ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดีของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทย

RAPD DNA FINGERPRINT OF DUCKWEED *Lemna aequinoctialis* IN THAILAND

นางสาวธารทิพย์ รักษาธรรม

นางสาวศิริกานต์ คชสง่า

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RAPD DNA FINGERPRINT OF DUCKWEED *Lemna aequinoctialis* IN THAILAND

THANTHIP RUKSATAM

SIRIKAN KOTSANGA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดีของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทย

RAPD DNA FINGERPRINT OF DUCKWEED *Lemna-aequinoctialis* IN THAILAND

ชื่อนักศึกษา นางสาวธารทิพย์ รักษาธรรม รหัสนักศึกษา 62050500

นางสาวศิริกานต์ คชสง่า รหัสนักศึกษา 62050542

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพประจำปีการศึกษา 2565

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดีของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทย

ชื่อนักศึกษา นางสาวธารทิพย์ รักษาธรรม รหัสนักศึกษา 62050500
นางสาวศิริกานต์ คชสง่า รหัสนักศึกษา 62050542

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

Lemna aequinoctialis ประเทศไทยเรียกพืชชนิดนี้ว่า “แหน” (Duckweed) เป็นพืชที่ขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยการแตกหน่อทำให้แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทยโครงงานพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *L. aequinoctialis* จากแหล่งน้ำธรรมชาติในแต่ละเขตพื้นที่จากกรุงเทพฯและสมุทรปราการและพื้นที่ใกล้เคียง โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างทั้งหมด 5 พื้นที่เพื่อนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ RAPD ทั้ง 4 ไพรเมอร์ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ RAPD-PCR ทั้งหมด 39 แถบมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 35 แถบและมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 89.46 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 500 ถึง 2,000 คู่เบสและค่าดัชนีความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.32 ถึง 0.84 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.74 และเมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาในการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 และ 2 มีแหล่งที่มาอยู่ใกล้เคียงกันจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันการจัดกลุ่มสอดคล้องกับแหล่งที่มา กลุ่มที่ 3 มีแหล่งที่มาใกล้เคียงกับกลุ่มที่ 1 แต่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 3 ในการจัดกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มา เมื่อพิจารณาจากข้อมูล RAPD พบว่าดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* ในการจัดกลุ่ม กลุ่มที่ 1 และ 2 สอดคล้องกับแหล่งที่มาแต่ในกลุ่มที่ 3 ไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มา

คำสำคัญ : แหน, *Lemna aequinoctialis*, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, เทคนิค RAPD, พีซีอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title RAPD DNA FINGERPRINT OF DOTTED DUCKWEED *Lemna - aequinoctialis* IN THAILAND

Students Miss Thanthip Ruksatam Student ID 62050500

Miss Sirikan Kotsanga Student ID 62050542

Degree Bachelor of Science (Biotechnology)

Department Biology

School Science

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

Academic Year 2565

Advisor Asst.Prof.Dr.Chokchai Kittiwongwattana

Abstract

Lemna aequinoctialis is commonly called duckweed. It is a plant that easily propagates by budding and spreads everywhere in Thailand. The purposes of this special project were to examine genetic relationship of *L. aequinoctialis* from natural water sources in each area from Bangkok, Samut Prakan and nearby areas. By collecting samples from 5 areas to generate DNA fingerprints using Random amplification of polymorphic (RAPD) marker technique, all samples were analyzed with 4 primers. The result from RAPD technique of 4 primers produced a total of 39 bands, which 35 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 89.46%. The size was from 500 to 2,000 base pairs, and dissimilarity index was between 0.32 and 0.84 with an average of 0.74. Using DNA fingerprint to create a phylogenetic tree in DARwin program version 6 with the UPGMA method, samples clustered in 3 groups. In group 1and 2 were sample from areas, so they are in the same group. The grouping corresponds to the source. In group 3, there are sample close to each other. Group 3 location were comparable to group 1, but placed in group 3. This classification was inconsistent with the source. Considering the RAPD data, the DNA of *L. aequinoctialis* in group 1 corresponds to the source, but in groups 3 were inconsistent with the source.

Keywords : Duckweed, *Lemna aequinoctialis,* Genetic relationship, DNA fingerprints, RAPD, PCR

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาคำปรึกษาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่ได้ให้ข้อคิดเกี่ยวการทำงานวิจัย และเสนอแนวทางวิธีการทำและวิธีการแก้ปัญหาต่างๆในระหว่างการทำโครงงานพิเศษนี้ ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี่ด้วย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล และผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ คณะกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาเพื่อให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์ในการทำโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่คอยสนับสนุนคอยช่วยเหลือในทุกด้านและกำลังใจเสมอมา

ธารทิพย์ รักษาธรรม

ศิริกานต์ คชสง่า

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 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 ลักษณะทั่วไปและประโยชน์ของพืช 3
2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic marker)..... 4
2.2.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphology marker)..... 4
2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)..... 5
2.3 เครื่องหมาย Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)..... 5
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 9
3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา 9
3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิด RAPD 9
3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง 9
3.4 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ..... 10
3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR 10
3.6 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส..... 11
3.7 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม..... 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 13
4.1 ตัวอย่างและขอบเขตในการเก็บตัวอย่าง 13
4.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและความเข้มข้น 14
4.3 ผลการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ด้วยเทคนิค PCR 15
4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD 17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 23
5.1 สรุปผลการทดลอง 23
5.2 ข้อเสนอแนะ 23
เอกสารอ้างอิง 24
ภาคผนวก 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ 9
3.2 องค์ประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR 11
3.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 11
4.1 พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างพืช 5 พื้นที่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ 13
4.2 ค่าความเข้มข้นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอของพืชตัวอย่าง 15
4.3 ผลการทดลองของไพรเมอร์ 17
4.4 ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชตัวอย่างทั้ง 5 พื้นที่ในประเทศไทยตัวอย่างที่ 1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, และ 5 = บางพลี 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะทั่วไปของ *L. aequinoctialis*..... 3

4.1 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง 1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง,3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, และ 5 = บางพลี..... 14

4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์กับพืชตัวอย่าง 1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, และ 5 = บางพลี..... 16

4.3 แผนภาพ phylogenatic tree ระหว่างตัวอย่าง *L. aequinoctialis* ทั้ง 5 พื้นที่ โดยใช้วิธี UPGMA..... 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random amplified of polymorphic DNA
ISSR	Inter-simple Sequence Repeat
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphisms
SSR	Simple Sequence Repeats
dNTP	Deoxyribonucleotide
mM	Millimolar
TBE	Tris-Borate EDTA
µM	Micromolar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Lemna aequinoctialis เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและจัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae ชื่อสามัญในประเทศไทยเรียกพืชชนิดนี้ว่า “แหน” คล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน แต่ต่างสกุล (genus) เช่น *Landoltia punctata* ประโยชน์สามารถนำไปเป็นอาหารสัตว์ละปุ๋ยได้ เป็นพืชที่เจริญในน้ำ ไม่มีราก ลำต้น และใบที่แท้จริง มีลักษณะใบเล็ก กลมมน มีรากน้อยเป็นฝอยเล็กๆ ขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศแต่ส่วนใหญ่จะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหรือแตกแผ่นใบใหม่ ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าพืชชนิดนี้ที่พบในธรรมชาติจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถตรวจสอบได้จากเครื่องหมายที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบได้แก่ 1) เครื่องหมายสัณฐานวิทยา (Morphological marker) 2) เครื่องหมายทางชีวเคมี (Biochemical marker) และ 3) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากพืชชนิดนี้เป็นพืชที่มีขนาดเล็กและมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ทำให้การใช้เครื่องหมายสัณฐานวิทยาไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ศึกษา ในทางตรงกันข้ามเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยตรงและทำได้ง่ายกว่าเครื่องหมายทางชีวเคมี ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีความเหมาะสมกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่มีขนาดเล็กอย่างเช่น *L. aequinoctialis*

ประเทศไทยมีงานวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยมากงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Random amplification of polymorphic (RAPD) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่บ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต อาศัยการจับกันระหว่างชิ้นดีเอ็นเอไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้จึงไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสในจีโนมของสิ่งมีชีวิตและยังใช้ระยะเวลาในการทำสั้นไม่ยุ่งยากซับซ้อนและมีราคาถูก จึงเป็นเครื่องหมายที่นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นมาได้นั้นจะนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง *L. aequinoctialis* ที่เก็บรวบรวมมาจากธรรมชาติเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในธรรมชาติต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* โดยใช้เครื่องหมาย RAPD (Random amplified of polymorphic DNA)

1.2.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี

1.3.2 สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ RAPD ที่คัดเลือกได้เพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสร้างแผนผัง dendrogram เพื่อแสดงความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างด้วยโปรแกรม DARwin version 6

