

การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการประเมินความหลากหลาย
ทางพันธุกรรมของมะปราง

MOLECULAR MARKER FOR GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT
OF *Bouea macrophylla*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-041

การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการประเมินความหลากหลาย
ทางพันธุกรรมของมะปราง

MOLECULAR MARKER FOR GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT
OF *Bouea macrophylla*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-041

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MOLECULAR MARKER FOR GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT
OF *Bouea macrophylla*



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR THE DEGREE OF MASTER IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2017

KMITL-2017-SC-M-020-041

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

“การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการประเมินความหลากหลายทาง
พันธุกรรมของมะพร้าว”
(MOLECULAR MARKER FOR GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT
OF *Bouea macrophylla*)

ชื่อนักศึกษา

นายสมบัติ แก้วผ่องอำไพ

รหัสประจำตัว

57605113

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)


ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี) ผศ.ดร.โองการ วนิชาชีวะ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ดร.กษิตศ ดิษฐบรรจง ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ผศ.ดร.โองการ วนิชาชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 5 กรกฎาคม พ.ศ. 2560 เวลา 13.00 - 16.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ตึกจุฬารัตน 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนิ ณะบุรีพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่.....เดือน.....ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปราง
ชื่อนักศึกษา	สมบัติ แก้วผ่องอำไพ
รหัสประจำตัว	57605113
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โองการ วนิชาชีวะ

บทคัดย่อ

มะปราง (*Bouea macrophylla* Griff.) เป็นหนึ่งในผลไม้พื้นเมืองที่มีชื่อเสียงชนิดหนึ่ง ซึ่งพบได้ทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ควรค่าแก่การปลูก และอนุรักษ์อย่างต่อเนื่อง เพราะมะปรางเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและระบบนิเวศ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมทางจีโนไทป์ของมะปราง 30 ตัวอย่าง ที่เก็บได้จาก 7 จังหวัดจากประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอที พบจำนวนร้อยละโพลิมอร์ฟิกที่ 34.09, 43.04, 40.80 และ 22.31 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมโดยใช้รูปแบบของสายสัมพันธ์แบบ neighbor joining (NJ) และสร้างกลุ่มความสัมพันธ์แบบกลุ่ม (principal coordinates analysis; PCoA). พบค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ที่ในช่วงระหว่าง 0.831–0.985 ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มมะปรางออกเป็น 2 กลุ่ม โดยประชากรที่ศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำมากที่ (genetic differentiation: G_{ST}) = 0.034 รวมถึงมีค่าการไหลของยีนสูง (N_m) เท่ากับ 12.080 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ามะปรางมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงต้องมีการวางแผนการพัฒนาพืชกลุ่มนี้ในระยะยาวเพื่อส่งเสริมความหลากหลายทางพันธุกรรมให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น โดยรวมสรุปได้ว่าเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอที ได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในมะปรางได้ เนื่องจากให้ข้อมูลความหลากหลาย และยังสะดวกต่อการใช้เมื่อทำการทดลองซ้ำแล้วได้ผลที่เหมือนเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปราง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปราง

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ เครื่องหมายไอพีบีเอส เครื่องหมายเอสซีไอที เครื่องหมายเอสอาร์เอที มะปราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Molecular marker for genetic diversity assessment of <i>Bouea macrophylla</i>
Student Name	Sombhat Kaewpongumpai
Student ID	57605113
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2017
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Ongkarn Vanijajiva

Abstract

Marian plum (*Bouea macrophylla* Griff.) is renowned as one of the native typical fruits in Southeast Asia which need to be conserved and continuously cultivated because of economic and ecological significances. In this study, the genetic diversity among 30 marian plum genotypes collected from seven provinces of Thailand were determined by comparing their molecular inter simple sequence repeats (ISSR), inter-primer binding sites (iPBS), start codon targeted (SCoT), and sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers. We found a percentage of polymorphic fragments 34.09, 43.04, 40.80 and 22.31 obtained from ISSR, iPBS, SCoT, and SRAP, respectively and were used to define the genetic similarity among the marian plum genotypes by neighbor joining (NJ) dendrogram and two dimensional scaling by principal coordinates analysis (PCoA). The genetic similarity coefficients among 30 cultivars of marian plum were relatively high with a range of 0.831–0.985. The Marian plum genotypes were divided into two groups. The studied populations showed very low genetic differentiation ($G_{ST} = 0.034$) and high gene flow ($N_m = 12.080$). The very low of genetic diversity within-individual Marian plum varieties suggests that it is critical to develop long-term strategies for enhancing genetic diversity within Marian plum cultivars. In conclusion, ISSR, iPBS, SCoT and SRAP have proven to be the marker of choice in Marian plum genetic study, because of their variability, easy of using, accessibility of detection and reproducibility. Especially, ISSR marker is better marker for genetic diversity to study in *B. macrophylla*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าการฉีกหัก หรือการพิมพ์ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต และต้องขอสงวนสิทธิ์ในชื่อเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : Genetic diversity, ISSR, iPBS, SCoT, SRAP, *Bouea macrophylla*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้จะไม่สำเร็จล่วงไปด้วยดี หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โองการ วนิชาชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา และความเอาใจใส่ ตลอดจนข้อเสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ รวมทั้งตรวจแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา และช่วยตรวจสอบความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.กษิตศ ดิษฐบรรจง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกสถาบัน ให้คำแนะนำ คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา และช่วยตรวจสอบความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณร้อยตำรวจตรีอำนาจ หงส์ทอง เจ้าของสวนนพรัตน์ และคุณวิจิต ไกรสร สวัสดิ์ เจ้าของสวนวิจิตการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพืช และคอยให้คำปรึกษาแนะนำ

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบทุนอุดหนุนประเภทยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน และเป็นแรงกำลังใจมาโดยตลอด อีกทั้งยังสนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษาอย่างเต็มที่ และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ให้กำลังใจตลอดมา ทำยที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นายสมบัติ แก้วผ่องอำไพ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ชีววิทยาของมะพร้าว	4
2.2 ความหลากหลาย และเครื่องหมายทางโมเลกุล	7
2.3 การจำแนกสายพันธุ์พืชโดยเครื่องหมายทางโมเลกุล.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	15
3.1 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา.....	15
3.2 อุปกรณ์.....	16
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB	17
3.4 สารเคมีที่ใช้ในเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี.....	17
3.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	17
3.6 วิธีการทดลอง	18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	25
4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมะพร้าว.....	25
4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์.....	26
4.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส.....	29
4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที	33
4.5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปรางจากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอฟี.....	39
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	47
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	47
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	48
เอกสารอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก.....	59
ภาคผนวก ก.....	๕1
ภาคผนวก ข.....	66
ประวัติผู้เขียน.....	๕1
ผลงานทางวิชาการจากงานวิจัย.....	๕2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ลำดับ ชื่อสายพันธุ์ รหัสตัวอย่าง และแหล่งที่เก็บ.....	15
3.2 ส่วนประกอบสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส และเอสซีไอที.....	19
3.3 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์.....	20
3.4 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ...	20
3.5 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายไอพีบีเอส.....	21
3.6 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเอสซีไอที	21
3.7 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเครื่องหมายไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี.....	23
3.8 ส่วนประกอบสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี.....	23
3.9 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเอสอาร์เอพี	23
4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของมะปรางด้วยเครื่องหมาย ไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี.....	44
4.2 ข้อมูลเปรียบเทียบค่าทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของมะปรางด้วยเครื่องหมาย ไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี.....	46
ก-1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนใบของตัวอย่าง.....	60
ก-2 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ำยของมะปราง 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องหมาย ไอเอสเอสอาร์.....	61
ก-3 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ำยของมะปราง 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส.....	62
ก-4 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ำยของมะปราง 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที.	63
ก-5 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ำยของมะปราง 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี.....	64
ก-6 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ำยของมะปราง 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี.....	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	4
2.2	6
2.3	9
2.4	12
2.5	13
4.1	25
4.2	27
4.3	27
4.4	28
4.5	29
4.6	30
4.7	31
4.8	32
4.9	32
4.10	34
4.11	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างเครื่องหมายเอสซีไอที	35
4.13 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะพร้าว และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะพร้าว และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด	36
4.14 แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี โดยจุดแต้มดำแสดงตัวอย่างมะพร้าว และดาวสีดำแสดงตัวอย่างมะยงชิด	37
4.15 แสดงสายสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์แบบ NJ ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี	38
4.16 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี	39
4.17 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะพร้าว และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะพร้าว และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด	39
4.18 แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี โดยจุดแต้มดำแสดงตัวอย่างมะพร้าว และดาวสีดำแสดงตัวอย่างมะยงชิด	41
4.19 แสดงสายสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์แบบ NJ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี	42
4.20 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี	43
4.21 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะพร้าว และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะพร้าว และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด	43
ข-1 รูปตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของมะพร้าว (MP) และมะยงชิด (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ UBC807 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส	67

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข-2 รูปตัวอย่างแถบตีเอ็นเอของมะพร้าว (MP) และมะยงชิด (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จาก เครื่องหมายไอพีไอเอสโดยใช้ไพรเมอร์ 2380 เปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส.....	68
ข-3 รูปตัวอย่างแถบตีเอ็นเอของมะพร้าว (MP) และมะยงชิด (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จาก เครื่องหมายเอสซีไอทีโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT03 เปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส.....	69
ข-4 รูปตัวอย่างแถบตีเอ็นเอของมะพร้าว (MP) และมะยงชิด (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จาก เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ME3EM3 เปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส.....	70

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะปราง (*Bouea macrophylla* Griff.) เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดใหญ่ ใบมีลักษณะเรียวยาว ผลมีรสชาติโดดเด่นเฉพาะตัว ทั้งรสหวาน เปรี้ยว และเปรี้ยวอมหวาน ส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในแถบภูมิอากาศเขตร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เชื่อว่าเป็นศูนย์กลางทางชีวภาพจัดอยู่ในสกุลมะปราง (*Bouea* Meisn.) โดยอยู่วงศ์มะม่วงหิมพานต์ (Anacardiaceae) (Chayamarit, 2010) ปัจจุบันพืชชนิดนี้เป็นที่สนใจจากเกษตรกรและผู้เกี่ยวข้องในการส่งเสริมเพื่อให้เป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากความโดดเด่นของรสชาติ ทำให้พืชในกลุ่มนี้ถูกประชาสัมพันธุ์และส่งออกไปยังต่างประเทศมากขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) อย่างไรก็ตามสาเหตุจากมะปรางเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกในเชิงเกษตรกรรมมาหลายร้อยปี เช่นเดียวกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ เช่น ทุเรียน มังคุด เป็นต้น ซึ่งในเชิงการค้านิยมใช้รสชาติในการจำแนกมะปรางออกจากกันเป็น 3 กลุ่ม (Subhadrabandhu, 2001) ได้แก่ กลุ่มมะปรางเปรี้ยว กลุ่มมะปรางหวาน และกลุ่มมะยงชิด เกษตรกรนิยมปลูกมะยงชิดมากกว่ามะปรางทำให้เกิดการพัฒนสายพันธุ์จากภูมิปัญญาของเกษตรกร ส่งผลให้ปัจจุบันสายพันธุ์ของมะปรางมีมากกว่า 50 ชื่อสายพันธุ์ เช่น ทูลถวาย ทองนพรัตน์ ลุงชิด ทองใหญ่ สุวรรณบาท ลุงพล และลุงประทีป เป็นต้น โดยการตั้งชื่อของมะปรางเกิดจากการตั้งชื่อจากขนาดผล รสชาติ แหล่งที่ปลูกหรือเรียกตามชื่อเกษตรกร จึงอาจส่งผลกระทบต่อในอนาคตหากต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ให้เป็นพืชเศรษฐกิจ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการหาหลักฐาน และเครื่องมือที่น่าเชื่อถือชนิดอื่นๆ เข้ามาใช้ร่วมกับการศึกษา เนื่องจากการศึกษาด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์เพียงอย่างเดียวมีข้อจำกัด ซึ่งเครื่องหมายทางโมเลกุลเป็นอีกเครื่องมือหนึ่งที่สามารถช่วยในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี

เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) โดยเฉพาะลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (สรพงษ์, 2554) อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างได้ การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของพืชได้เข้ามาช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น (สุริพร, 2546) และยังเป็นข้อมูลสำคัญในการจัดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (Paterson และคณะ, 1991) และยังประยุกต์ใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Mondini และคณะ, 2009) เครื่องหมายทางโมเลกุลที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายของพืช ได้แก่ เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ISSR: Inter Simple Sequence Repeat)

เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ไม่

จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบส มีหลักการคือใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) และเติมนิวคลีโอไทด์คัดเลือก (Predeep และคณะ, 2002) โดยไพรเมอร์จะเข้าจับกับไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่ง ใกล้เคียง กันแล้วเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอระหว่างไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 2 ตำแหน่งนั้น ซึ่งเรียกขึ้นดีเอ็นเอนี้ว่าไอเอสเอสอาร์โดยมีข้อดี คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว และต้นทุนไม่สูง ส่วนข้อด้อยคือเป็นเครื่องหมายที่แสดงการข่มแบบสมบูรณ์ (complete dominant) (Powell และคณะ, 1996; สุรินทร์, 2552) ซึ่งหมายความว่ายีนเด่นสามารถข่มยีนด้อยได้ เครื่องหมายไอพีบีเอส (iPBS: inter Primer Binding Sites) เป็นเครื่องหมายที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อนทำได้ง่ายไม่ซับซ้อนให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่ความคงตัวสูง (Kalendar และคณะ, 2011) เครื่องหมายเอสซีไอที (SCoT: Start Codon Targeted) เป็นเครื่องหมายที่ดัดแปลงจากเครื่องหมายอาร์เอฟทีโดยอาศัยเบส ATG ไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย บริเวณตำแหน่งที่เริ่มต้นการถอดรหัส (Collard และ Mackill, 2009) และเครื่องหมายเอสอาร์เอฟที (SRAP: Sequence-Related Amplified Polymorphism) เป็นเครื่องหมายที่ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ซึ่งแตกต่างจากเครื่องหมายข้างต้นที่ใช้ไพรเมอร์เพียงเส้นเดียว ได้แก่ ไพรเมอร์เริ่มต้น (forward primer) ที่มีขนาด 17 เบส และไพรเมอร์ตาม (reverse primer) มีขนาด 18 เบส (Li และ Quiros, 2001) อย่างไรก็ตามมีเพียงรายงานของ Ghazali และคณะ (2015) ที่ประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลไอเอสเอสอาร์กับมะพร้าวเพียงเครื่องหมายเดียว ดังนั้นผู้วิจัยได้ตระหนักและเห็นความสำคัญจึงได้จัดทำการวิจัยเรื่อง “การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าว” เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของมะพร้าวแล้ว ข้อมูลที่ได้สามารถเป็นประโยชน์สำหรับการจัดการฐานข้อมูลทางทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทยทั้งในด้านการอนุรักษ์สายพันธุ์และเป็นฐานข้อมูลสำคัญต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของมะพร้าว
- 2) เพื่อทดสอบการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลกับมะพร้าว โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอฟที

