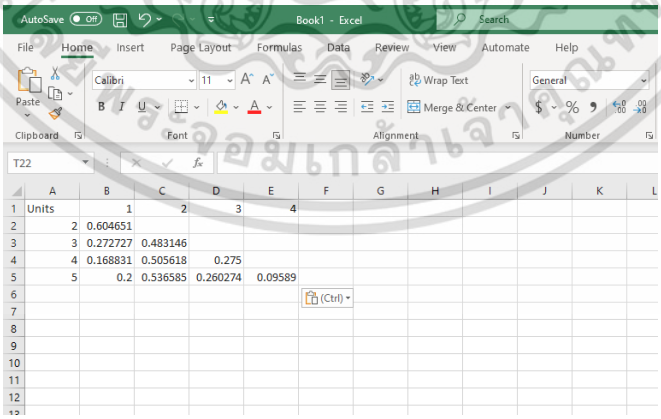
1.14 ได้เป็นตารางแสดงค่าดัชนีความแตกต่าง



1.15 เลือกที่ไอคอนกระดาษซ้อนกัน เป็นการ copy ข้อมูล



1.16 นำไปวางในโปรแกรม Microsoft Excel



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้