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบไพรเมอร์ที่เหมาะสมนำมาใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* ด้วยเทคนิค RAPD (Random amplified of polymorphic DNA)

1.4.2 ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *L. aequinoctialis* ที่นำมาศึกษาในโครงงานพิเศษนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปและประโยชน์ของพืช

Lemna aequinoctialis จัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae ชื่อสามัญในประเทศไทยเรียกว่า “แหน (Duckweed)” เป็นพืชที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปในประเทศไทยมีขนาดเล็กลอยบนผิวน้ำเจริญได้ดีในน้ำนิ่งแพร่กระจายได้ง่ายในพื้นที่น้ำนิ่ง (Porath et al., 1979) ลักษณะพืชมีใบขนาดเล็ก ปลายกลมมน ไม่มีใบที่แท้จริงหรือที่เรียกว่า fronds เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีขนาดความยาว 0.05 ถึง 1.5 เซนติเมตร และกว้าง 0.03 ถึง 1 เซนติเมตร ใต้ใบมีรากฝอยเล็กๆมีราก 1 รากต่อ 1 ใบ ขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศแต่ส่วนใหญ่จะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อหรือแตกแผ่นใบใหม่ (Landolt et al., 1992)

รูปภาพ 2.1 ลักษณะทั่วไปของพืช *L. aequinoctialis*
ที่มา : CABI Digital Library (2566)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L. aequinoctialis เป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการมีองค์ประกอบของโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงมีปริมาณโปรตีน 30 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Rusoff et al., 1980) และยังมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิสระอยู่อย่างสมบูรณ์นิยมนำไปตากแห้งทำปุ๋ยและอาหารสัตว์ได้ (Hillman et al., 1978) งานวิจัยของ ภาณุมาศและคณะ (2560) ศึกษาผลของแหนสดต่อการเจริญเติบโตคุณค่าทางโภชนาการและต้นทุนการผลิตปลาดุกรัสเซียโดยการใช้แหนสดกับอาหารสำเร็จรูปในปริมาณที่แตกต่างกันโดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ปลากิน 100 เปอร์เซ็นต์(ชุดควบคุม) ชุดที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ปลากิน 90 เปอร์เซ็นต์ กับแหนสด 10 เปอร์เซ็นต์และชุดที่ 3 อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ปลากิน 70 เปอร์เซ็นต์ กับแหนสด 30 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าการใช้แหนสดเสริมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 10 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตปลาดุกรัสเซียมีการเจริญเติบโตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปอย่างเดียวส่วนสารสีแคโรทีนอยด์ในเนื้อปลาดีกว่าการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียวและในการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปกับแหนเป็ดสด 10 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปให้ปลาดุกรัสเซียกินเพียงอย่างเดียว แหนเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วมีอัตราการผลิตมวลชีวภาพที่อุดมด้วยแป้งสำหรับไบโอเอทานอลและถูกนำมาใช้เพื่อปรับสภาพน้ำเสียจากแหล่งชุมชน แหล่งอุตสาหกรรม (Landesman et al., 2011) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้พืชชนิดนี้จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการเกษตรแบบใหม่ (Appenroth et al., 2013)

2.2 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers)

เครื่องหมายทางพันธุกรรมเป็นเครื่องหมายที่ระบุความแตกต่างลักษณะทางพันธุกรรม (genetics) ของสิ่งมีชีวิตซึ่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลานได้เครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) เครื่องหมายทางลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological markers) คือ ลักษณะปรากฏภายนอก (2) เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical markers) ได้แก่ โปรตีนในเลือดรหมู่เลือดต่างๆ และ (3) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) คือ ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโมเลกุลดีเอ็นเอ (ศุภมิตร, 2555)

2.2.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

เป็นเครื่องหมายที่ใช้แยกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตโดยการวิเคราะห์ลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะใบ ราก และขนาดลำต้น เป็นสิ่งที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าซึ่งการใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาสามารถทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็วในการจำแนกความหลากหลายของพืช แต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดในการแยกความหลากหลายเนื่องจากลักษณะภายนอกที่สังเกตได้นั้นได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมและไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชบางชนิดที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันมากได้ (สุรีพร, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers)

เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายที่บ่งบอกลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต พืชแต่ละชนิดมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสในโมเลกุลที่แตกต่างกันโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในการเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ทำได้โดยการสร้าง "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" (DNA Fingerprinting) (สุรีพร, 2546) นำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือระบุสายพันธ์โดยคำนวณค่าตัวแปรทางพันธุกรรม เช่น ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เป็นต้น (จุฑาพร, 2555) เครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ (1) Hybridization-base marker เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (2) PCR-based marker เช่น เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR marker), เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ISSR marker), เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) และเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) เป็นต้น (สุรีพร, 2546) ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอคือสามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้อย่างแม่นยำไม่มีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมารบกวนยังสามารถแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ในระดับสูง (สุรินทร์, 2552)

2.3 เครื่องหมายอาร์เอพีดี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่มหรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (Welsh et al., 1990) พืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวโดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีลำดับเบสสายเดี่ยวขนาดสั้น 8-12 เบส จับคู่ไพรเมอร์แบบสุ่ม arbitrary primer หาก RAPD-PCR ไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น ดังนั้นไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ได้ (สุรินทร์, 2545)

ข้อดี คือ เนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำเครื่องมือที่ใช้ไม่มาก เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้นไม่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่ง ดังนั้นจึงจัดเป็น "dominant marker" จึงไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพวกที่เป็น homozygote และ heterozygote ได้ (Waugh et al., 1996) แม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็วและให้ข้อมูลได้มากเทคนิค RAPD มีข้อจำกัดในเรื่องการทำซ้ำ แต่งานวิจัยของ Rajput et al. (2006) โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD และ ISSR จำนวน 60 ไพรเมอร์ในพืชมะเขือเทศผลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าประมาณ 80 % ของเทคนิค RAPD ในการทำซ้ำด้วยเทคนิคนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะให้ผลเหมือนเดิม นอกจากนี้เทคนิค RAPD ยังใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมศึกษาความสัมพันธ์และยังใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของพืชอีกหลายชนิด

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมาย RAPD วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชในวงศ์ Lemnaceae และในระหว่างสกุล *Lemna* ในงานวิจัยของ Martirosian et al. (2008) ได้แก่ สกุล (genus) *Lemna* ได้แก่ *Lemna minor, Lemna gibba, Lemna turionifera, Lemna japonica, Lemna trisulca, Lemna aequinoctialis*, *Spirodela* เช่น *Spirodela polyrhiza* และ *Landoltia* เช่น *Landoltia punctata* จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ในประเทศรัสเซีย โดยใช้เทคนิค RAPD ผลการทดลองพบว่า มีจำนวนไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 242 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 201 ชิ้นและมีเปอร์เซ็นต์ ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 83 เปอร์เซ็นต์ การใช้เครื่องหมาย RAPD สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้วิธี UPGMA ผลการวิเคราะห์พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของ *L. aequinoctialis* มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดของสกุล *Lemna* มีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างสูงสุดที่ 0.37 (ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างทางพันธุกรรมถ้ามีค่ามากแสดงว่าแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก) และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างในวงศ์ Lemnaceae พบว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูงระหว่างสกุล *Landoltia* กับ *Lemna* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.25 สันนิษฐานได้ว่า *Landoltia* เป็นวงศ์ย่อยของสกุล *Lemna*

มีการนำเทคนิค RAPD ตรวจสอบความหลากหลายของพืชชนิดอื่นๆอีก เช่นงานวิจัยของ Aksakal et al. (2010) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช *Lepidium draba* ในพื้นที่ประเทศตุรกีจำนวน 6 พื้นที่ ตรวจสอบความหลากหลายโดยใช้เครื่องหมาย RAPD ใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนจำนวน 12 ไพรเมอร์และสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นได้ทั้งหมด 218 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 78 ชิ้นและมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 33.3 เปอร์เซ็นต์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้วิธี UPGMA สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรม Population เวอร์ชั่น 1.2.28 ผลการวิเคราะห์พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.2184 ถึง 0.3809 ระยะห่างทางพันธุกรรมบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมและบ่งบอกความสอดคล้องกับทางภูมิศาสตร์ระหว่างพืช *L. draba* ทั้ง 6 พื้นที่ แผนภาพเดนโดรแกรมแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาแสดงให้เห็นว่าแหล่งที่มาของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชทั้งสองกลุ่มมีความสอดคล้องกับแหล่งที่มาจากการใช้เทคนิค RAPD สามารถบ่งบอกแหล่งที่มาของพืชได้