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะพร้าวและมะยงชิดจากแหล่งเกษตรกรรมที่สำคัญจากภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครนายก จังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดอยุธยา และจังหวัดลพบุรี และจากภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ จังหวัดสุโขทัย และจังหวัดกำแพงเพชร เพื่อใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบ และศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมอาศัยรูปแบบลายพิมพ์โดยใช้เครื่องหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี จากนั้นนำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์และวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบความสัมพันธ์และโครงสร้างเชิงพันธุกรรมของมะปราง
- 2) ได้เครื่องหมายที่เหมาะสมในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอมะปราง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของมะปราง

พืชสกุลมะปราง (*Bouea* Meisn.) เป็นพืชในวงศ์มะม่วงหิมพานต์ (Anacardiaceae) พืชในสกุลมะปรางจัดว่าจำแนกได้ยากเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน (เรณูภา และคณะ, 2557) ประกอบด้วยสมาชิกราว 3-4 ชนิด กระจายตัวอยู่ในแถบประเทศอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (รูปที่ 2.1) เชื่อว่ามีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ศูนย์กลางของความหลากหลายทางชีวภาพซึ่งอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับประเทศไทยพบ 2 ชนิด (Chayamarit, 2010) คือ มะปริง (*Bouea oppositifolia* (Roxb.) Meisn.) ซึ่งในประเทศอินโดนีเซียเรียกว่า Raman Padi หรือ Kunangan ส่วนประเทศมาเลเซียเรียกว่า Gemis, Kundang- Siam หรือ Remnia (Lim, 2012) และมะปราง (*Bouea macrophylla* Griff.) พบได้ในทุกภาคของประเทศไทย หรือเรียกว่า มะยงชิด ตรงกับชื่อในภาษาอังกฤษว่า Marian plum และ Plum mango ในประเทศอินโดนีเซียเรียกว่า Ramaria หรือ Gandaria ส่วนประเทศมาเลเซียเรียกว่า Kundang, Rembunia หรือ Setar (Subhadrabandhu, 2001)



รูปที่ 2.1 แผนที่การกระจายตัวของพืชสกุลมะปราง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะปราง ลำต้น เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ เมื่อต้นเจริญเต็มที่ สูงได้ถึง 15-30 เมตร มีรูปทรงต้นค่อนข้างแหลมถึงทรงกระบอกมีกิ่งก้านสาขาค่อนข้างทึบขึ้นอยู่ขนาดของแต่ละสายพันธุ์เปลือกไม้สีเทาอ่อนปนน้ำตาล เมื่อถูกตัดมียางไหลออกมามะปรางมีรากแก้วที่มีความแข็งแรงสามารถยึดเกาะกับดินได้อย่างดี ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกจากกิ่งแบบตรงข้าม สลับกัน (opposite) ใบรูปรี (elliptic) ขอบใบมีลักษณะเรียบ (entire) ปลายใบเรียวแหลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(acuminate) โคนใบมีลักษณะแหลมแบบรูปปลี (cuneate) ผิวใบมีลักษณะมันวาว (lustrous) ก้านใบยาว 1-2.5 เซนติเมตร มีขนาดของความกว้างประมาณ 3.5 เซนติเมตรยาวเฉลี่ยประมาณ 14 เซนติเมตร ดอก ออกเป็นช่อกระจุกแยกแขนง (racemose panicle) เกิดบริเวณปลายกิ่ง ช่อดอกยาว 8-15 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกสมบูรณ์ (complete flower) การบานเริ่มจากด้านล่างไปสู่ปลายช่อดอก ก้านดอกยาว 3.5 มิลลิเมตร กลีบดอกสีเหลือง มีขนาดเท่ากันจำนวน 4 กลีบ ฐานกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน เกสรเพศผู้มี 10 อัน อับละอองเกสรมี 2 ห้อง แตกตามยาว มีรังไข่ 1 อัน รังไข่อยู่สูงกว่าเกสรเพศผู้ ฐานรองรับไข้อยู่ระหว่างเกสรเพศผู้กับเกสรเพศเมีย ผล เป็นผลเดี่ยว (simple fruit) แบบผลไม้ (drupe) มีลักษณะทรงกลมรูปไข่ ปลายเรียวแหลม จำนวน 1-15 ผลต่อช่อ เปลือกผลเรียบเกลี้ยงเป็นมัน ผลดิบมีสีเขียวอ่อน-เขียวเข้มตามอายุของผลสุกมีสีเหลืองหรือเหลืองอมส้มเปลือกผลนิ่ม เนื้อสีเหลืองแดง หรือส้มออกแดงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ รสชาติหวาน หวานอม-เปรี้ยว เปรี้ยว เมล็ดผลหนึ่งจะมีเพียงเมล็ดเดียว ลักษณะเมล็ดค่อนข้างแบนยาวรี ผิวของเมล็ดมีลักษณะเป็นเส้นใยสีน้ำตาลปนเหลือง เนื้อของเมล็ดมีทั้งสีขาวและสีชมพูอมม่วง มีรสขมฝาดและขม (อภิชาติ และจันทรา, 2558)

ปัจจุบันมะปรางและมะยงชิดเป็นที่สนใจในเชิงเศรษฐกิจ โดยผลผลิตจะออกสู่ตลาด ตั้งแต่เดือนมีนาคมจนถึงพฤษภาคม โดยในปี 2546 มีพื้นที่ปลูกรวมทั้งประเทศ ประมาณ 17,421 ไร่ ผลผลิตรวมประมาณ 14,162 ตัน ส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ พบว่าจังหวัดนครนายกเป็นแหล่งที่มีพื้นที่การปลูกมะปรางและมะยงชิดมากที่สุดถึง 3,000 ไร่ สามารถจำหน่ายผลผลิตได้ตั้งแต่สายพันธุ์ที่มีผลขนาดเล็ก กิโลกรัมละ 100 บาท ผลขนาดกลาง กิโลกรัมละ 150-200 บาท สำหรับสายพันธุ์ที่มีผลขนาดใหญ่ สามารถจำหน่ายได้ถึงกิโลกรัมละ 200-250 บาท รวมทั้งผลที่มีตำหนิหรือตกเกรดยังสามารถขายได้ในราคา 30-40 บาท ซึ่งถือว่าได้ราคาดีมากเมื่อเทียบกับไม้ผลชนิดอื่นๆ ปัญหาที่สำคัญในการผลิตไม้ผลชนิดนี้ก็คือ อายุการเก็บรักษาสั้น (ปฐพีชล และสรวิชาติ, 2531) อย่างไรก็ตามในเชิงการค้านิยมใช้รสชาติในการจำแนกออกจากกันโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (Subhadrabandhu, 2001) ได้แก่ กลุ่มมะปรางเปรี้ยว ผลให้รสชาติเปรี้ยวแม้แต่ผลสุกแล้วก็ตาม แม้แต่นกก็ยังต้องบินหนี ไม่นิยมปลูก พบได้ตามป่าและขึ้นเองตามสวน อย่างไรก็ตามมะปรางเปรี้ยวนิยมบริโภคแบบหมักดองกลุ่มมะปรางหวาน นิยมปลูกกันโดยทั่วไปมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจทั้งมีขนาด และรสชาติดี ในประเทศไทยรู้จักกันในชื่อ มะปราง โดยมีมะปรางสายพันธุ์ทำอิฐซึ่งเป็นที่นิยมและเป็นที่รู้จักกันราว 100 ปีแล้ว ซึ่งปลูกอยู่ที่จังหวัดนนทบุรี และในปัจจุบันก็ยังเป็นที่นิยม และกลุ่มมะยงชิด ซึ่งกลุ่มนี้จะมีความคล้ายกับมะปรางหวาน แต่แตกต่างกันที่รสชาติเนื่องจากมะยงชิดเมื่อผลสุกจะมีรสชาติหวานอมเปรี้ยว เนื่องจากมีกรดบางชนิด อีกทั้งยังมีขนาดผลที่ใหญ่ และเมล็ดเล็กกว่ามะปราง ในประเทศไทยเกษตรกรนิยมปลูกมะยงชิดมากกว่ามะปราง ซึ่งความแตกต่างระหว่างมะปรางกับมะยงชิดนั้น โดยมาการสันนิษฐานว่ามะปรางกับมะยงชิดนั้นเป็นพืชชนิดเดียวกัน แต่เนื่องจากการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดนั้นมักทำให้เกิดการกลายพันธุ์ไปจากเดิม ส่งผลให้ลักษณะที่

แสดงออกนั้นแตกต่าง ส่วนใหญ่จะจำแนกโดยใช้รสชาติ ร่วมกับขนาดของผลเป็นหลัก เนื่องจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางสัณฐานอื่นไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน โดยจะเปรียบเทียบมะปรางและมะยงชิดจาก ส่วนต่างๆ ดังรูปที่ 2.2 ก-ซ



รูปที่ 2.2 ลักษณะของต้นมะปราง (ก) ต้นมะยงชิด (ข) ใบมะปราง (ค) ใบมะยงชิด (ง) ลักษณะของ ดอกมะปราง (จ) ดอกมะยงชิด (ฉ) ผลมะปราง (ช) และผลมะยงชิด (ซ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ความหลากหลาย และเครื่องหมายทางโมเลกุล

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายของยีนที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมียีนแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ความแตกต่างทางพันธุกรรมมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งอาจเกิดในระดับยีนหรือโครโมโซมในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศอาศัยกลไกการการไขว้เปลี่ยน (crossing over) ทำให้ยีนเกิดการสลับที่หรือรวมตัวกันใหม่แล้วถูกถ่ายไปสู่รุ่นต่อไป ในประชากร อย่างไรก็ตามประชากรสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งจะรวมตัวเป็นกลุ่มและผสมพันธุ์กันภายในกลุ่มเผ่าพันธุ์ของตนทำให้เกิดการถ่ายยีนเกิดขึ้นเฉพาะภายในประชากรชนิดเดียวกันกลุ่มยีนของประชากรของสิ่งมีชีวิตเดียวกันเรียกว่า ยีนพูล (gene pool) การถ่ายยีนแต่ละรุ่นต้องประสบกับปัญหาเรื่องวิวัฒนาการ (evolutionary forces) เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพความผันแปรทางพันธุกรรม เป็นต้น ทำให้โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละรุ่นเปลี่ยนแปลงไปก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่างๆ ของชนิดนั้น ประชากรของชนิดนั้นอาจจะมีลักษณะจำเพาะ (speciation) ในแต่ละพื้นที่ซึ่งสาเหตุจากการโดดเดี่ยวทางภูมิศาสตร์ (geographic isolation) อันเกิดจากการแยกกลุ่มประชากร (splitting) ของสิ่งมีชีวิตโดยภูมิศาสตร์ซึ่งเป็นตัวสกัดกั้น (barrier) ทำให้สิ่งมีชีวิตมีการพัฒนาการที่เฉพาะตัวขึ้นมา เป็นชนิดใหม่โดยการผสมข้ามพันธุ์หรือผสมกันเองภายใต้ข้อจำกัดทางภูมิศาสตร์ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้น (March และ Grossa, 1996; Smith และ Smith, 1989; อ้างโดย ศานนท์, 2552) นอกจากนี้พบว่าลักษณะทางสัณฐานมักเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพภูมิอากาศ และสภาพแวดล้อมที่เพาะปลูก ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกยังไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับชื่อสายพันธุ์ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาเครื่องหมายหรือตัวบ่งชี้ชนิดอื่นมาประกอบ เพื่อช่วยในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้อง การนำเทคโนโลยีระดับโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอที่ศึกษากับสิ่งมีชีวิตอื่น ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึงแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตนั้นโดยเป็นที่รู้จักกันว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) (สุริพร, 2546)

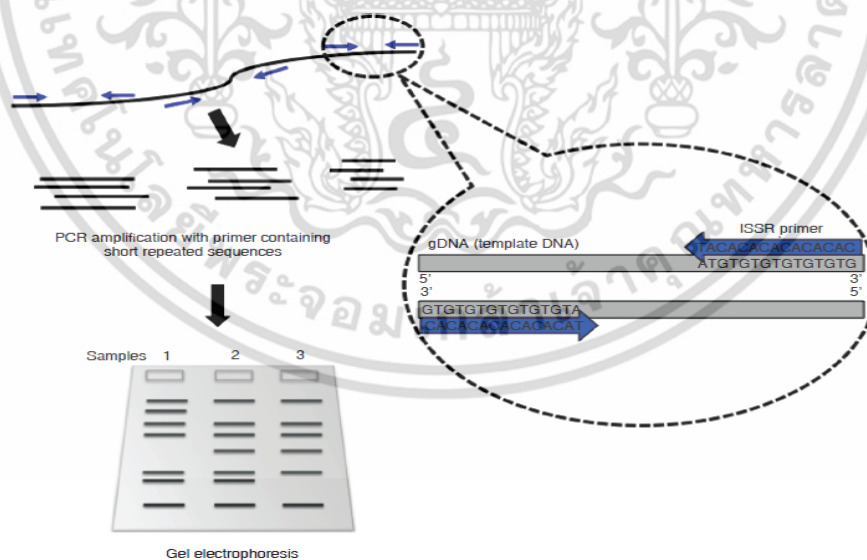
ตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่างๆ สำหรับกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ได้นำเอาลักษณะทางด้านกายวิภาคต่างๆ มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ให้สูงขึ้น (สุริพร, 2546) ประกอบด้วยลักษณะสัณฐานภายนอก (morphological markers) เป็นตัวบ่งชี้ที่ปรากฏโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตได้ เช่น ลักษณะความสูงของต้นพืชลักษณะสีของดอกหรือ ลักษณะความแตกต่างของใบ เป็นต้น และเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular markers) คือ การใช้โมเลกุลโปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอมาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่เราทำการศึกษา ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น ปัจจุบัน

การศึกษาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลนิยมใช้มากลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตมากกว่าวิธีอื่น ๆ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตและให้ผลการศึกษาไม่จำกัดใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการปรับปรุงพันธุ์พืชและคัดเลือกลักษณะของพันธุ์พืชเพื่อลดระยะเวลาในการทำงาน (สุจิตรา, 2551) ภาณี (2536) ใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีเพื่อแยกความแตกต่างของพืชสกุลกะหล่ำ (*Brassica*) ตรวจสอบความสัมพันธ์ของลูกผสมระหว่างชนิด และตรวจสอบความแตกต่างของลูกผสมกับสายพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่ พบว่าสามารถนำเครื่องหมายอาร์เอพีดีไปประยุกต์ใช้เพื่อลดระยะเวลาการทำงานทางด้านปรับปรุงสายพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายอาร์เอพีดียังไม่มี ความจำเพาะเนื่องจากการทดลองซ้ำแล้วผลที่ได้ไม่เหมือนเดิมในปัจจุบันมีเครื่องหมายระดับโมเลกุลมากมาย ซึ่งต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความคงตัวสูง ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในการศึกษาในระดับโมเลกุล จึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากมีความยุ่งยาก และซับซ้อนกว่าการสกัดดีเอ็นเอในจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ เพราะพืชมีผนังเซลล์ซึ่งเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ และมีสารทุติยภูมิเป็นองค์ประกอบ การปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในการสกัดดีเอ็นเอจะเป็นการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ได้ ทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพต่ำ นอกจากนี้ชนิดของพืชแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อไม่เหมือนกัน จึงต้องปรับวิธีการสกัดดีเอ็นเอให้เหมาะสมกับพืชที่ศึกษาเป็นกรณีไป (สุชาติดา, 2553) ดังนั้นจะยกตัวอย่างเครื่องหมายทางโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย ดังนี้

2.9/1 เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeats: ISSR)

ตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 แสดงหลักการพื้นฐานของไพรมเมอร์ในการเข้าจับด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

ที่มา : Ng และ Tan, 2015

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ปรับปรุงมาจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Bao และ Jonathan, 2002) ซึ่งรวมเอาข้อดีของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เอเอฟแอลพี และอาร์เอพีดีไว้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่โดยระบบอัตโนมัติ การตีพิมพ์ไม่ได้รับการรับรอง อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยกัน ไพรเมอร์มีลำดับซ้ำๆ แบบไมโครแซทเทลไลท์ โดยส่วนใหญ่จะมีความยาวประมาณ 16-25 นิวคลีโอไทด์ มีอยู่ 2 แบบ คือ แบบ unanchored (Gupta และคณะ, 1994; Myer และคณะ, 1993) เป็นไพรเมอร์ที่มีเฉพาะชุดลำดับเบสซ้ำๆ เช่น (GA)₈, (CGT)₄, (ATTA)₂, (CGTTG)₇ (Predeep และคณะ, 2002) เป็นต้น อีกแบบคือ anchored เป็นไพรเมอร์ที่ถูกเติมด้วยเบส 1-4 นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' เรียกว่า 3'-anchored เช่น (CTT)₇GC, (AG)₆AT หรือที่ปลาย 5' เรียกว่า 5'-anchored เช่น CA(CGTTG)₇, GC(ATA)₂ ซึ่งหากเติมเบสที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ จะทำให้เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอมากขึ้น และเกิดความแตกต่างมากขึ้นอีกด้วย (highly polymorphic) หากเติมเบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ จะทำให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดมีความคมชัดขึ้นเมื่อเทียบกับ 5'-anchored primer (Predeep และคณะ, 2002) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น เป็นเครื่องหมายที่มีความคล้ายคลึงกับเครื่องหมายอาร์เอพีดี แต่ใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่า จึงทำให้อุณหภูมิ annealing ที่ใช้สูงกว่าเพราะอุณหภูมิขึ้นอยู่กับจำนวน GC content ซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 45-65 องศาเซลเซียส (Predeep และคณะ, 2002) จึงมีความหลากหลายมากกว่า และมีความสามารถในการทำซ้ำดีกว่า (Fang และ Roose, 1997; Ge และ Sun, 1999; Ratnaparke และคณะ, 1998) นอกจากนี้ข้อดีของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ยังพบว่าไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษาก่อน ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีเพื่อติดฉลาก (probe) เกิดความแตกต่างสูง (Bao และ Jonathan, 2001) ใช้เวลาในการตรวจสอบผลสั้น สามารถตรวจสอบได้ทั้งอะกาโรสเจล และโพลีอะครีลาไมด์เจล และราคาถูก ซึ่งความสามารถของไอเอสเอสอาร์จะขึ้นอยู่กับความหลากหลาย และความถี่ของไมโครแซทเทลไลท์โดยจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของตัวอย่างที่จะศึกษา (Morgan และ Olivivieri, 1993; อ้างโดย อรรวรรณ, 2547) พบว่าการศึกษาความหลากหลายของพืชสกุลมะปรางมีเพียง Ghazali และคณะ (2015) ศึกษา Kundang (*Bouea macrophylla*) และ Remia (*Bouea oppositifolia*) ที่เก็บจากประเทศมาเลเซียแบ่งเป็น Kundang จำนวน 56 ตัวอย่าง และ Remia จำนวน 23 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Murray และ Thomson (1980) โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายโมเลกุล จากการเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 52 ไพรเมอร์ มีเพียง 10 ไพรเมอร์ ที่ให้ผลแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวนมาก ซึ่งจากตัวอย่าง Kundang จะให้ผลแถบดีเอ็นเอที่ให้โพลิมอร์ฟิก (polymorphic) จำนวน 45 แถบ คิดเป็นร้อยละ 50.2 เมื่อนำค่าตัวอย่างทั้งหมดมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนพบว่าอยู่ในช่วง 0.659-0.955 ในขณะที่ Remia จะให้ผลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวน 54 แถบ คิดเป็นร้อยละ 59.5 เมื่อนำค่าตัวอย่างทั้งหมดมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนพบว่าอยู่ในช่วง 0.591-0.977 ในขณะทำการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างของ Remia แยกออกเป็น 2 กลุ่ม และ Kundang แยกออกเป็น 3 กลุ่ม นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์กับพืชชนิดอื่นๆ อีก เช่น ยศินทร์ และปรียา (2550) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) จำนวน 13 สายพันธุ์ในประเทศไทย แบ่งเป็น 6 สายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์การค้า โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ชนิด พบว่าจากไพรเมอร์ 5 ชนิด ที่เลือกใช้สามารถสังเคราะห์ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,112 แถบ โดยมีแถบที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 789 แถบ (70.95%) และนอกจากนี้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.608-0.879 ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของยางพาราสายพันธุ์ที่ศึกษาได้

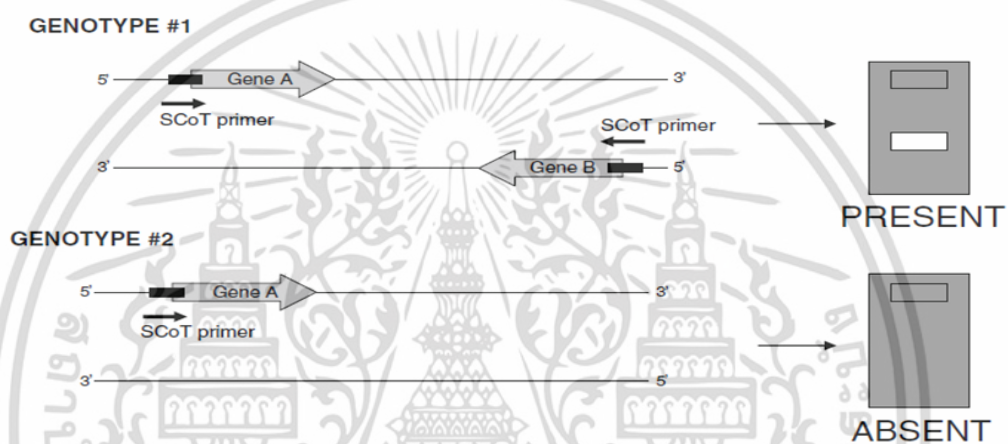
2.๑๕ เครื่องหมายไอพีบีเอส (inter-primer binding sites: iPBS)

เครื่องหมายไอพีบีเอส (inter primer binding sites: iPBS) เป็นเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลรูปแบบใหม่พัฒนาขึ้นโดย Kalendar และคณะ (2010) อาศัยหลักการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากการใช้รูปแบบของไพรเมอร์ที่มีขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์บริเวณ tRNA เข้าไปสุมจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของ long terminal repeat (LTR) บริเวณ retrotransposon ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอมักเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่ายพบในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชแทบทุกชนิดดังนั้นข้อดีของเครื่องหมายนี้คือผู้วิจัยไม่จำเป็นต้องทราบเกี่ยวกับข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อนทำได้ง่ายไม่ซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายในการทำน้อย และใช้ปริมาณของดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง (Kalendar และคณะ, 2010) พบว่า Mehmood และคณะ (2015) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) วิเคราะห์โดยไอพีบีเอสและเอสเอสอาร์ จากตัวอย่าง 70 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ไอพีบีเอส จำนวน 6 ไพรเมอร์ พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ ความแตกต่างทั้งหมด 97 แถบคิดเป็นร้อยละ 96.63 เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งเครื่องหมาย ไอพีบีเอสและเอสเอสอาร์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างทั้งหมด 70 ตัวอย่าง และสามารถแยก ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมออกจากแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ได้ โดยเฉพาะ ประเทศปากีสถาน เม็กซิโก ฮาวาย และอินเดีย

2.๑๖ เครื่องหมายเอสซีโอที (Start codon targeted : SCoT)

เครื่องหมายเอสซีโอที (Start codon targeted: SCoT) เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลถูกพัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์เพียงเส้นเดียว โดยไพรเมอร์นั้นเป็นได้ทั้งไพรเมอร์เริ่มต้น (forward primer) และไพรเมอร์ตาม (reverse primer) จะเข้าไปสุมจับกับดีเอ็นเอบริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) การที่ไพรเมอร์นั้นจะจับกับโปรโมเตอร์ได้นั้นจะต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG ประกอบอยู่ในไพรเมอร์ดังรูป 2.4 พบว่าในหนึ่งไพรเมอร์จะประกอบด้วยลำดับเบสที่จำเพาะ คือ ATG ที่ตำแหน่ง +1 +2 และ +3 ตามลำดับ เบส G ที่ตำแหน่ง +4 เบส C ที่ตำแหน่ง +5 และเบส ACC ที่ตำแหน่ง +7 +8 และ +9 ตามลำดับ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเครื่องหมายที่ปฏิบัติการได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น universal primer ผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือ เกิดโพลิมอร์ฟิก (polymorphic) และมีประสิทธิภาพ ต่อการระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้ (Collard และ Mackill, 2009) พบว่ากรองทอง และคณะ (2556) ได้ศึกษาต้นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รักแกนมอ (*Rhus succedanea* L.) จำนวน 96 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายเอสซีไอทีที่พบไพโรมอร์ที่มีความเหมาะสมจำนวน 5 ไพโรมอร์ คือ SCoT46, SCoT47, SCoT48, SCoT52 และ SCoT55 สามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 36 แถบมีขนาดอยู่ในช่วง 800-3,000 คู่เบส โดย 34 แถบเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้โพลิมอร์ฟิกคิดเป็นร้อยละ 94.44 เมื่อนำค่าทั้งหมดจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic average พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่คำนวณด้วยสูตรของ Jaccard อยู่ในช่วง 0.130-0.923 สามารถแบ่งตัวอย่างต้นรักแกนมอที่ทำการศึกษาออกเป็น 10 กลุ่ม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างต้นรักแกนมอมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมในประเทศไทยได้



รูปที่ 2.4 ลักษณะการเข้าจับของไพโรมอร์เอสซีไอที

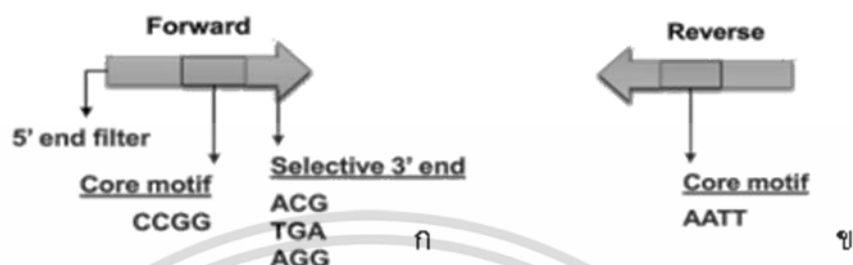
ที่มา : Collard และ Mackill, 2009

2.3.4 เครื่องหมายเอสอาร์เอพี (Sequence-related amplified polymorphism: SRAP)

เครื่องหมายเอสอาร์เอพี (Sequence-related amplified polymorphism: SRAP) เป็นเครื่องหมายหนึ่งที่น่าเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ ซึ่งเครื่องหมายนี้ถูกคิดค้น และพัฒนาโดย Li และ Quiros (2001) จะออกแบบไพโรมอร์สองชนิดคือ forward มีขนาด 17 เบส ส่วน reverse มีขนาด 18 เบส ไพโรมอร์ชนิด forward ประกอบด้วยลำดับเบสแกนที่เหมือนกันยาว 14 เบส ซึ่งเป็นส่วนของลำดับเบสแบบสุ่มเรียกว่า filler ยาว 10 เบสต่อด้วยเบส CCGG (รูปที่ 2.5 ก) เพื่อจับได้กับส่วน exon หรือ ORF ซึ่งมักเป็นบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบสเป็น GC สูงตรงปลาย 3' ของไพโรมอร์เป็นเบสคัดเลือก (selective base) อีก 3 เบสที่เปลี่ยนแปลงได้ เช่น 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3' ส่วนไพโรมอร์ชนิด reverse ประกอบด้วยลำดับเบสแกนที่เหมือนกันยาว 15 เบสเป็นส่วนของ filler ยาว 11 เบส (ต่างจากลำดับเบสของไพโรมอร์ชนิด forward) ต่อด้วยเบส AATT (รูปที่ 2.5 ข) เพื่อใช้จับกับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณ AT สูงซึ่งมักพบในส่วน intron และโปรโมเตอร์ของยีนตรงปลาย 3' ของไพโรมอร์เป็นเบสคัดเลือกที่เปลี่ยนแปลงได้อีก 3 เบส เช่น 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3' จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ของเอกสารนี้ กรุณาแจ้งให้เจ้าของเอกสารทราบเพื่อที่จะสามารถนำเอกสารนี้ไปใช้

ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ทำให้ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในจีโนมมีแนวโน้มเป็นส่วนที่ยีนมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มชนิดอื่น ข้อดีของเครื่องหมายเอสอาร์เอพี คือ ทำได้ง่าย และรวดเร็วไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา และเป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายถูกและรวดเร็ว (สุรินทร์, 2552; Li และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของไพรเมอร์ forward (ก) และไพรเมอร์ reverse (ข) ของเทคนิคเอสอาร์เอพี
ที่มา : ดัดแปลงรูปจาก Poczai และคณะ, 2013

ปณาลี และคณะ (2551) ศึกษาพืชทอง (*Cucurbita moschata* Decne.) พันธุ์การค้า 11 สายพันธุ์ และพืชทองพันธุ์พื้นเมือง 2 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชทองดังกล่าวด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและลักษณะคุณภาพผล คือ เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายน้ำได้ น้ำหนักแห้ง และค่าสีเนื้อผลด้วยวิธี Hunter System พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 43 แถบ จาก 8 คู่ไพรเมอร์ มีค่า Dice similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.425-0.925 จากการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มพืชทองทั้ง 13 สายพันธุ์ได้ 3 กลุ่ม และพืชทองญี่ปุ่น ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มใด พืชทองลูกผสมที่นำมาทดสอบถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และจัดอยู่ต่างกลุ่มกับพันธุ์ผสม เมื่อนำลักษณะคุณภาพผลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Principal Component Analysis พบว่า PC1 และ PC2 อธิบายผลความสัมพันธ์ได้ทั้งหมด 82.88 %

โองการ และเฟื่องฟ้า (2557) ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis* Gamble) โดยประยุกต์ใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพีและไอพีบีเอส พบว่าเครื่องหมายเอสอาร์เอพี และไอพีบีเอส สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในพืชวงศ์ไผ่ได้และเหมาะที่จะนำไปศึกษาพืชวงศ์ไผ่ต่อไปในอนาคต เนื่องจากทำการทดลองได้ง่ายให้รูปแบบแถบของดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูงและราคาไม่สูงเมื่อเทียบกับเครื่องหมายอื่นๆ