งานวิจัยของ Priyanka et al. (2015) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช *Marsilea* เก็บรวบรวมพืชจาก 5 พื้นที่ ในเมือง Kota ประเทศมาเลเซีย เพื่อนำมาศึกษาว่าพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ในแต่ละพื้นที่มีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันหรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรมตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย RAPD ใช้ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน และสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นได้ทั้งหมด 22 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 22 ชิ้นและมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยของชิ้นดีเอ็นที่แสดงความหลากหลายต่อ 1 เส้น มีค่าเท่ากับ 3.66 ผลการวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard และใช้วิธีการ UPGMA สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.02 จากข้อมูล RAPD ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ทางจีโนไทป์ของพืชที่เลือกมาจาก 5 พื้นที่ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่ม A และกลุ่ม B กลุ่ม A แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืช *Marsilea* แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงระหว่าง 0.26 ถึง 0.90 ความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ความคล้ายคลึงกันอาจเป็นเพราะพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ส่วนกลุ่ม B แยกออกมาจากกลุ่ม A มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.00 (ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงถ้ามีค่าน้อยมีความคล้ายคลึงกันน้อย) เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาตัวอย่างพืชทั้งสองกลุ่มความสอดคล้องกับแหล่งที่มา

การใช้เครื่องหมาย RAPD ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย งานวิจัยของ นฤมลและคณะ (2554) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย เก็บรวบรวมพุดสกุลการ์ดีเนียในประเทศไทยจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ พุดซ้อนใหญ่ พุดแสงอุสา พุดสเปน พุดอเมริกา พุดซ้อนแคระ พุดซ้อนด่าง พุดน้ำบุษย์ พุดฮอลแลนด์และพุดเวียดนาม ด้วยเทคนิค RAPD ทดสอบไพรเมอร์จำนวน 59 ไพรเมอร์ พบว่ามี 20 ไพรเมอร์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นได้ทั้งหมด 184 ชิ้น มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอระหว่าง 250 ถึง 3,000 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA คำนวนค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรมผลการวิเคราะห์พบว่าพุดสกุลการ์ดีเนียแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยทั้ง 4 กลุ่มมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.81 ค่าเฉลี่ย 0.62 เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและแผนภาพแดนโดรแกรมพบว่า กลุ่มที่ 1 และ 4 เป็นพุดชนิดเดียวกันและมีลักษณะคล้ายคลึงกัน จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดการ์ดีเนียจำนวน 9 สายพันธุ์ มีความแปรผันทางพันธุกรรมและแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ ศาสตราและคณะ (2561) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปาง เก็บตัวอย่างพันธุ์ข้าวเหนียวดำในพื้นที่จังหวัดลำปางทั้ง 13 อำเภอ ในการเก็บตัวอย่างจะเก็บตัวอย่างจาก 1 แปลงปลูกของเกษตรกรโดยคัดเลือกจากเกษตรกรที่มีการเก็บเมล็ดพันธุ์เอง ได้แก่ อำเภอเถิน แจ้ห่ม วังเหนือ แม่ทะ แม่เมาะ เมือง งาว สบปราบ ห้างฉัตร แม่พริก เสริมงาม เมืองปาน และอำเภอเกาะคา ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค RAPD จำนวน 17 ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้ชิ้นดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 115 ชิ้นขนาดชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 100 ถึง 1500 คู่เบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard และใช้วิธีการ UPGMA สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรม MEGA 3.1 พบว่า ข้าวเหนียวดำทั้ง 13 อำเภอของจังหวัดลำปาง พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 0.50 เมื่อนำมาพิจารณาผลจากแผนภาพแดนโดรแกรมสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยได้แก่ อำเภอเถิน แจ้ห่ม วังเหนือ แม่ทะ แม่เมาะ เมือง งาว สบปราบ กลุ่มที่ 2 อำเภอห้างฉัตร แม่พริก เสริมงาม กลุ่มที่ 3 เมืองปาน และกลุ่มที่ 4 อำเภอเกาะคา จากการจัดกลุ่มตัวอย่างพันธุ์ของข้าวเหนียวดำในแต่ละอำเภอแสดงให้เห็นว่า ในกลุ่มที่ 1 อำเภอเถินและอำเภอแจ้ห่ม มีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.01 สันนิษฐานว่าอาจเป็นข้าวเหนียวดำที่มาจากแหล่งพันธุ์เดียวกันและมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 4 กลุ่มแสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอาจเนื่องจากการผสมข้ามโดยธรรมชาติหรือการกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ มี 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายในพืช เช่น พันธุกรรมความผิดปกติของที่เกิดจากจีโนไทป์ของพืช พืชที่เก็บเมล็ดไว้เป็นเวลานานเมื่อนำมาปลูกพบการแปรผันทางพันธุกรรมสูงและปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น แร่ธาตุอาหาร อุณหภูมิถ้าสูงหรือต่ำมากอาจมีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ พืชที่ปลูกในแหล่งที่ขาดแร่ธาตุบางอย่างมีผลต่อการกลายพันธุ์ จากการใช้เทคนิค RAPD สามารถบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปางได้สามารถจัดกลุ่มข้าวเหนียวดำตามความแตกต่างทางพันธุกรรมในแต่ละอำเภอได้เป็นอย่างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

เก็บรวบรวมตัวอย่าง *L. aequinoctialis* เก็บรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี

3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิด RAPD

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 4 ไพรเมอร์ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทป์อ้างอิงมาจาก Eurofinsgenomics RAPD 10-mer Kits and Primers ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทป์ (5'→3')
OPD-08	GTGTGCCCCA
OPD-18	TGCGGCTGAG
OPE-14	GAGAGCCAAC
OPF-06	GGGAATTCGG

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง

นำพืช *L. aequinoctialis* มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Genomic DNA Mini kit (Plant) ชั่งน้ำหนักพืชให้ได้ 60 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองเทไนโตรเจนเหลวลงไปแล้วบดพืชให้เป็นผงละเอียด จากนั้นใส่ GP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรและสารละลาย RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำมาเขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างที่บ่มให้กลับทุกๆ 5 นาที กลับหลอดทดลองไปมา 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม GP2 buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในส่วนผสมนำมาเขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาบ่มลงบนน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นวาง Filter column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำส่วนผสมใส่ลงใน Filter column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้าย Lysate ใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ ทิ้ง Filter column และ Collection tube จากนั้นเติม GP3 buffer ปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตร Lysate ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายขึ้นลง จากนั้นวาง GD column ลงใน Collection tube อันใหม่ใส่ส่วนผสมลงใน GD column นำไปปั่นเวี่ยงที่ความเร็วรอบ16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้ววาง GD column ลงใน Collection tube อันเดิม ทำซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกครั้ง (ส่วนผสมตัวอย่างที่เหลือ) เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้ววาง GD column ลงใน Collection tube เดิม แล้วเติม Wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง วาง GD column ลงใน Collection tube เดิม ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อปั่นเหวี่ยงให้สารละลายออกจาก GD column ให้หมด จากนั้นนำ GD column ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่นกรองของ GD column เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เพื่อแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์ออกมา

3.4 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีต้องไม่ปนเปื้อนโปรตีนและอาร์เอ็นเอ และชิ้นดีเอ็นเอต้องไม่แตกหัก วัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง วัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ดีเอ็นเอที่ดีควรมีค่าความเข้มข้นที่ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรขึ้นไป และค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอควรอยู่ระหว่าง 1.8 ถึง 2.0 นาโนเมตร ถ้าต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีสิ่งเจือปนมีโปรตีนเจือปน ถ้ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน ส่วนค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 230 ควรอยู่ที่ 2.0 ถึง 2.2 นาโนเมตร ถ้าต่ำกว่า 2.0 แสดงว่ามีสิ่งเจือปน

3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืช *L. aequinoctialis* ทั้ง 5 ตัวอย่าง ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี นำไปตรวจสอบคุณภาพแล้วนำไพรเมอร์และดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยนำ RAPD Primer Set ทั้ง 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPD-08, OPD-18, OPE-14 และ OPF-06 ดังตารางที่ 3.1 มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเตรียมสารในการทำ Master mix องค์ประกอบดังตารางที่ 3.2 ผสมส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดทดลองนำไปปั่นเหวี่ยงจากนั้นเตรียมหลอดสำหรับทำ PCR ผสมส่วนผสม Master mix ปริมาตร 9 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ทั้ง 5 ตัวอย่างและปั่นเหวี่ยงในเครื่อง Spin Down เพื่อให้สารผสมตกมาอยู่ก้นหลอดทดลองจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal Cycler ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน แสดงดังตารางที่ 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ	ปริมาตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
1. Water	5.35
2. 5 µM Primer	1.0
3. 10X buffer	1.0
4. 2 mM dNTP	1.0
5. 25 µM $MgCl_2$	0.6
6. Tap Polymerase	0.05
7. DNA template (50 ng)	1.0
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาในแต่ละขั้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	94	4 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	40
Annealing	35	30 วินาที	
Extension	72	2 นาที 30วินาที	
Final Extension	72	7 นาที	1

3.6 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ชั่งผงอะกาโรสปริมาณ 0.3 กรัม นำมาละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ด้วยไมโครเวฟ เมื่อผงอะกาโรสละลายหมดแล้ว ทิ้งไว้ให้พออุ่นแล้วใส่สีย้อมเจล NEO green ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เทเจลลงในถาดเจลแล้วเสียบหวีเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ วางถาดเจลไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อแผ่นเจลแข็งตัวให้ดึงหวีออกแล้วนำถาดเจลใส่ลงใน Electrophoresis Chamber ที่มี 1X TBE buffer จากนั้นนำดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (loading dye) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยอดลงไปในหลุมเจลและนำ DNA Marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงไปในหลุมแรกของเจลจากนั้นต่อ Electrophoresis Chamber เข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า ปล่อยกระแสไฟฟ้าจากตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า 140 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

นับชิ้นดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้แล้วให้คะแนนในระบบ 1 และ 0 คือ เมื่อปรากฏชิ้นดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และเมื่อไม่ปรากฏชิ้นดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 ใส่ข้อมูลลงใน Excel จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ในโปรแกรม DARwin version 6 (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 ตัวอย่างและขอบเขตในการเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่เก็บรวบรวมได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี

ตารางที่ 4.1 พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างพืช 5 พื้นที่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ

ตัวอย่างที่	ตัวอย่างสายพันธุ์พืช	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่ง GPS
1	*L. aequinoctialis*	ต.ศรีษะจระเข้น้อย อ.บางเสาธง จ.สมุทรปราการ	พิกัด 13°41'02.8"N 100°47'43.2"E
2	*L. aequinoctialis*	แขวงลำปลาทิว เขต ลาดกระบัง จ.กรุงเทพมหานคร	พิกัด 13°43'46.1"N 100°46'32.9"E
3	*L. aequinoctialis*	เขต รังสิต อ.คลองแม่น้ำ จ.ปทุมธานี	พิกัด 14°04'27.3"N 100°37'43.7"E
4	*L. aequinoctialis*	ต.เปร็ง อ.บางบ่อ จ.สมุทรปราการ	พิกัด 13°41'10.1"N 100°52'47.3"E
5	*L. aequinoctialis*	หนองปรือ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ	พิกัด 13°40'17.5"N 100°47'20.8"E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและความเข้มข้น

เมื่อนำพืช *L. aequinoctialis* มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Genomic DNA Mini kit (Plant) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจหาค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000c วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.2 ผลที่ได้ คือ ดีเอ็นเอที่สกัดมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 28 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 76.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าอยู่ในช่วง 1.92 ถึง 2.00 โดยแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างในแต่ละพื้นที่สกัดมาได้ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนเพราะค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 1.8 ถึง 2.00 และอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.83 ถึง 2.36 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอตัวอย่างจากพื้นที่ บางพลีและบางเสาธง มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.83 และ 1.84 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตรไม่ควรต่ำกว่า 2.0 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างจากพื้นที่ บางพลีและบางเสาธง อาจมีสิ่งเจือปนหรือมีการปนเปื้อนคาร์โบไฮเดรตส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก 3 พื้นที่ ลาดกระบัง รังสิตและบางบ่อ มีความบริสุทธิ์ไม่มีสิ่งเจือปน เมื่อนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังรูปภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าแถบที่ได้ชัดเจนดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์พอที่นำไปใช้งานได้

รูปที่ 4.1 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง 1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, และ 5 = บางพลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

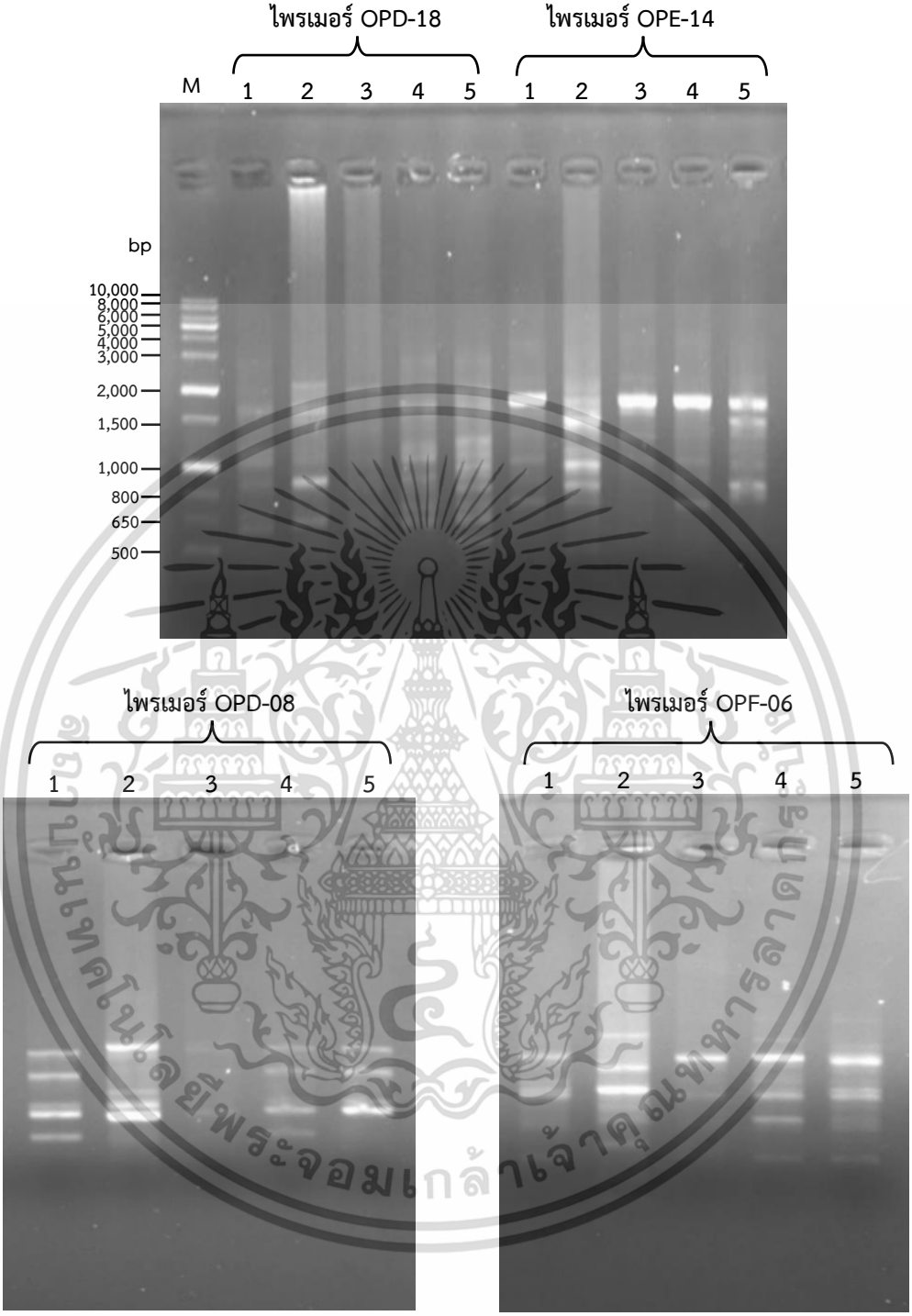
ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มข้นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอของพืชตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/230 นาโนเมตร
1.บางเสาธง	34.8	1.92	1.84
2.ลาดกระบัง	76.2	1.94	2.36
3.รังสิต	40.4	1.93	2.03
4.บางบ่อ	28	2.00	2.27
5.บางพลี	29	1.95	1.83

4.3 ผลการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ด้วยเทคนิค PCR

จากตัวอย่าง *L. aequinoctialis* ที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติในทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังรูปภาพที่ 4.2 โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPD-08, OPD-18, OPE-14, และ OPF-06 แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์มีประสิทธิภาพเนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 4 แถบขึ้นไปและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ไพรเมอร์ OPD-18 แสดงแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 13 แถบและไพรเมอร์ OPD-08 ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 7 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 ไพรเมอร์ RAPD ทั้ง 4 ไพรเมอร์ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 39 แถบ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 35 แถบและมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 89.46 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 500 ถึง 2,000 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ กับพืชตัวอย่าง 1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, และ 5 = บางพลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการทดลองของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทป์	จำนวนแถบทั้งหมด	จำนวนแถบที่แสดงความหลากหลาย	เปอร์เซ็นต์จำนวนแถบแสดงความหลากหลาย
OPD-08	GTGTGCCCCA	7	6	85.71
OPD-18	TGCGGCTGAG	13	11	84.62
OPE-14	GAGAGCCAAC	8	7	87.50
OPF-06	GGGAATTCGG	11	11	100
รวมจำนวนแถบทั้งหมด		39	35	89.46