Kaur และคณะ (2004) ใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพีในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Brassica rapa* จำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งมีความทนทานต่อธาตุโบรอนแตกต่างกัน โบรอนเป็นธาตุอาหารรอง (micro nutrient) ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชถ้ามีมากเกินไปจะเป็นพิษต่อพืช ได้จากการศึกษาตัวอย่าง *B. rapa* ที่มีความทนทานต่อธาตุโบรอนพบว่ามีกลไกการกำจัดธาตุโบรอนส่วนเกินออกจากรากส่วนพันธุ์ที่ไม่ต้านทาน ไม่สามารถกำจัดธาตุโบรอนได้หรือกำจัดได้น้อย เมื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพี พบว่าจากการเพิ่มไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 15 คู่ มีไพรเมอร์ 14 คู่ ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 128 แถบ เมื่อนำข้อมูลมาสร้าง phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่ม *B. rapa* พันธุ์ที่มีความต้านทานและไม่ต้านทานต่อธาตุโบรอนออกจากกันได้ ทำให้สามารถคัดเลือกคู่ผสมของพ่อแม่เพื่อสร้างประชากรที่ใช้สำหรับทำแผนที่ยีนที่ต้านทานต่อธาตุโบรอนต่อไป

Talebi และคณะ (2012) ศึกษาถั่วพิตาศี (Pistacia) จำนวน 36 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Anacardiaceae จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพีจำนวน 11 คู่ไพรเมอร์ พบจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 202 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอที่ให้โพลิมอร์ฟิกจำนวน 168 แถบ คิดเป็นร้อยละ 83 พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมสายพันธุ์ *P. vera* แยกออกจากสายพันธุ์ป่า *P. vera* (Sarakh) สามารถสันนิษฐานได้ว่าลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ *P. vera* พัฒนามาจากสายพันธุ์ป่า *P. vera* (Sarakh)

Zhao และคณะ (2009) นำเครื่องหมายเอสอาร์เอพีมาใช้ในการระบุสายพันธุ์ของหม่อน (*Morus Lin.*) 23 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอที่มีความต่างกัน 59 แถบจากทั้งหมด 83 แถบคิดเป็นร้อยละ 71.1 เฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ประมาณ 4.9 และจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6.9 ต่อไพรเมอร์ หมายความว่าความหลากหลายของยีน และค่า PIC (Polymorphism Information Content) อยู่ที่ 0.1611 และ 0.1353 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.6905-0.9524 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.8330 และสามารถจัดกลุ่มของหม่อนได้ 3 กลุ่ม คือ Yaosang เป็นกลุ่มที่ 1 Lijiangshansang เป็นกลุ่มที่ 2 ทั้งสองกลุ่มนี้จัดเป็นกลุ่มอิสระ และหม่อนพันธุ์อื่นๆ จัดเป็นกลุ่มที่ 3

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา

เก็บตัวอย่างใบมะพร้าวและมะยมชนิด ที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็นมะพร้าว 18 ตัวอย่าง โดยให้รหัสเป็น MP และมะยมชนิด 12 ตัวอย่าง มีรหัสเป็น MY โดยเก็บตัวอย่างจากภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครนายก จังหวัดอยุธยา จังหวัดปราจีนบุรี และจังหวัดลพบุรี จัดเป็นกลุ่มประชากรที่ 1 (population 1: pop1) และภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดสุโขทัย จังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดกำแพงเพชร จัดเป็นกลุ่มประชากรที่ 2 (population: pop2) (ตารางที่ 3.1) ซึ่งตัวอย่างส่วนใหญ่ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนนพรัตน์ โดย ร.ต.ต.อำนาจ หงส์ทอง และเจ้าของสวนวิจิตรการเกษตร โดยคุณวิจิต ไกรสรสวัสดิ์ นำตัวอย่างใส่ลงในถุงซิปล็อก (zip lock) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาศึกษา

ตารางที่ 3.1 ลำดับ ชื่อสายพันธุ์ รหัสตัวอย่าง และแหล่งที่เก็บ

Number	Name	Variety	Code	Population	Province
1	มะพร้าว	แม่อนงค์	MP01	pop1	นครนายก
2	มะพร้าว	ทองนพรัตน์	MP02	pop1	นครนายก
3	มะพร้าว	ทองใหญ่	MP03	pop1	นครนายก
4	มะพร้าว	ทองนพรัตน์	MP04	Pop1	นครนายก
5	มะพร้าว	สุวรรณบาท	MP05	pop1	นครนายก
6	มะพร้าว	Unknown	MP06	pop1	นครนายก
7	มะพร้าว	Unknown	MP07	pop1	นครนายก
8	มะพร้าว	หวานใหญ่	MP08	pop2	เพชรบูรณ์
9	มะพร้าว	หวานกลม	MP09	pop2	เพชรบูรณ์
10	มะพร้าว	ปะทุมทอง	MP10	pop2	สุโขทัย
11	มะพร้าว	รุ่งอรุณ	MP11	pop1	ปราจีนบุรี
12	มะพร้าว	เพชรหลาวยาว	MP12	pop2	กำแพงเพชร
13	มะพร้าว	หวานกลม	MP13	pop2	กำแพงเพชร
14	มะพร้าว	พวง	MP14	pop2	เพชรบูรณ์
15	มะพร้าว	เพชรนพเกล้า	MP15	pop2	กำแพงเพชร
16	มะพร้าว	คลองลาน	MP16	pop2	กำแพงเพชร
17	มะพร้าว	ใหญ่	MP17	pop2	กำแพงเพชร
18	มะพร้าว	ท้องถิ่น	MP18	pop1	อยุธยา

ตารางที่ 3.1 ลำดับ ชื่อสายพันธุ์ รหัสตัวอย่าง และแหล่งที่เก็บ (ต่อ)

Number	Name	Variety	Code	Population	Province
19	มะยงชิด	สวนหวาน	MY01	pop1	นครนายก
20	มะยงชิด	ชิดสง่า	MY02	pop1	นครนายก
21	มะยงชิด	ทูลเกล้า	MY03	pop1	นครนายก
22	มะยงชิด	บางขุนนนท์	MY04	pop1	นครนายก
23	มะยงชิด	ทูลถวาย	MY05	pop1	นครนายก
24	มะยงชิด	Unknown	MY06	pop1	นครนายก
25	มะยงชิด	ทูลเกล้า	MY07	pop1	ลพบุรี
26	มะยงชิด	เหนือสยาม	MY08	pop2	สุโขทัย
27	มะยงชิด	แม่ย่า	MY09	pop2	สุโขทัย
28	มะยงชิด	บางขุนนนท์	MY10	pop2	กำแพงเพชร
29	มะยงชิด	เพชรกลางดง	MY11	pop2	กำแพงเพชร
30	มะยงชิด	เพชรคลองลาน	MY12	pop2	กำแพงเพชร

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้แรงดันไอน้ำ (autoclave)
- 3.2.2 ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)
- 3.2.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.2.4 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 3.2.5 เครื่องฆ่าเชื้อลมร้อน (hot air oven)
- 3.2.6 เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง (balance)
- 3.2.7 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis equipment)
- 3.2.8 กระจกบอทวง (cylinder) ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.2.9 ขวดแก้วบรรจุสาร (duran) ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.2.10 หลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2.11 ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette)
- 3.2.12 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (nano drop); Thermo 2000C
- 3.2.13 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.2.14 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction Machine); Thermo Scientific hybaid PX2 thermal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB

- 3.3.1 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)
- 3.3.2 EDTA (ethylenediamine tetracetate)
- 3.3.3 β -mercaptoethanol
- 3.3.4 Absolute ethanol
- 3.3.5 Tris-HCl
- 3.3.6 Liquid Nitrogen
- 3.3.7 Phenol
- 3.3.8 Chloroform
- 3.3.9 Isoamyl alcohol
- 3.3.10 RNase A (Geneaid)
- 3.3.11 NaCl
- 3.3.12 Deionized water

3.4 สารเคมีที่ใช้ในเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

- 3.4.1 PCR buffer ความเข้มข้น 10X
- 3.4.2 $MgCl_2$
- 3.4.3 dNTPs (deoxynucleotides triphosphate)
- 3.4.4 ISSR primer แสดงดังตารางที่ 3.3
- 3.4.5 iPBS primer แสดงดังตารางที่ 3.5
- 3.4.6 SCoT primer แสดงดังตารางที่ 3.6
- 3.4.7 SRAP primer แสดงดังตารางที่ 3.9
- 3.4.8 *Taq* DNA polymerase (Geneaid)

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.5.1 Tris-borate-EDTA (TBE buffer) ความเข้มข้น 10X
- 3.5.2 อะกาโรสเจล (Agarose gel)
- 3.5.3 สีย้อมเจล (Radsafe)
- 3.5.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker 100 bp plus DNA Ladder); Vivantis
- 3.5.5 Dye ความเข้มข้น 3X

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของโองการ (2555) โดยมีวิธีการดังนี้ นำเนื้อเยื่อส่วนใบพืชของตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกรงบด เติมนิโตรเจนเหลวแล้วบดจนกระทั่งใบละเอียด จากนั้นเติม CTAB ที่มี 10% β -mercaptoethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บดต่อจนสารเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายตัวอย่างที่บดได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 60 นาที และกลับหลอดทุก 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้นำมาเติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างระมัดระวัง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในขณะที่ดูดควรระวังไม่ให้ดูดส่วนที่เป็นเศษเซลล์มา จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติมน้ำ Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างระมัดระวัง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในขณะที่ดูดควรระวังไม่ให้ดูดส่วนที่เป็นเศษเซลล์มา ในขั้นตอนนี้อาจยังพบว่าสารละลายส่วนใสที่ดูดมาได้ยังไม่ใสให้ทำซ้ำขั้นตอน Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1) อีก 1 รอบ เมื่อได้สารละลายที่ใสแล้วนำมาเติม Isopropanol กับสารละลายส่วนใสในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสออก ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็น Ethanol ออก เติมน้ำ Absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็น Ethanol ออก นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ Ethanol ระเหย แล้วจึงละลายดีเอ็นเอด้วย Deionized water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยจะตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอก่อนการใช้งาน ซึ่งทำได้ดังนี้

3.6.1.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอมา 5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 495 ไมโครลิตร (ในอัตรา 1:100) ลงในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่คิวเวตต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นค่ามาตรฐาน (Blank) โดยวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรซึ่งใช้สำหรับการ

คำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (สุชาติ, 2553) ได้จากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{OD ratio} = \text{A260}/\text{A280}$$

เมื่อ A260 = ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ, A280 = ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน

3.6.1.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟโตรีซิส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 3X Dry ในปริมาณ 3 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นบนอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-borate EDTA (1X TBE buffer) ที่กระแสไฟฟ้า 170 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมสีเจลได้ด้วย redsafe ซึ่งได้ทำการผสมสีย้อมด้วยในขั้นตอนการเตรียมอะกาโรสเจล โดยเติม redsafe 0.05 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (ผสมในขณะที่สารละลายเจลมีอุณหภูมิที่มีมือสามารถจับได้ด้วยมือเปล่า) และนำไปวิเคราะห์ภาพเจลด้วย Gel documentary system

3.6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร (ตารางที่ 3.2) โดยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ (Gonzalez และคณะ, 2002; Vanijajiva, 2012) (ตารางที่ 3.3) แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer และ Spin down จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบตามตารางที่ 3.4 (Vanijajiva, 2012)

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

ไอพีบีเอส และเอสซีไอที (Collard และ Mackill, 2009; โองการ และเพ็ญฟ้า, 2557)

Solution	Initial concentrate	Volume	Final concentrate
PCR buffer	10X	2.5	1X
MgCl ₂	25 mM	5	5 mM
dNTP	1.25 mM	4	200 μM
Primer	50 pmol/μl	2	4 μM
DNA template	50 ng	2	100 ng
Taq DNA polymerase	5,000 unit/ml	0.5	2.5 unit
DI water		9 μl	
Total		25 μl	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (Gonzalez และคณะ, 2002; Vanijajiva, 2012)

Primer	Nucleotide (5'-3')	Primer	Nucleotide (5'-3')
UBC801	(AT) ₈ T	UBC824	(CT) ₇ CCG
UBC807	(AG) ₇ GT	UBC825	(AC) ₇ T
UBC810	(GA) ₈ T	UBC826	(AC) ₈ A
UBC811	(GA) ₈ C	UBC827	(AC) ₈ G
UBC813	(CT) ₈ T	UBC861	(ACC) ₆
UBC815	(CT) ₈ G	UBC863	(AGT) ₆
UBC817	(CA) ₈ A	UBC868	(GAA) ₆
UBC819	(GT) ₈ A	UBC870	(TGC) ₆
UBC820	(GT) ₈ C	UBC873	(GACA) ₄
UBC822	(TC) ₈ A	UBC881	GGG(TGGGG) ₂ TG

ตารางที่ 3.4 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (Vanijajiva, 2012)

Step	Temperature	Time	Cycle
Initiation denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	40 วินาที	
Annealing	50 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที 30 วินาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	8 นาที	1 รอบ

3.6.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคเครื่องหมายไอพีบีเอส และเอสซีไอที

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส และเอสซีไอที โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.2 โดยเครื่องหมายไอพีบีเอสใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ (Kalendar และคณะ, 2010) (ตารางที่ 3.5) และเครื่องหมายเอสซีไอทีใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ (Collard และ Mackill, 2009) (ตารางที่ 3.6) แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer และ Spin down จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบตามตารางที่ 3.7 (โองการ และเฟื่องฟ้า, 2557)

ตารางที่ 3.5 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายไอพีบีเอส

(Kalendar และคณะ, 2010)

Primer	Nucleotide (5'-3')	Primer	Nucleotide (5'-3')
2076	GCTCCGATGCCA	2295	AGAACGGCTCTGATACCA
2077	CTCACGATGCCA	2374	CCCAGCAAACCA
2079	AGGTGGGCGCCA	2378	GGTCCTCATCCA
2080	CAGACGGCGCCA	2380	CAACCTGATCCA
2081	GCAACGGCGCCA	2382	TGTTGGCTTCCA
2083	CCTCTAGCGCCA	2389	ACATCCTTCCCA
2085	ATGCCGATACCA	2391	ATCTGTCAGCCA
2251	GAACAGGCGATGATACCA	2392	TAGATGGTGCCA
2252	TCATGGCTCATGATACCA	2393	TACGGTACGCCA
2253	TCGAGGCTCTAGATACCA	2394	GAGCCTAGGCCA
2256	GACCTAGCTCTAATACCA	2398	GAACCCTTGCCGATACCA
2272	GGCTCAGATGCCA	2400	CCCCTCCTTCTAGCGCCA
2273	GCTCATCATGCCA	2401	AGTTAAGCTTTGATACCA
2277	GGCGATGATACCA	2402	CTCAAGCTCTTGATACCA
2279	AATGAAAGCACCA	2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA

ตารางที่ 3.6 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเอสซีไอที

(Collard และ Mackill, 2009)

Primer	Nucleotide (5'-3')	Primer	Nucleotide (5'-3')
SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA	SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC
SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC	SCoT17	ACCATGGCTACCACCGAG
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC
SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT	SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	SCoT21	ACGACATGGCGACCCACA
SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG	SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	SCoT23	CACCATGGCTACCACCAG
SCoT9	CAACAATGGCTACCAGCA	SCoT24	CACCATGGCTACCACCAT
SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC	SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG
SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA	SCoT26	ACCATGGCTACCACCGTC
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	SCoT27	ACCATGGCTACCACCGTG

ตารางที่ 3.6 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเอสซีไอที

(Collard และ Mackill, 2009) (ต่อ)

Primer	Nucleotide (5'-3')	Primer	Nucleotide (5'-3')
SCoT13	ACGACATGCGACCATCG	SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA
SCoT14	ACGACATGCGACCACGC	SCoT29	CCATGGCTACCACCGGCC
SCoT15	ACGACATGCGACCGCGA	SCoT30	CCATGGCTACCACCGGCG

ตารางที่ 3.7 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเครื่องหมายไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอที

Step	Temperature	Time	Cycle
Initiation denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที 30 วินาที	
Annealing	35 องศาเซลเซียส	1 นาที	5 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที 30 วินาที	
Annealing	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	30 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	8 นาที	1 รอบ

3.6.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายเอสอาร์เอที

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณโดยเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอที โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร (ตารางที่ 3.8) โดยเทคนิคเอสอาร์เอทีใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.9) แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer และ Spin down จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ดังตารางที่ 3.7 (โองการ และเพ็ญฟ้า, 2557)

ตารางที่ 3.8 ส่วนประกอบสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี
(Li และ Quiros, 2001)

Solution	Initial concentrate	Volume	Final concentrate
PCR buffer	10X	2.5	1X
MgCl ₂	25 mM	5	5 mM
dNTP	1.25 mM	4	200 µM
Forward Primer	50 pmol/µl	2	4 µM
Reward Primer	50 pmol/µl	2	4 µM
DNA template	50 ng	2	100 ng
Taq DNA polymerase	5,000 unit/ml	0.5	2.5 unit
DI water		7 µl	
Total		25 µl	

ตารางที่ 3.9 ชนิดของไพรเมอร์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเอสอาร์เอพี
(Li และ Quiros, 2001)

Forward primer	Nucleotide (5'-3')	Reverse primer	Nucleotide (5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TAGGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
		Em6	GACTGCGTACGAATTGCA

จากตารางที่ 3.9 จากไพรเมอร์ forward จำนวน 5 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ reverse จำนวน 6 ไพรเมอร์ สามารถจับคู่ไพรเมอร์เพื่อใช้ในปฏิกิริยาได้จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ (Li และ Quiros, 2001)

3.6.5 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูล

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะตรวจผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมกับ dry (3X) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 100 bp plus Ladder จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลจากเครื่องหมายต่างๆ และแปลผลแถบดีเอ็นเอที่เอกสารนี้เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์ โดยการให้คะแนนแบบ Binary โดยคะแนนที่ให้เป็น 1 ในกรณีที่ได้บ้างไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอปรากฏ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง นำคะแนนที่ได้เรียงต่อกันแล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การคำนวณสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) (Nei and Li, 1979) ของแต่ละชนิดเครื่องหมายโมเลกุลในแบบวิเคราะห์ร่วมกัน โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์มาตรฐานของไดซ์ (Dice coefficient) (Dice, 1945) [$D = 2M / (2M+N)$] ด้วยโปรแกรม Past version 3 นำค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงมาสร้างกลุ่มความสัมพันธ์ (Principal Coordinates Analysis: PCoA) และสายสัมพันธ์แบบ neighbor joining (NJ)

การประเมินโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร (K) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โครงสร้างของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาจะใช้วิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ (Bayesian) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE v.2.3 (Pritchard และคณะ, 2000) โดยจะคำนวณค่าของ K ตั้งแต่ 1-10 จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่า K แล้วจึงวิเคราะห์โดยโปรแกรม CLUMPP version 1.1.2 (CLUster Matching and Permutation Program) เพื่อวิเคราะห์หาค่า K ที่เหมาะสมกับมาสร้างรูปแบบของกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมจากกลุ่มตัวอย่างต่อไป (Earl และ Vonholdt, 2012)

ข้อมูลที่ได้จากการให้คะแนนแบบ Binary ของแต่ละเครื่องหมายทางโมเลกุลจะถูกนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายสำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh และคณะ, 1999) เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรของตัวอย่าง ประกอบด้วย ค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งของโพลิมอร์ฟิก (percentage of polymorphic fragments: PPF) จำนวนแอลลีล (observed number of allele: N_A) จำนวนเอ็ฟเพ็คทีฟแอลลีล (effective number of allele: N_E) ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมของชานอน (Shannon index; H_0) ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมรวม (expected heterozygosity: H_E) วิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร ค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่างของยีน (coefficient of gene differentiation: G_{ST}) ใช้วัดความเบี่ยงเบนระหว่างประชากรย่อยเปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด ความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยเกิดจากความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากรย่อย การแบ่งประชากรใหญ่ให้เป็นประชากรย่อยมักจะทำให้ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity) ลดลง ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (G_{ST}) จึงมักมีค่าเป็นบวกระหว่าง 0-1

จากการศึกษาโครงสร้างประชากรโดยค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (G_{ST}) โดย Wright (1978) ได้ให้ความหมายของค่า G_{ST} ในแต่ละช่วงดังนี้

ค่าระหว่าง 0.00-0.05 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย

ค่าระหว่าง 0.05-0.15 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง

ค่าระหว่าง 0.15-0.25 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก

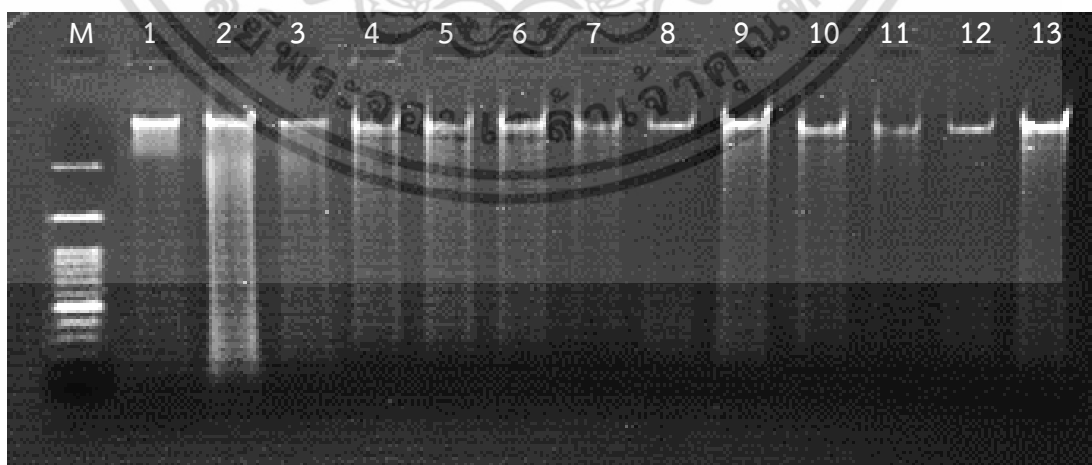
ค่า 0.25 ขึ้นไป แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมะพร้าว

การศึกษาครั้งนี้ใช้การสกัดดีเอ็นเอโดยการประยุกต์ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอตามโองการ (2555) โดยดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) ใช้สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอที่มีส่วนผสมของ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และมี ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารสารคีเลต (chelating agent) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโลหะถูกจับอยู่ในโมเลกุลไม่เปิดโอกาสให้ประจุลบจากที่อื่นเข้าทำปฏิกิริยาได้ ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสารสี ทั้งสีที่มีตามธรรมชาติ เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นต้น นอกจากนี้ในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอยังเติม β -mercaptoethanol ลงไปเพื่อป้องกันการออกซิเดชันของโพลีฟีนอล (polyphenols) ไปเป็นสารประกอบควิโนน (quinone) ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอเป็นสีน้ำตาลเสียหายได้ ซึ่งมักพบในพืชเขตร้อน เช่นเดียวกับมะพร้าวที่พบว่าเบื่องต้นดีเอ็นเอที่ได้มักมีสีเขียวเข้มจนถึงน้ำตาล (Agrawal และคณะ, 1992) แต่จากการประยุกต์ใช้เทคนิคเบื่องต้นพบว่าดีเอ็นเอทั้ง 30 ตัวอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในใบอ่อนพบว่าได้ปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่ (Yun-jiang และคณะ, 2003) รวมทั้งใช้เวลาในการสกัดน้อย สามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง เมื่อวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.1 รวมถึงวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (ตารางภาคผนวกที่ 1)



รูปที่ 4.1 รูปถ่ายตัวอย่างดีเอ็นเอมะพร้าวจำนวน 13 ตัวอย่าง ที่สกัดด้วยวิธี CTAB บนแผ่นอะกาโรส

ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เทียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปรางด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

4.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

จากการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) กับมะปรางจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ มะปราง 1 ตัวอย่าง (MP02) และมะยงชิด 1 ตัวอย่าง (MY01) พบว่ามี 12 ไพรเมอร์ (UBC807, UBC810, UBC811, UBC815, UBC817, UBC819, UBC822, UBC824, UBC825, UBC826, UBC827 และ UBC873) ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอได้ แต่ในการทดลองจะเลือกไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอคมชัด ทำซ้ำได้ผลเช่นเดิม รวมไปถึงเกิดแถบจำเพาะในการจัดจำแนกตัวอย่างได้ จาก 12 ไพรเมอร์ เลือกใช้เพียง 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC807, UBC810, UBC811, UBC817, UBC827 และ UBC873 จากนั้นจึงนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จำนวน 6 ไพรเมอร์มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง ได้แก่ มะปราง 18 ตัวอย่าง และมะยงชิด 12 ตัวอย่าง

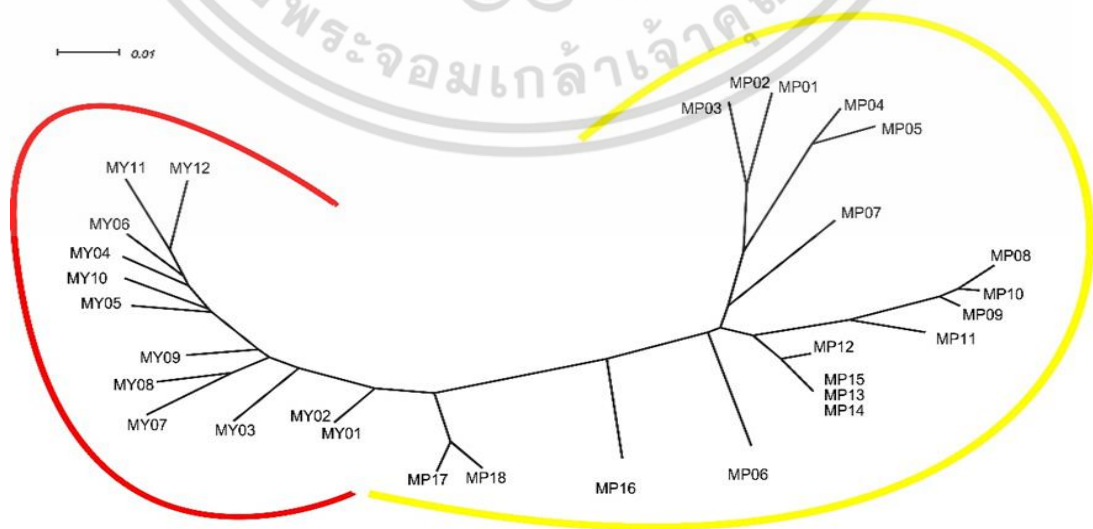
เมื่อนำผลการทดลองจากตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ จำนวน 88 แถบ จาก 6 ไพรเมอร์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูล การคำนวณสัมประสิทธิ์ความคล้าย (similarity coefficient) (Nei และ Li, 1979) ของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์มาตรฐานของไดซ์ (Dice coefficient) (Dice, 1945) พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ มีสัมประสิทธิ์ความคล้ายอยู่ในช่วง 0.814-1.000 (ตารางภาคผนวกที่ 2) โดยตัวอย่างที่มีความเหมือนกันมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MP01 กับ MP02, MP13 กับ MP14, MP13 กับ MP15 และ MP14 กับ MP15 และตัวอย่างที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MP04 กับ MY08 จากนั้นนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมาสร้างกลุ่มความสัมพันธ์ PCoA (Principal Coordinates Analysis) ด้วยโปรแกรม Past version 3 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาสามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังรูปที่ 4.2 สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์โดยวิธี NJ (Neighbor joining) ในรูปที่ 4.3 พบว่ากลุ่มของตัวอย่างในการศึกษาสามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยมะปราง จำนวน 16 ตัวอย่าง และกลุ่มที่สอง ประกอบด้วยมะยงชิด 12 ตัวอย่าง โดยมีมะปราง จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ MP17 (พันธุ์ใหญ่) และ MP18 (พันธุ์ทองถิ่น) เข้าไปใกล้ชิดกับกลุ่มมะยงชิดมากที่สุด เมื่อดูจากรหัสตัวอย่างพบว่าตัวอย่างรหัส MP18 เป็นมะปรางพันธุ์ทองถิ่นที่มีอายุมากกว่าร้อยปี ได้กระจายตัวไปอยู่ในกลุ่มตัวอย่างของมะยงชิด ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ามะปรางรหัส MP18 จะเกิดการกลายพันธุ์ และพบว่ามะปรางรหัส MP17 มีความใกล้ชิดกับ MP18

สันนิษฐานว่าอาจเป็นเครือญาติกัน หรือมีแนวโน้มที่จะเป็นต้นพันธุ์เดียวกัน เมื่อสังเกตตัวอย่างรหัส MP13 (พันธุ์หวานกลม) MP14 (พันธุ์พวง) และ MP15 (พันธุ์เพชรนพเกล้า) นั้นมีความใกล้ชิดกัน อาจจะเป็นต้นพันธุ์เดี่ยว ส่วนตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์คือ MP06, MP07 และ MY06 มีแนวโน้มที่จะเป็นชนิดพันธุ์อื่น เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวไม่มีสายสัมพันธ์กับพันธุ์ใด ยกเว้น MY06 อาจจะเป็นสายพันธุ์กลายระหว่าง MY04 (พันธุ์บางขุนนนท์) กับ MY11 (พันธุ์เพชรกลางดง) ในขณะที่ตัวอย่าง

(MP01) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นชนิดพันธุ์เดียวกันมากกว่า MP02 กับ MP04 ในตัวอย่าง MP09 กับ MP13 เป็นตัวอย่างพันธุ์หวานกลมที่เก็บต่างจังหวัดกัน ผลแสดงให้เห็นว่า MP13 อาจจะเป็นพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่พันธุ์หวานกลม เช่นเดียวกับกับตัวอย่าง MY03 กับ MY07 ที่เป็นตัวอย่างจากพันธุ์ทุลเกล้าแตกต่างกันที่จังหวัด พบว่าอาจเกิดการกลายพันธุ์ทำให้ตัวอย่างแยกออกจากกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ที่ทำให้โครงสร้างทางพันธุกรรมเปลี่ยน ทั้งนี้ตัวอย่าง MY07 มีสายสัมพันธ์กับตัวอย่าง MY08 มากกว่า MY03 ในพันธุ์บางขุนนนท์ (MY04 และ MY10) พบว่าตัวอย่าง MY10 มีความใกล้ชิดกับตัวอย่าง MY05 (พันธุ์ทุลเกล้า) มากกว่า มีแนวโน้มที่เกิดการกลายพันธุ์จาก MY05 กับ MY04 ในขณะที่ MY01 (พันธุ์สวนหวาน) กับ MY02 (พันธุ์ชิดสง่า) เป็นตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดกันมาก อาจจะเป็นพันธุ์เดียวกัน



รูปที่ 4.2 แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ โดยจุดดำแสดงตัวอย่างมะปราง และดาวสีดำแสดงตัวอย่างมะยงชิด