4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี ด้วยวิธี UPGMA ผ่านโปรแกรม DARwin version 6 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของ Jaccard ในการสร้างตารางดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมดังตารางที่ 4.4 และในการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ดังรูปที่ 4.3

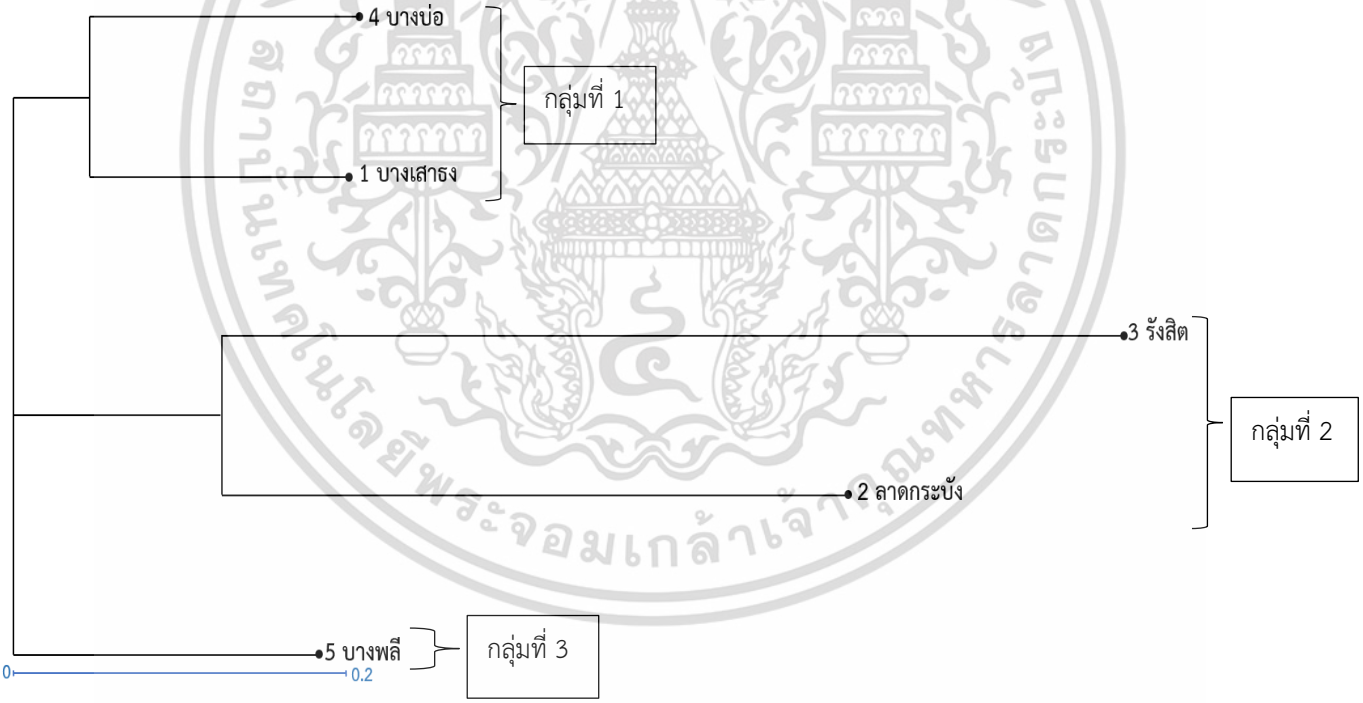
จากตารางที่ 4.4 พบว่า *L. aequinoctialis* ทั้ง 5 พื้นที่ แสดงค่าดัชนีความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.32 ถึง 0.84 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.74 เมื่อวิเคราะห์ค่าดัชนีความแตกต่าง พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างที่ 1 บางเสาธง กับ ตัวอย่างที่ 4 บางบ่อ มีค่าดัชนีความแตกต่างต่ำที่สุด คือ 0.32 แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างที่ 1 บางเสาธงกับตัวอย่างที่ 4 บางบ่อ มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากที่สุดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างที่ 3 รังสิตกับตัวอย่างที่ 5 บาพลี มีค่าดัชนีความแตกต่างสูงที่สุด คือ 0.84 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 3 ในพื้นที่รังสิตกับตัวอย่างที่ 5 บางพลีมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.4 ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชตัวอย่างทั้ง 5 พื้นที่ในประเทศไทย ตัวอย่างที่ 1 = บางเสาธง, 2 = ลาดกระบัง, 3 = รังสิต, 4 = บางบ่อ, และ 5 = บางพลี

ตัวอย่าง	1	2	3	4
2	0.70			
3	0.74	0.81		
4	0.32	0.69	0.77	
5	0.38	0.62	0.84	0.39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปภาพที่ 4.3 phylogenatic tree สามารถแบ่งได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 1 บางเสาธงและตัวอย่างที่ 4 บางบ่อ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 3 รังสิตและตัวอย่างที่ 2 ลาดกระบัง และกลุ่มที่3 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 5 บางพลี เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาในการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 1 บางเสาธงและตัวอย่างที่ 4 บางบ่อ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 3 รังสิตและตัวอย่างที่ 2 ลาดกระบัง แสดงให้เห็นว่ามีแหล่งที่มาอยู่ใกล้เคียงกันจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันการจัดกลุ่มสอดคล้องกับแหล่งที่มา กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 5 บางพลี มีแหล่งที่มาใกล้เคียงกับกลุ่มที่ 1 แต่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 3 ในการจัดกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มา เมื่อดูจากแหล่งที่มาสภาพแวดล้อมปัจจัยต่างๆอาจส่งผลทำให้พันธุกรรมของพืชแปรผันไปได้ ผลการทดลองที่ได้บ่งบอกได้ว่าดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* การจัดกลุ่มด้วยเครื่องหมาย RAPD ในโครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มา



รูปที่ 4.3 แผนภาพ phylogenatic tree ระหว่างตัวอย่าง *L. aequinoctialis* ทั้ง 5 พื้นที่ โดยใช้วิธี UPGMA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลการทดลองโครงงานพิเศษนี้มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Priyanka et al. (2015) มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช *Marsilea* เก็บรวบรวมพืชจาก 5 พื้นที่ในเมือง Kota ประเทศมาเลเซีย เพื่อนำมาศึกษาว่าพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ในแต่ละพื้นที่มีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันหรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย RAPD ใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นได้ทั้งหมด 22 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 22 ชิ้นและมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยของชิ้นดีเอ็นที่แสดงความหลากหลายต่อ 1 เส้น มีค่าเท่ากับ 3.66 ผลการวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard และใช้วิธีการ UPGMA สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.02 จากข้อมูล RAPD ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ทางจีโนไทป์ของพืชที่เลือกมาจาก 5 พื้นที่ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่ม A และกลุ่ม B กลุ่ม A แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืช *Marsilea* แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงระหว่าง 0.26 ถึง 0.90 ความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดความคล้ายคลึงกันอาจเป็นเพราะพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ส่วนกลุ่ม B แยกออกมาจากกลุ่ม A มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.00 (ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงถ้ามีค่าน้อยมีความคล้ายคลึงกันน้อย) เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาตัวอย่างพืชทั้งสองกลุ่มมีความสอดคล้องกับแหล่งที่มาซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aksakal et al. (2010) นำเทคนิค RAPD ศึกษาความหลากหลายของพืช ตรวจสอบว่าในพืช *Lepidium draba* พื้นที่ประเทศตุรกีจำนวน 6 พื้นที่ ตรวจสอบความหลากหลายโดยใช้เครื่องหมาย RAPD ใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนจำนวน 12 ไพรเมอร์และสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นได้ทั้งหมด 218 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 78 ชิ้นและมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 33.3 เปอร์เซ็นต์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้วิธี UPGMA สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรม Population เวอร์ชั่น 1.2.28 ผลการวิเคราะห์พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.2184 ถึง 0.3809 ระยะห่างทางพันธุกรรมบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมและความสอดคล้องกับทางภูมิศาสตร์ระหว่างพืช *L. draba* ทั้ง 6 พื้นที่ แผนภาพเดนโดรแกรมแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาแสดงให้เห็นว่าพืชทั้งสองกลุ่มมีความสอดคล้องกับแหล่งที่มา เมื่อนำงานวิจัยทั้งสองงานนี้มาเปรียบเทียบกับโครงงานพิเศษผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่าง *L. aequinoctialis* ในแต่ละพื้นที่โดยการใช้เครื่องหมาย RAPD ผลของการจัดกลุ่มในแต่ละแหล่งที่มาในบางกลุ่มไม่สอดคล้องกัน

ในการใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความหลากหลายของพืชชนิดอื่นๆ เช่น งานวิจัยของศาสตราและคณะ (2561) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปาง เก็บตัวอย่างพันธุ์ข้าวเหนียวดำในพื้นที่จังหวัดลำปางทั้ง 13 อำเภอ ในการเก็บตัวอย่างจะเก็บตัวอย่างจาก 1 แปลงปลูกของเกษตรกรโดยคัดเลือกจากเกษตรกรที่มีการเก็บเมล็ดพันธุ์เอง ได้แก่ อำเภอเถิน แจ้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห่ม วังเหนือ แม่ทะ แม่เมาะ เมือง งาว สบปราบ ห้างฉัตร แม่พริก เสริมงาม เมืองปาน และอำเภอเกาะคา ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค RAPD จำนวน 17 ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้ชิ้นดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 115 ชิ้นขนาดชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 100 ถึง 1500 คู่เบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard และใช้วิธีการ UPGMA สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรม MEGA 3.1 พบว่า ข้าวเหนียวดำทั้ง 13 อำเภอของจังหวัดลำปาง พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 0.50 เมื่อนำมาพิจารณาผลจากแผนภาพแดนโดรแกรมสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยได้แก่ อำเภอเถิน แจ้ห่ม วังเหนือ แม่ทะ แม่เมาะ เมือง งาว สบปราบ กลุ่มที่ 2 อำเภอห้างฉัตร แม่พริก เสริมงาม กลุ่มที่ 3 เมืองปาน และกลุ่มที่ 4 อำเภอเกาะคา จากการจัดกลุ่มตัวอย่างพันธุ์ของข้าวเหนียวดำในแต่ละอำเภอแสดงให้เห็นว่าในกลุ่มที่ 1 อำเภอเถินและอำเภอแจ้ห่ม มีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.01 สันนิษฐานว่าอาจเป็นข้าวเหนียวดำที่มาจากแหล่งพันธุ์เดียวกันและมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 4 กลุ่มแสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอาจเนื่องจากการผสมข้ามโดยธรรมชาติหรือการกลายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายในพืช เช่น พันธุกรรมความผิดปกติของที่เกิดจากจีโนไทป์ของพืช พืชที่เก็บเมล็ดไว้เป็นเวลานานเมื่อนำมาปลูกพบการแปรผันทางพันธุกรรมสูง และปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น แร่ธาตุอาหาร อุณหภูมิถ้าสูงหรือต่ำมากอาจมีผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ พืชที่ปลูกในแหล่งที่ขาดแร่ธาตุบางอย่างมีผลต่อการกลายพันธุ์ จากการใช้เทคนิค RAPD สามารถบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปางได้ สามารถจัดกลุ่มข้าวเหนียวดำตามความแตกต่างทางพันธุกรรมในแต่ละอำเภอได้เป็นอย่างดี

การใช้เครื่องหมาย RAPD ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย งานวิจัยของ นฤมลและคณะ (2554) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย เก็บรวบรวมพุดสกุลการ์ดีเนียในประเทศไทยจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ พุดซ้อนใหญ่ พุดแสงอุสา พุดสเปน พุดอเมริกา พุดซ้อนแคระ พุดซ้อนด่าง พุดน้ำบุษย์ พุดฮอลแลนด์และพุดเวียดนาม ด้วยเทคนิค RAPD ทดสอบไพรเมอร์จำนวน 59 ไพรเมอร์ พบว่ามี 20 ไพรเมอร์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นได้ทั้งหมด 184 ชิ้น มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอระหว่าง 250 ถึง 3,000 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA คำนวนค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรมผลการวิเคราะห์พบว่าพุดสกุลการ์ดีเนียแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยทั้ง 4 กลุ่มมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.81 ค่าเฉลี่ย 0.62 เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและแผนภาพแดนโดรแกรมพบว่า กลุ่มที่ 1 และ 4 เป็นพุดชนิดเดียวกันและมีลักษณะคล้ายคลึงกัน จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดการ์ดีเนียจำนวน 9 สายพันธุ์ มีความแปรผันทางพันธุกรรมแล้และแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ในการใช้เครื่องหมาย RAPD ศึกษา

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้สามารถจำแนกและบ่งชี้ความแตกต่างของพืชพุดการ์ดีเนีย 9 สายพันธุ์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมาย RAPD วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชในวงศ์ Lemnaceae และในระหว่างสกุล *Lemna* ในงานวิจัยของ Martirosian et al. (2008) ได้แก่ สกุล (genus) *Lemna* ได้แก่ *Lemna minor, Lemna gibba, Lemna turionifera, Lemna japonica, Lemna trisulca, Lemna aequinoctialis*, *Spirodela* เช่น *Spirodela polyrhiza* และ *Landoltia* เช่น *Landoltia punctata* จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ในประเทศรัสเซีย โดยใช้เทคนิค RAPD ผลการทดลองพบว่า มีจำนวนไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 242 ชิ้น มีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด 201 ชิ้นและมีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 83 เปอร์เซ็นต์ การใช้เครื่องหมาย RAPD สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพเดนโดรแกรมโดยใช้วิธี UPGMA ผลการวิเคราะห์พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของ *L. aequinoctialis* มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดของสกุล *Lemna* มีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างสูงสุดที่ 0.37 (ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างทางพันธุกรรมถ้ามีค่ามากแสดงว่าแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก) และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างในวงศ์ Lemnaceae พบว่ามีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูงระหว่าง สกุล *Landoltia* กับ *Lemna* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.25 สันนิษฐานได้ว่า *Landoltia* เป็นวงศ์ย่อยของสกุล *Lemna* เทคนิค RAPD สามารถนำมาตรวจสอบความสัมพันธ์ของแหนในวงศ์ Lemnaceae ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากเทคนิค RAPD ที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมยังมีเครื่องหมายอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจสอบได้อีกอย่างเช่นงานวิจัยของ Kittiwongwattana (2022) การศึกษานี้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตำลึง 15 ชนิด เก็บรวบรวมมาจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทย กรุงเทพฯ นครนายก ปทุมธานี และฉะเชิงเทรา ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคเครื่องหมาย 2 แบบ ได้แก่เทคนิค RAPD และเทคนิค ISSR ใช้ไพรเมอร์ RAPD ทั้งหมด 60 ไพรเมอร์มีจำนวน 12 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอและให้ขึ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 92 ชิ้น จากชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดมีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายจำนวน 52 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอคิดเป็น 55.45 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยของจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต่อ 1 ไพรเมอร์ มีค่าเท่ากับ 7.67 และตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 59 ไพรเมอร์มีจำนวน 12 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอและให้ขึ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 98 ชิ้น จากชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดมีชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายจำนวน 37 ชิ้น เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอคิดเป็น 36.4 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยของจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต่อ 1 ไพรเมอร์ มีค่าเท่ากับ 8.2 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Dice เทคนิค RAPD มีค่าตั้งแต่ 0.73 ถึง 0.98 เทคนิค ISSR มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าตั้งแต่ 0.88 ถึง 1.00 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Dice ใช้วิธีการ UPGMA สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมจากเทคนิค RAPD และ ISSR ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน สามารถแบ่งกลุ่มได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ในแต่ละกลุ่มให้ผลสอดคล้องกับแหล่งที่มา ในการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างตำลึง 15 ชนิดผลที่ได้ไพรเมอร์ RAPD ให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายมากกว่าไพรเมอร์ ISSR

จากงานวิจัยทั้ง 5 งานนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD ที่เลือกใช้ในโครงงานพิเศษนี้มีความเหมาะสมมีเปอร์เซ็นต์ชิ้นดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายของพืชมากกว่าเทคนิคอื่นๆ และเทคนิค RAPD ยังสามารถนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายความสัมพันธ์ของพืชในวงศ์ Lemnaceae, พุดสกุลการ์ดีเนียและพืชชนิดอื่นๆได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับโครงงานพิเศษนี้เทคนิค RAPD ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาในการจัดกลุ่มในบางกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มาของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงงานพิเศษนี้ศึกษาเกี่ยวกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ RAPD ของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทยเมื่อนำตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ทั้ง 5 พื้นที่ ได้แก่ บางเสาธง ลาดกระบัง รังสิต บางบ่อ บางพลี มาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD ที่อาศัยปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 39 แถบมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม 35 แถบและมีเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายอยู่ที่ 89.46 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 500 ถึง 2,000 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบแผนภาพ phylogenetic tree โดยใช้วิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มทั้ง 5 พื้นที่ได้เป็น 3 กลุ่ม เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาในการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 1 บางเสาธงและตัวอย่างที่ 4 บางบ่อ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 3 รังสิตและตัวอย่างที่ 2 ลาดกระบัง แสดงให้เห็นว่ามีแหล่งที่มาอยู่ใกล้เคียงกันจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันการจัดกลุ่มสอดคล้องกับ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างที่ 5 บางพลี มีแหล่งที่มาใกล้เคียงกับกลุ่มที่ 1 แต่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 3 ในการจัดกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มาและเมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้ง 5 พื้นที่ ตัวอย่างที่ 1 บางเสาธง กับ ตัวอย่างที่ 4 บางบ่อ มีค่าดัชนีความแตกต่างต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 1 บางเสาธง กับ ตัวอย่างที่ 4 บางบ่อ มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากที่สุดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างที่ 3 รังสิต กับตัวอย่างที่ 5 บางพลี มีค่าดัชนีความแตกต่างสูงที่สุดแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ 3 พื้นที่รังสิตกับตัวอย่างที่ 5 บางพลี มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมน้อยที่สุด เมื่อพิจารณาจากข้อมูล RAPD พบว่าดีเอ็นเอของ *L. aequinoctialis* ในการจัดกลุ่ม กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 สอดคล้องกับแหล่งที่มาแต่ใน กลุ่มที่ 3 ไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มา

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตถ้ามีงานวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ควรกำหนดขอบเขตในการเก็บรวบรวมพืชตัวอย่างในพื้นที่ที่กว้างกว่านี้โดยสุ่มตัวอย่างในหลายๆพื้นที่ในประเทศไทยรวบรวมจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อเปรียบเทียบตัวอย่างให้ชัดเจน ควรใช้เทคนิคหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทอื่นๆเพื่อนำมาเปรียบเทียบข้อมูลความแตกต่างหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในงานวิจัยนี้ควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้วิเคราะห์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไพรเมอร์ให้มากขึ้น

เอกสารนี้ ... ต้องการให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. วารสารแก่นเกษตร. 40 : 299-308.

นฤมล ธนานันต์, รุจิเรข นพเกษร,และธีระชัย ธนานันต์. 2554. การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพุดสกุลการ์ดีเนีย. วารสารวิทยาศาสตร์. 16 : 41-46.

ภาณุมาศ อัมพรสวัสดิ์, จงกล พรมยะ, บัญญัติ มนเทียรอาสน์และชนกันต์ จิตมนัส. 2560. ผลของแหนสดต่อการเจริญเติบโตคุณค่าทางโภชนาการและต้นทุนการผลิตปลาดุกรัสเซียในระบบน้ำหมุนเวียน. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 11 : 32-44.

ศาสตรา ลาดปะละ, พรอนันต์ บุญก่อนและหฤทัย ไทยสุชาติ. 2561. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำในจังหวัดลำปางโดยใช้เทคนิค RAPD. วารสารแก่นเกษตร. 1 : 46.

ศุภมิตร เมฆฉาย. 2555. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์. วารสารแก่นเกษตร. 2 : 51-54.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ. 5 : 37-59.

Aksakal, O., Sunar, S., Kaya, Y., and Agar, G. 2010. Genetic diversity within and among *Lepidium draba* populations from Eastern Anatolia based on RAPD analysis. Biochemical genetics. 48. 603-611.

Appenroth, K. J., Borisjuk, N., and Lam, E. 2013. Telling duckweed apart genotyping technologies for the Lemnaceae. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology. 19 : 1-10.

Kittiwongwattana, C. 2022. Genetic relationship of *Coccinia grandis* (L.) Voigt accessions, based on RAPD and ISSR markers. Science, Engineering and Health Studies. 16. 22030005.

Landolt, G. 1992. Lemnaceae Duckweed Family. Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science. 26 : 10-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Landesman, L., Fedler, C., and Duan, R. 2011. Plant nutrient phytoremediation using duckweed. Eutrophication: consequences and control. 341-354.

Martirosian, E. V., Ryzhova, N. N., Skriabin, K. G., and Kochieva, E. Z. 2008. RAPD analysis of genome polymorphism in the family Lemnaceae. Genetika. 44(3) : 417-422.

Porath, D., Hepher, B. and Koton, A. 1979. Duckweed as an aquatic crop evaluation of clones for aquaculture. Aquatic Botany. 7 : 273-278.

Priyanka, S., and Nilima, B. 2015. Assessment of genetic diversity among *Marsilea* populations of Hadauti plateau as revealed by RAPD markers. Indian Journal of pure & Applied Biosciences. 2 : 254-261.

Rajput, S. G., Wable, K. J., Sharma, K. M., Kubde, P. D., and Mulay, S. A. 2006. Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato. African Journal of Biotechnology. 5(2) : 108-112.

Rusoff, L. L., Blakeney Jr, E. W., and Culley Jr, D. 1980. Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 28(4) : 848-850.

Waugh, R., and Power, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotechnology. 10 : 186-191.

Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic acids research. 18(24) : 7213-7218.

Hillman, W. S., and Culley, D. D. 1978. The uses of duckweed: The rapid growth, nutritional value, and high biomass productivity of these floating plants suggest their use in water treatment, as feed crops, and in energy-efficient farming. American Scientist. 66(4) : 442-451.

CABI Digital Library. 2560. ***Lemna aequinoctialis* (lesser duckweed)**. [Online]. เข้าถึงจาก:https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.121132 (สืบค้นเมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2566)

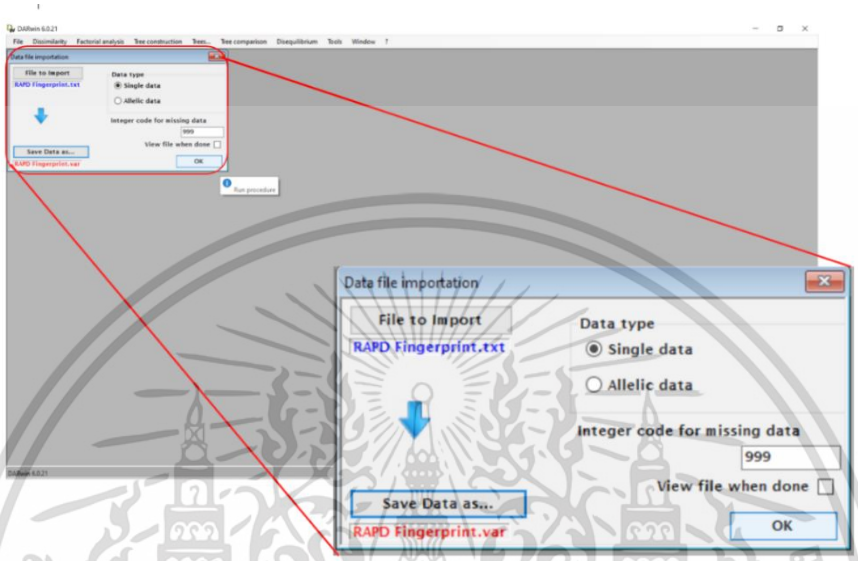
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

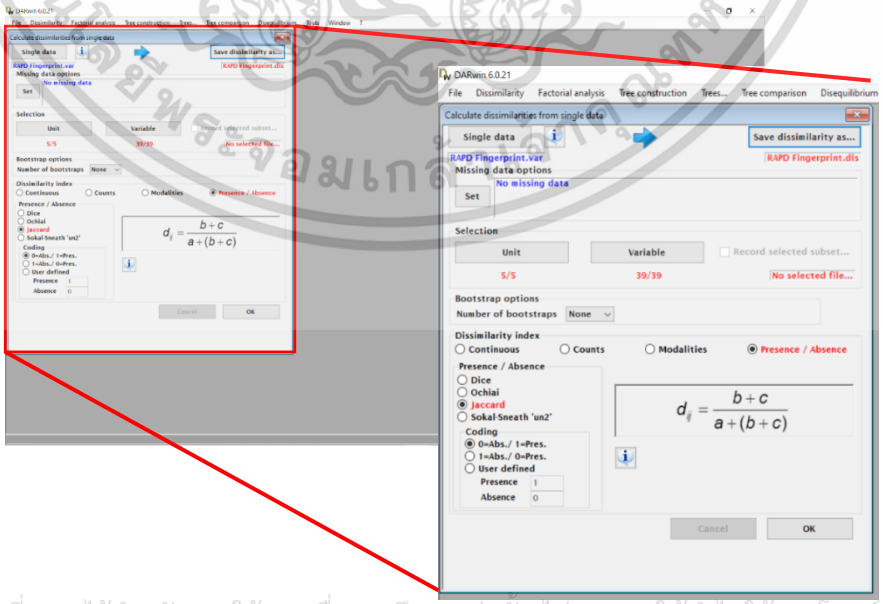
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วิธีการใช้โปรแกรม DARwin version 6