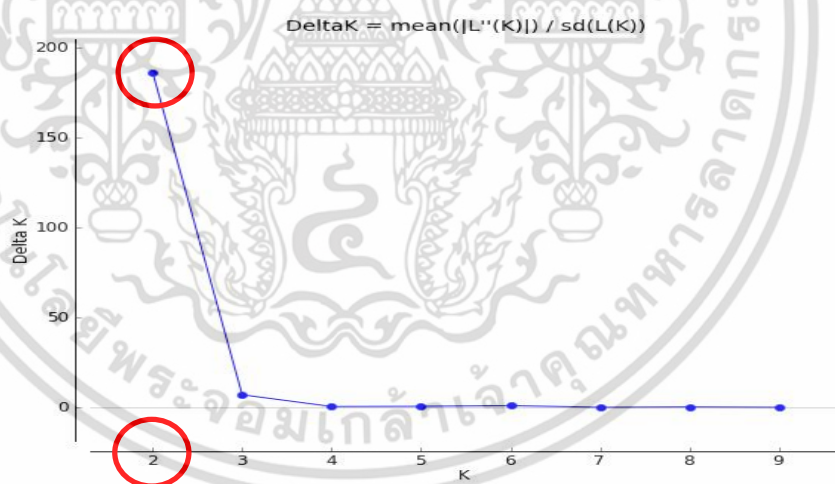
รูปที่ 4.3 แสดงสายสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์แบบ NJ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อแหล่งอื่น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Ghazali และคณะ (2015) ที่ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการแยกมะปราง (*B. macrophylla*) ออกเป็น 3 กลุ่ม ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.659-0.955 และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pan และคณะ (2007) และ Kubo และคณะ (2009) ที่ศึกษาในบัวหลวงโดยใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ และไอเอสเอสอาร์ในการศึกษาหาความหลากหลายในบัวหลวงชนิด *nucifera* กับ *lutea* รวมทั้งที่เป็นลูกผสมของ 2 ชนิด พบว่าเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถแยกบัวทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้ แม้ว่ามีความหลากหลายที่ต่ำ ซึ่งอาจมีเป็นไปได้ว่าการขยายพันธุ์ของบัวที่มีลักษณะที่สวยงามหรือมีกลิ่นหอมมักใช้ขยายสายพันธุ์จากเหง้าหรือไหลซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นหลัก (Chen และคณะ, 2008)

4.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

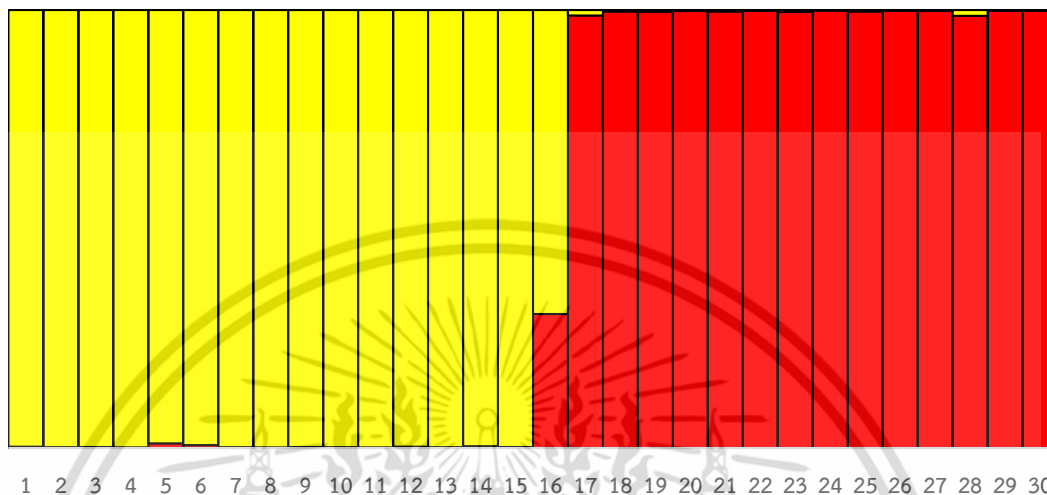
จากการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่างจากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ด้วยวิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ (Bayesian) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE v.2.3 จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่า K ซึ่งเป็นค่าความเป็นไปได้ของโครงสร้างพันธุกรรม พบว่าค่า K ที่ได้เท่ากับ 2 โดยดูค่าที่ Delta K สูงที่สุด ดังรูปที่ 4.4 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างเด่นชัดจากค่า Delta K ใน K อื่นๆ จากนั้นสร้างเป็นกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรจากตัวอย่างมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมประชากรโดยใช้ STRUCTURE จากกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างแรกด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจนโดย MP1-MP16 จะเป็นมะปรางเพียงอย่างเดียว ขณะที่โครงสร้างในกลุ่มที่สอง ประกอบด้วยมะปรางสองชนิดคือ MP17 และ MP18 และสายพันธุ์มะยงชิด (MY01-MY12) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของกลุ่มสัมพันธ์ในรูปที่ 4.2 และ 4.3 ที่แบ่งพืชไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดนี้เป็นสองกลุ่มหลักโดยลักษณะทางพันธุกรรมของมะปราง MP17 และ MP18 จะใกล้เคียงกับสายพันธุ์มะยงชิด โดยเฉพาะรสชาติของ MP18 ซึ่งเป็นมะปรางจากต้นพันธุ์ท้องถิ่นในธรรมชาติมีอายุกว่าหลายร้อยปี มีขนาดผลที่ไม่ใหญ่มากเมื่อเทียบกับมะปรางที่ปลูกในเชิงเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ รวมทั้งรสชาติที่หวานอมเปรี้ยวคล้ายกับมะยงชิด



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะปราง และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะปราง และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด

4.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปรางด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส

4.3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส

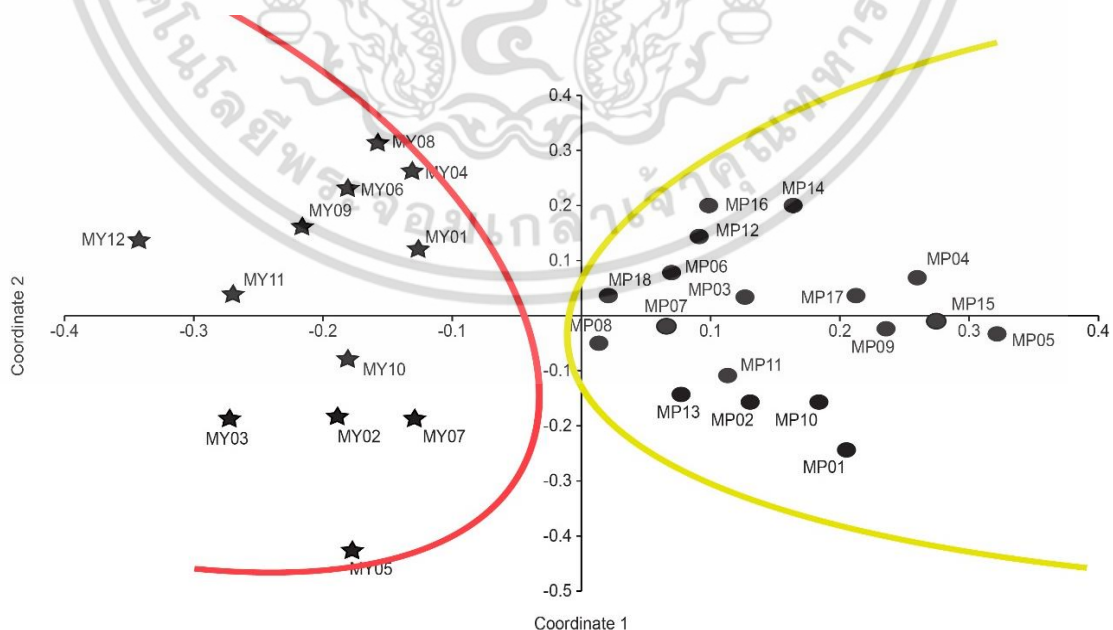
จากการตรวจสอบพบว่ายังไม่เคยมีการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอสมาก่อนในมะปรางและมะยงชิด และจากการตรวจสอบหาไพรเมอร์ของเครื่องหมายไอพีบีเอสโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.5) กับตัวอย่างมะปราง 1 ตัวอย่าง (MP02) และมะยงชิด 1 ตัวอย่าง (MY01) พบว่ามี 30 ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ โดยมี 6 ไพรเมอร์ (2076, 2080, 2085, 2252, 2398 และ 2401) ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่าง และให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของพืชในกลุ่มนี้ได้

จากรูปแบบความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส นำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การคำนวณสัมประสิทธิ์ความคล้ายโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์มาตรฐานของไดซ์ พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายอยู่ในช่วง 0.833-0.992 (ตารางภาคผนวกที่ 3) โดยตัวอย่างที่มีความเหมือนกันมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MP12 กับ MP16 และตัวอย่างที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MP15 กับ MY12 และเมื่อนำข้อมูลทั้งหมดสร้างกลุ่ม

ความสัมพันธ์แบบ PCoA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาได้ 2 กลุ่ม ดังรูปที่ 4.6

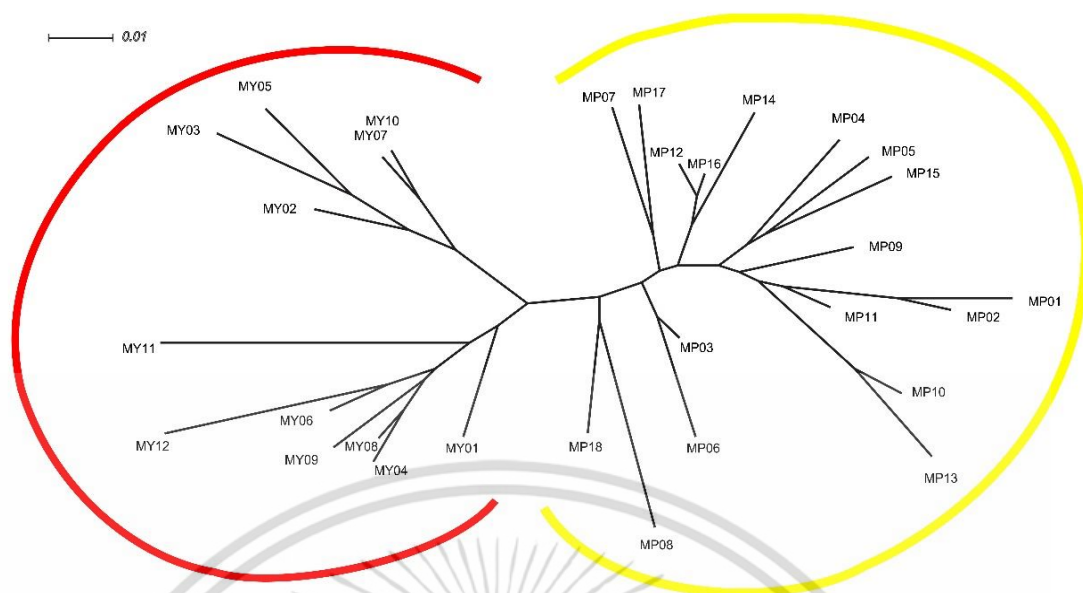
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์โดยวิธี NJ ในรูปที่ 4.7 ที่สามารถแบ่งมะปรางได้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยมะพร้าว จำนวน 18 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยมะยงชิด 12 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์ได้แก่ ตัวอย่าง MP06, MP07 และ MY06 พบว่า ตัวอย่าง MP06 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่าง MP03 นั่นคือพันธุ์ทองใหญ่ เนื่องจากตัวอย่าง MP06 ขนาดต้นยังเล็กอยู่ และเมื่อพิจารณาบริเวณที่ปลูกอยู่บริเวณหลังห้องน้ำ จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีเมล็ดของพันธุ์ทองใหญ่ตกลงบริเวณนั้นและเจริญเติบโต จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์ทองใหญ่เช่นเดียวกันกับตัวอย่าง MP03 ขณะที่ตัวอย่าง MP07 มีสายสัมพันธ์กับ MP17 ซึ่งเป็นพันธุ์ใหญ่ที่เก็บได้จากจังหวัดกำแพงเพชร จากประวัติของตัวอย่าง MP07 และ MP17 มีความสอดคล้องกันเนื่องจากเป็นต้นที่ปลูกมานานและมีขนาดต้นที่ใหญ่ จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นต้นกลายพันธุ์หรือพันธุ์เดียวกัน แต่ให้ผลที่ขัดแย้งกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ที่ MP06 และ MP07 ไม่มีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์ใดเลย ส่วนตัวอย่าง MY06 พบว่ามีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตัวอย่าง MY12 (พันธุ์เพชรคลองลาน) ในขณะที่ตัวอย่าง MP02 และ MP04 (พันธุ์ทองนพรัตน์) เป็นตัวอย่างจากพันธุ์เดียวกัน แต่ต่างกันเนื่องจากเก็บใบตัวอย่างคนละต้นกัน พบว่า MP02 กับ MP01 (พันธุ์แม่อนงค์) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน มีแนวโน้มที่จะเป็นชนิดพันธุ์เดียวกันมากกว่า MP02 กับ MP04 ซึ่งผลจากเครื่องหมายไอพีบีเอสได้สอดคล้องกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ เช่นเดียวกับตัวอย่าง MP09 กับ MP13 MY03 กับ MY07 และ MY04 กับ MY10 แต่กลับพบว่า MY07 และ MY10 นั้นมีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ในส่วนของพันธุ์หวานใหญ่ (MP08) มีสายสัมพันธ์กับพันธุ์ดั้งเดิมที่มีอายุมากกว่าร้อยปี (MP18) ซึ่งผลขัดแย้งกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ที่ MP18 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ MP17 อาจเป็นไปได้ที่ไพรเมอร์ของเครื่องหมายไอพีบีเอสนั้นเข้าจับต่างบริเวณกับไพรเมอร์ของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ จึงทำให้เกิดที่ต่างกัน



รูปที่ 4.6 แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส โดยจุดแถมดำแสดงตัวอย่างมะพร้าว และดาวสีดำแสดงตัวอย่างมะยงชิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

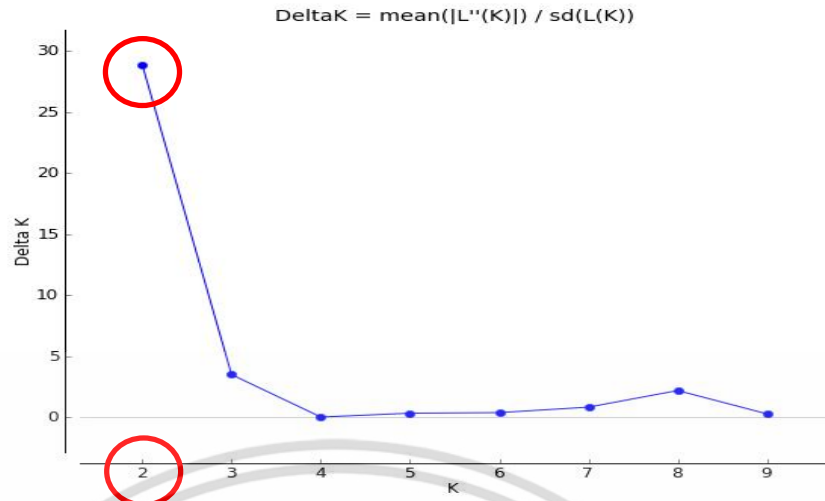


รูปที่ 4.7 แสดงสายสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์แบบ NJ ด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส

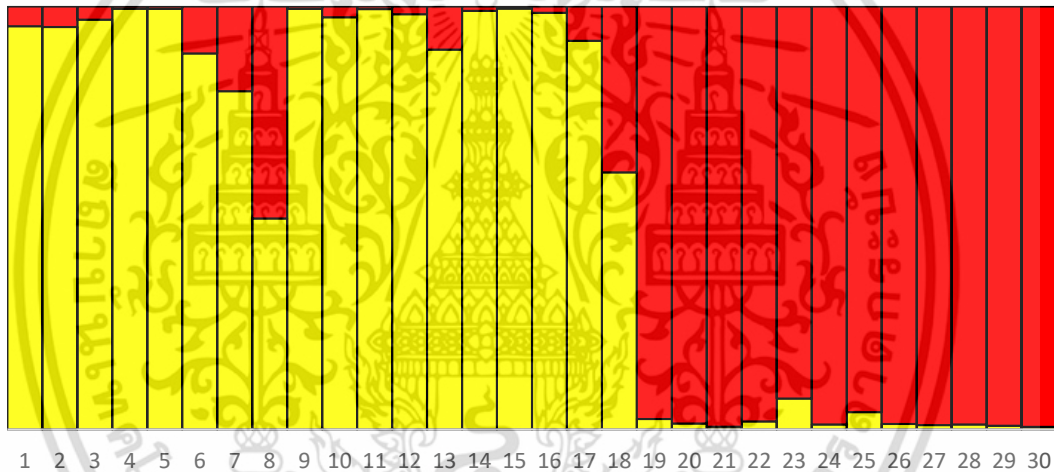
จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Mehmood และคณะ (2013 และ 2015) ในการทดสอบพืชเศรษฐกิจกลุ่มฝรั่ง พบว่าการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส สามารถแยกพืชเกษตรกลุ่มฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) ออกจากกันได้ โดยแยกฝรั่งที่ศึกษาออกเป็น 5 กลุ่ม ในรายงานของ Guo และคณะ (2014) แยกองุ่น (*Vitis vinifera* Lin.) ออกเป็น 3 กลุ่ม โดย 2 กลุ่มแรกมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อสังเกตจากค่ากลุ่มความสัมพันธ์แบบ PCoA

4.3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส

จากการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างมะปราง และมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง เครื่องหมายไอพีบีเอส โดยโปรแกรม STRUCTURE v.2.3 และ คำนวณหาค่า K และวิเคราะห์โดยโปรแกรม CLUMPP version 1.1.2 พบว่าค่า K ที่ได้เท่ากับ 2 ดังรูปที่ 4.8 และสร้างเป็นกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะปราง และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะปราง และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด

จากรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรจากตัวอย่างมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์โครงสร้างกลุ่มประชากรโดยใช้ STRUCTURE สอดคล้องกับการวิเคราะห์กลุ่มความสัมพันธ์และสายสัมพันธ์ที่สามารถแบ่งพืชตัวอย่างกลุ่มนี้ออกได้ 2 กลุ่ม จากกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างแรกด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอสสามารถแยกกันได้อย่างชัดเจนโดยชนิด MP1-MP18 จะเป็นมะปรางเพียงอย่างเดียว ขณะที่โครงสร้างในกลุ่มที่สอง ประกอบด้วยสายสัมพันธ์มะยงชิด MY1-MY12 สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของกลุ่มความสัมพันธ์ในรูปที่ 4.6 และ 4.7 พบว่าตัวอย่างที่ 8 (MP08) และ 18 (MP18) นั้นมีโครงสร้างทางพันธุกรรมของมะยงชิดปะปนอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงทำให้ MP08 และ MP18 แยกออกมาจับกลุ่มกัน และเมื่อดูจากรูปจะพบการปนเปื้อนของพันธุ์กรรมอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายไอพีบีเอสมีแนวโน้มที่จะใช้ในการศึกษาเพื่อดูพันธุ์ลูกผสมได้ นอกจากนี้ Faheen และคณะ (2015) ศึกษาโครงสร้างประชากรของถั่ว (*Pisum sativum*) พบว่าค่า K ที่เหมาะสมคือ 3 รวมทั้งยังพบว่ายังสามารถประยุกต์ใช้ได้กับพืชหลายชนิด (Kalendar และคณะ, 2010)

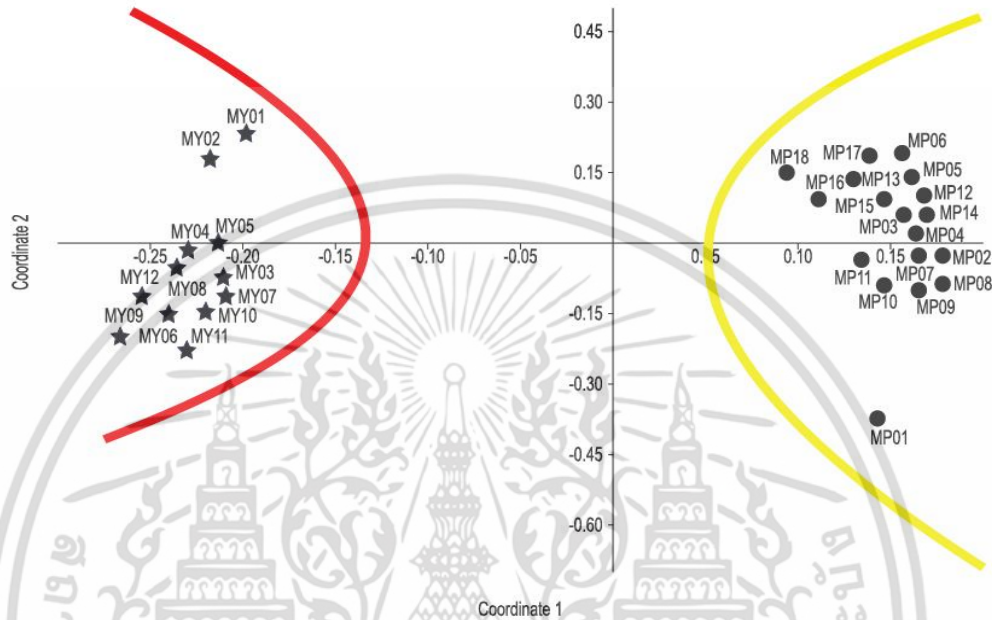
4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปรางด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที

4.4.1 การคัดเลือกไพรเมอร์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที

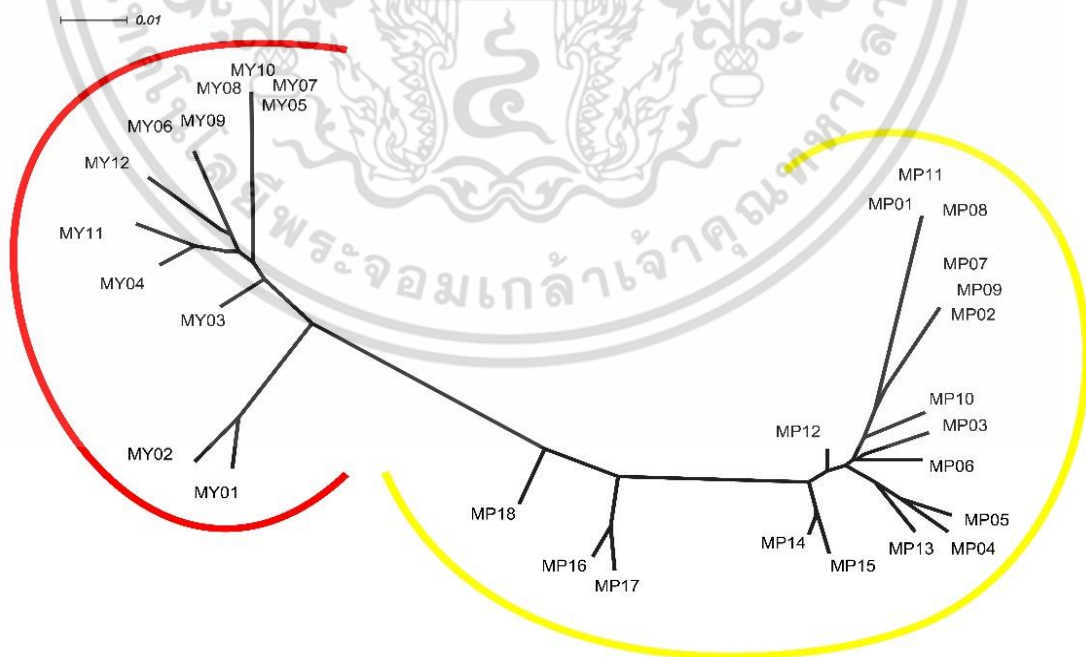
ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายเอสซีไอทีทั้ง 30 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.6) พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างตัวอย่างมะปรางได้ คือ ไพรเมอร์ SCoT03, SCoT11, SCoT21, SCoT22, SCoT23, SCoT24, SCoT25, SCoT26, SCoT27 และ SCoT28 นำไพรเมอร์ทั้ง 10 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในมะปราง 30 ตัวอย่าง

เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายเอสซีไอทีจำนวน 126 แถบ มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในรูปของสัมประสิทธิ์ความคล้าย ซึ่งพบอยู่ในช่วง 0.578-1 (ตารางภาคผนวกที่ 3) จากนั้นนำค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายมาสร้างกลุ่มความสัมพันธ์แบบ PCoA ด้วยโปรแกรม Past version 3 ซึ่งสามารถแยกพืชตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน โดยในกลุ่มแรก ประกอบไปด้วยมะปราง จำนวน 18 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 มะยงชิด 12 ดังรูปที่ 4.10 สอดคล้องกับรูปของสายสัมพันธ์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์โดยวิธี NJ ดังรูปที่ 4.11 โดยตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์ได้แก่ ตัวอย่าง MP06, MP07 และ MY06 พบว่า MY06 มีสายสัมพันธ์กับตัวอย่าง MY09 (พันธุ์แม่ย่า) ซึ่งผลขัดแย้งกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และไอพีบีเอส เนื่องจากไม่น่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นพันธุ์แม่ย่า และพันธุ์เพชรคลองลาน (MY12) จากเครื่องหมายไอพีบีเอส เนื่องจากภายในสวนไม่พบพันธุ์แม่ย่า และพันธุ์เพชรคลองลานในสวนที่ปลูก และเมื่อดูจากขนาดต้นของ MY06 มีขนาดสูงใหญ่และปลูกมานานแล้ว จึงมีแนวโน้มที่จะไม่ใช่พันธุ์ดังกล่าว ในขณะที่ MP07 นั้นมีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ MP02 (พันธุ์ทองนพรัตน์) และ MP09 (พันธุ์หวานกลม) เนื่องจาก MP07 เป็นต้นที่อยู่ภายในสวนมานานหลายสิบปี จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์ทองนพรัตน์ หรือพันธุ์หวานกลม จากเครื่องหมายไอพีบีเอสพบว่า MP02 กับ MP09 มีสายสัมพันธ์ที่ค่อนข้างใกล้ชิดกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่ามีการพัฒนาสายพันธุ์มาจาก MP07 ส่วนพันธุ์ทองนพรัตน์ (MP02 และ MP04) พันธุ์หวานใหญ่ (MP09 และ MP13) พบว่าสายสัมพันธ์ห่างกัน เช่นเดียวกับผลของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และไอพีบีเอส โดยตัวอย่าง MY07 (พันธุ์ทุลเกล้า) MY05 (พันธุ์ทุลถวาย) MY08 (พันธุ์เหนือสยาม) และ MY10 (พันธุ์บางขุนนนท์) มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก อาจมาจากพ่อแม่พันธุ์เดียวกัน แต่ต่างโคลนกันนำมาผสมพันธุ์กัน แล้วตั้งชื่อพันธุ์ผสมต่างกัน จึงต้องดูลักษณะภายนอกประกอบด้วยว่ามีลักษณะเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมือนกันหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า MP01 (พันธุ์แม่อนงค์) และ MP02 (พันธุ์ทองนพรัตน์) นั้นมีสายสัมพันธ์กันโดยผลสอดคล้องกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และไอพีบีเอส แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายเอสซีไอทีก็ยังไม่ให้ผลที่ต่างจากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และไอพีบีเอส อาจมีความเป็นไปได้ที่เครื่องหมายเอสซีไอทีที่จับกับดีเอ็นเอคนละตำแหน่งจึงทำให้ผลที่ได้ต่างกัน



รูปที่ 4.10 แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยเครื่องหมายด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที โดยจุดแต้มดำแสดงตัวอย่างมะปราง และดาวสีดำแสดงตัวอย่างมะยงชิด



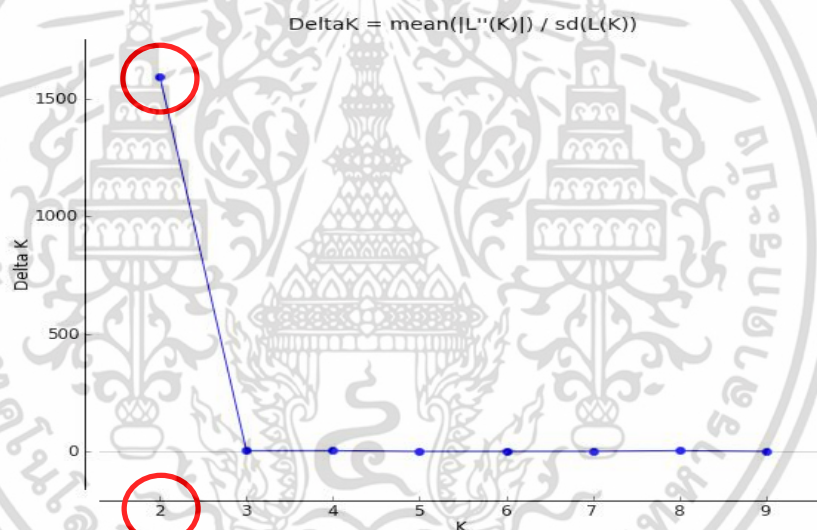
รูปที่ 4.11 แสดงสายสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์แบบ NJ ด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Luo และคณะ (2011) ได้ศึกษามะม่วงจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 18 ไพรเมอร์ แยกมะม่วง (*Mangifera indica* L.) ที่เก็บจากต่างที่กัน สามารถแบ่งมะม่วงได้เป็น 2 กลุ่ม ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายที่ 0.81 นอกจากนี้ยังมีรายงานในพืชสกุลส้ม (*Citrus* L.) ที่พบว่าสามารถใช้เครื่องหมายเอสซีไอทีในการแยกชนิด และมีความหลากหลายในกลุ่มพืชสกุลส้ม (Mahjbi และคณะ, 2015) ยังมีรายงานว่าเครื่องหมายเอสซีไอทีให้ข้อมูลที่ดีกว่าเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์และอาร์เอฟดีซึ่งใช้ในการตรวจสอบมันฝรั่งและมะม่วง (Gorji และคณะ, 2011; Luo และคณะ, 2011)