1.1 เปิดโปรแกรม DARwin version 6 จากนั้น กดหัวข้อ File เลือก Import data matrix จากนั้นกด File to import เลือกไฟล์ สกุล .txt (Tab delimited) จากนั้นกด Save data as... เลือก Single data จากนั้น กด View file when done แล้วกด OK

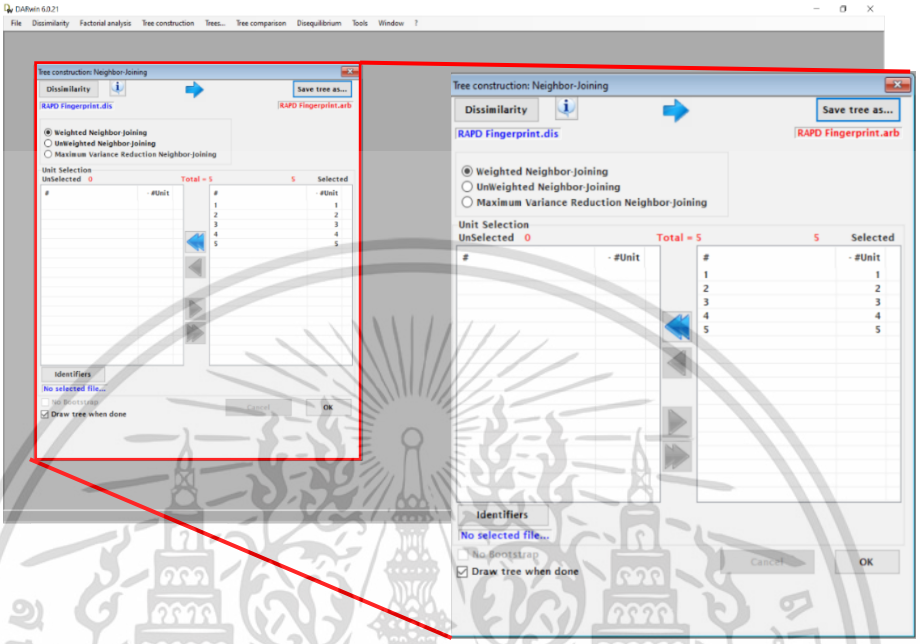


1.2 กดหัวข้อ Dissimilarity เลือก Calculate from single data จากนั้นกด Single data เลือกไฟล์ สกุล .Var กด Jaccard และ 0=Abs./1=Pres.จากนั้นเลือก Presence/Absence และ Number of bootstraps กด None จากนั้นกด Save dissimilarity as... กด OK

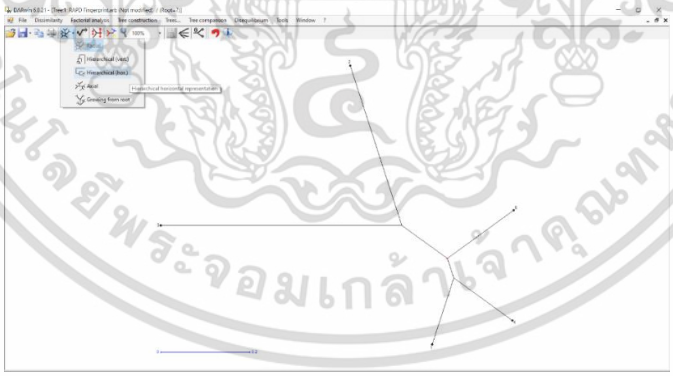


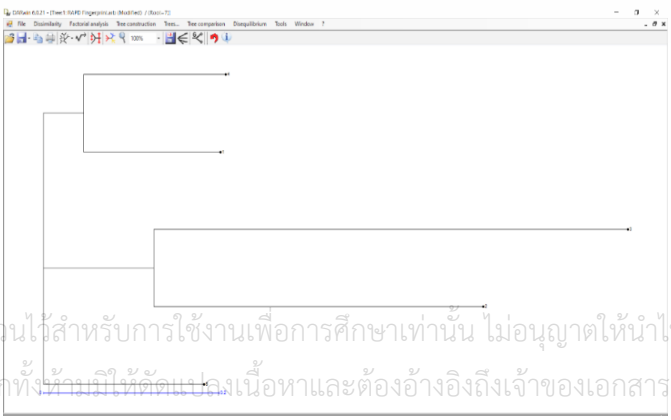
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 กดหัวข้อ Tree construction เลือก Neighbor Joining จากนั้นกด Dissimilarity เลือกไฟล์ สกุล .dis แล้วเลือก Weighted Neighbor-Joining กด Draw tree when done จากนั้นเลือก Save tree as... กด OK



จากนั้นกด เลือก Hierarchical (hor.) จะได้ แผนภูมิ phylogenetic tree

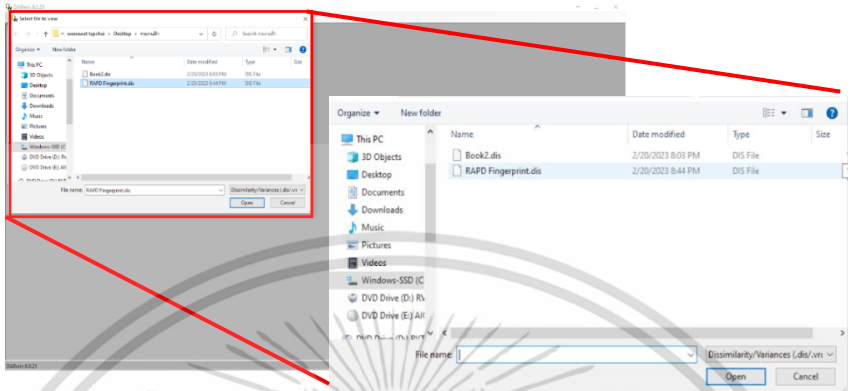




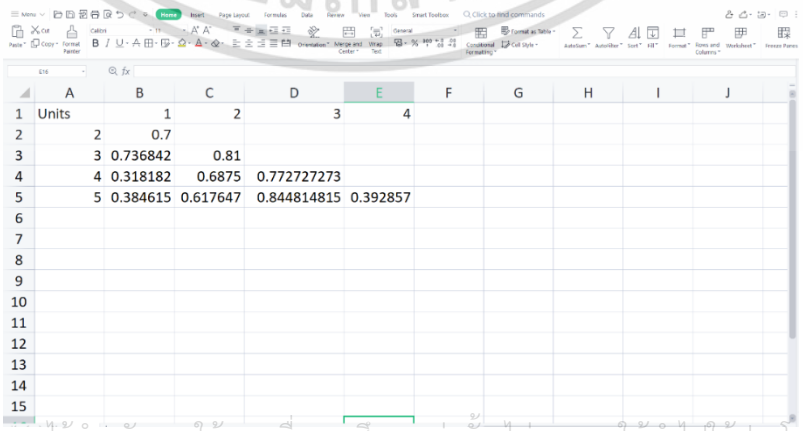
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีแสดง Dissimilarity index ด้วยโปรแกรม DARwin version 6

2.1 เลือกไฟล์นามสกุล .dis ที่ได้จากขั้นตอนการสร้าง Phylogenetic tree จะแสดง Window ใหม่ขึ้นมา



จากนั้นกด เป็นการ Copy จากนั้นวางตารางที่ Copy มาลงใน Excel จะได้ matrix ที่แสดงค่า Dissimilarity ระหว่างตัวอย่าง



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Units	1	2	3	4					
2	2	0.7								
3	3	0.736842	0.81							
4	4	0.318182	0.6875	0.772727273						
5	5	0.384615	0.617647	0.844814815	0.392857					
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่.....8.....เดือน....มิถุนายน.....พ.ศ....2566....

ข้าพเจ้า นางสาวธารทิพย์ รักษาธรรม รหัสประจำตัว 62050500
นางสาวศิริกานต์ คชสง่า รหัสประจำตัว 62050542

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง
ชื่อภาษาไทย ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดีของแหน *Lemna aequinoctialis* ในประเทศไทย
ชื่อภาษาอังกฤษ RAPD DNA FINGERPRINT OF DUCKWEED *Lemna aequinoctialis* IN THAILAND
ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์.....1.69.....% หรือโปรแกรม Turnitin.....%

ลงชื่อ.....ธารทิพย์..... ลงชื่อ.....ศิริกานต์.....
(นางสาวธารทิพย์ รักษาธรรม) (นางสาวศิริกานต์ คชสง่า)
นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..... ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้