4.4.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที

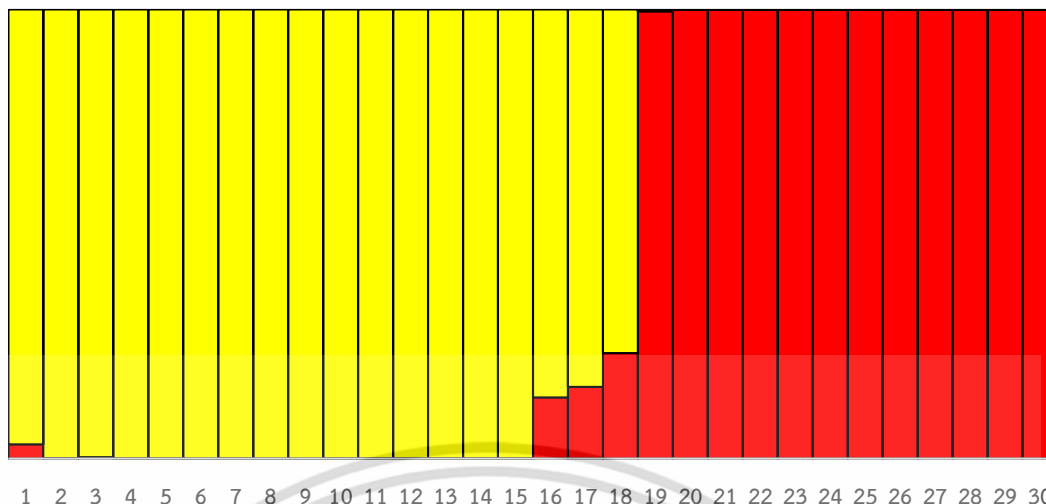
จากการวิเคราะห์ค่า K ซึ่งเป็นค่าจำลองความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ (Bayesian) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE v.2.3 พบว่าค่า $K = 2$ ดังรูปที่ 4.12 จากนั้นสร้างเป็นกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที

จากรูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรจากตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์โครงสร้างกลุ่มประชากรโดยใช้ STRUCTURE สอดคล้องกับการวิเคราะห์กลุ่มความสัมพันธ์ และสายสัมพันธ์ที่สามารถแบ่งพืชตัวอย่างกลุ่มนี้ออกได้ 2 กลุ่ม จากกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยแรกเครื่องหมายเอสซีไอทีได้อย่างชัดเจน พบว่ากลุ่มแรกจะประกอบด้วย มะปรางเพียงอย่างเดียว MP01-MP18 ขณะที่โครงสร้างในกลุ่มที่สอง สายพันธ์มะยงชิด (MY01-MY12) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของกลุ่มความสัมพันธ์ในรูปที่ 4.10 และสายสัมพันธ์ในรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะพร้าว และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะพร้าว และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด

4.5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี

4.5.1 การคัดเลือกไพรเมอร์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี

ในการทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ พบว่า 26 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของมะพร้าว พบว่ามีเพียง 12 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ME1EM2, ME1EM3, ME1EM4, ME1EM5, ME2EM3, ME2EM4, ME2EM6, ME3EM5, ME4EM3, ME4EM4, ME5EM1 และ ME5EM3 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี และสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขึ้นในทุกตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี จำนวน 121 แถบ จาก 12 ไพรเมอร์ นำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย ด้วยโปรแกรม PAST version 3 พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 12 ไพรเมอร์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายอยู่ในช่วง 0.889-0.995 (ตารางภาคผนวกที่ 4) โดยตัวอย่างที่มีความเหมือนกันมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MP06 และ MP16 และตัวอย่างที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MP03 กับ MY12 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดสร้างกลุ่มความสัมพันธ์แบบ PCoA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม ดังรูปที่ 4.14 สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์โดยวิธี NJ ในรูปที่ 4.15 ที่สามารถแบ่งมะพร้าวได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยมะพร้าว จำนวน 19 ตัวอย่าง และมะยงชิด 1 อย่าง (MY01) และกลุ่มที่ 2 มะยงชิด 11 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์ (MP06, MP07 และ MY06) โดย MP06 มีความใกล้เคียงกับ MP16 (พันธุ์คลองลาน) พบว่าขัดแย้งจากความ

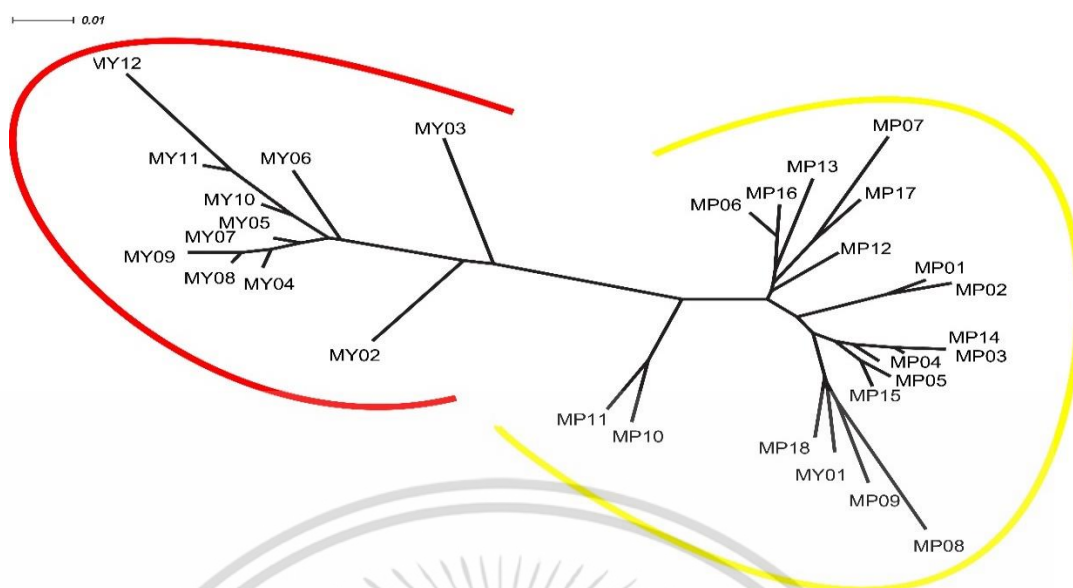
เป็นจริงที่ว่าพันธุ์คลองลานั้นเป็นพันธุ์ประจำท้องถิ่นของจังหวัดกำแพงเพชรที่คุณวิจิตเป็นผู้เจอและเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งชื่อสายพันธุ์ แต่กลับมีสายสัมพันธ์กับ MP06 ซึ่งพบในจังหวัดนครนายก ซึ่งอาจจะมีความเป็นได้ที่เกิดจากการนำเมล็ดพันธุ์ของ MP16 มาปลูก หรือเมล็ดจากพันธุ์อื่นเกิดการกลายแล้วลำดับทางจีโนมไปเหมือนกับ MP16 ในขณะที่ MP07 และ MP17 (พันธุ์ใหญ่) นั้นมีผลสายสัมพันธ์เป็นไปตามเครื่องหมายไอพีบีเอสที่อาจเป็นต้นกลายพันธุ์หรือพันธุ์เดียวกัน ส่วน MY06 ผลสอดคล้องกับผลการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และไอพีบีเอส โดยมีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์ MY05 (พันธุ์ทุลถวาย) MY10 (พันธุ์บางขุนนนท์) MY11 (พันธุ์เพชรกลางดง) หรือ MY12 (พันธุ์เพชรคลองลาน) เมื่อสังเกตจะพบว่า MP01 (พันธุ์แม่อนงค์) กับ MP02 (พันธุ์ทองนพรัตน์) จะมีผลไปในทางเดียวกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส และเอสซีไอที ที่มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน อาจจะเป็นพันธุ์เดียวกัน ซึ่ง MP04 เป็นพันธุ์ทองนพรัตน์ที่ขนาดต้นยังเล็กกว่าแต่กลับมีสายสัมพันธ์ที่ห่างกัน ทำให้มีแนวโน้มที่จะไม่ใช่พันธุ์เดียวกัน หรือแท้จริงแล้วเป็นพันธุ์ทองนพรัตน์ ในขณะที่พันธุ์หวานกลม (MP09 กับ MP13) ไม่มีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เช่นเดียวกับพันธุ์ทุลเกล้า (MY03 กับ MY07) และพันธุ์บางขุนนนท์ (MY04 กับ MY10) ซึ่งผลสอดคล้องกับเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส และเอสซีไอที



รูปที่ 4.14 แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี โดยจุดดำแสดงตัวอย่างมะปราง และดาวสีดำแสดงตัวอย่างมะยงชิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

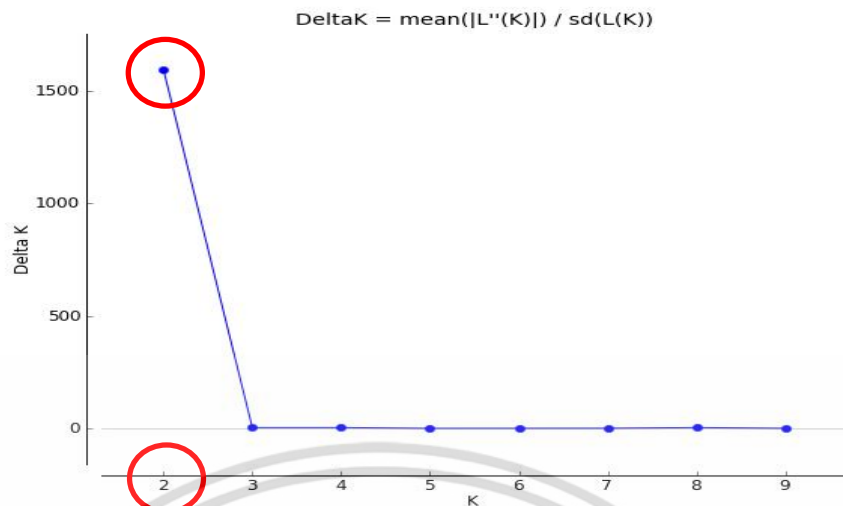


รูปที่ 4.15 แสดงสายสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์แบบ NJ ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี

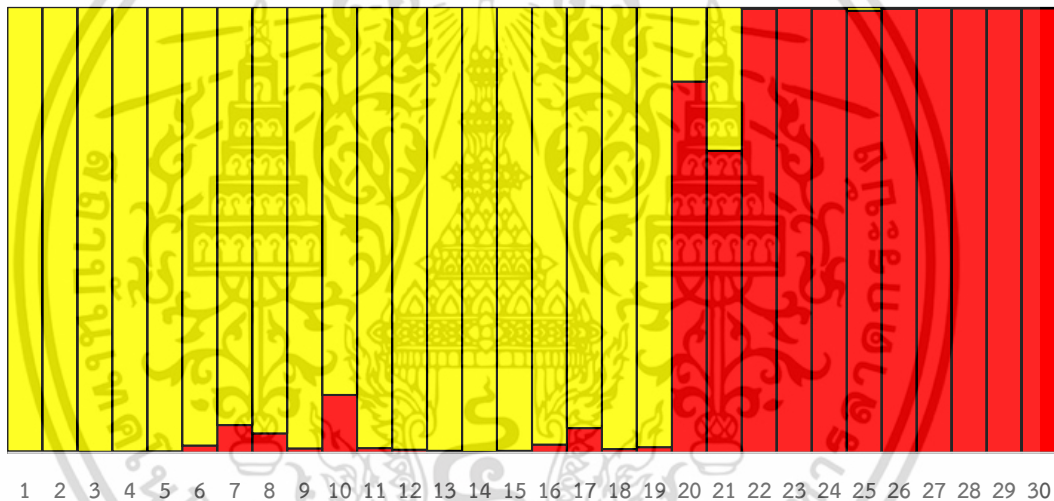
4.5.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี

จากการวิเคราะห์ค่า K ซึ่งเป็นค่าจำลองความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ (Bayesian) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE v.2.3 พบว่าค่า $K = 2$ ดังรูปที่ 4.16 จากนั้นสร้างเป็นกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมดังรูปที่ 4.17

จากรูปที่ 4.17 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรจากตัวอย่างมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์โครงสร้างกลุ่มประชากรโดยใช้ STRUCTURE สอดคล้องกับการวิเคราะห์กลุ่มความสัมพันธ์และสายสัมพันธ์ที่สามารถแบ่งพืชตัวอย่างกลุ่มนี้ออกได้ 2 กลุ่ม จากกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างแรกด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี ประกอบด้วยมะปราง MP1-MP18 และมะยงชิด 1 สายพันธุ์ (MY01) ขณะที่โครงสร้างในกลุ่มที่สอง ประกอบด้วยสายพันธุ์มะยงชิด MY02-MY12 สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของกลุ่มความสัมพันธ์ในรูปที่ 4.14 และสายสัมพันธ์ในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะพร้าว และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะพร้าว และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด

4.6 ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะพร้าวจากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

4.6.1 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม 4 ได้แก่ เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี พบจำนวน 413 แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จาก 4 เครื่องหมายข้างต้น ในประชากรของมะพร้าวและมะยงชิด พบว่าในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอแต่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละเครื่องหมายให้จำนวนโพลีมอร์ฟิกที่แตกต่างกันโดยมีช่วงร้อยละของโพลีมอร์ฟิก (polymorphic) อยู่ในช่วงร้อยละ 22.31-43.04 โดยเครื่องหมายที่ให้ร้อยละของโพลีมอร์ฟิกน้อยที่สุดคือเครื่องหมาย เอสอาร์เอพี ให้ร้อยละของโพลีมอร์ฟิกที่ 22.31 ซึ่งในงานวิจัยของ Li และคณะ (2014) ที่ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และเอสอาร์เอพี ในบ๊วย (*Prunus L.*) พบว่าร้อยละของโพลีมอร์ฟิกอยู่ที่ 84.5 และ 79.6 ตามลำดับ Chen และคณะ (2014) ที่ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และเอสอาร์เอพี ในแมกโนเลีย (*Magnolia wufengensis*) พบร้อยละของโพลีมอร์ฟิกอยู่ที่ 87.7 และ 88 ตามลำดับ

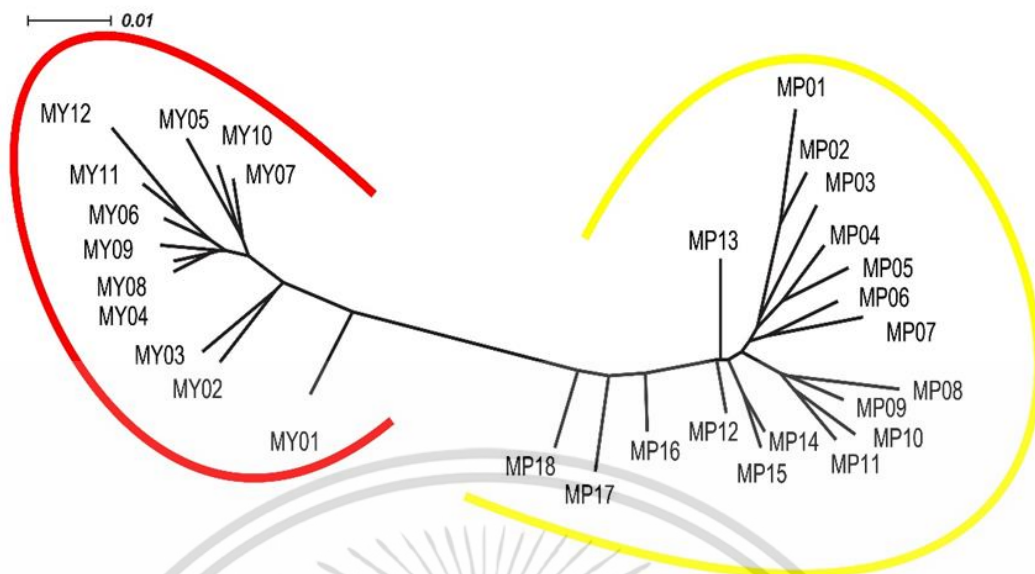
จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ เครื่องหมายไอพีบีเอส เครื่องหมายเอสซีไอที และเครื่องหมายเอสอาร์เอพี นำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ ด้วยโปรแกรม PAST version 3 พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายอยู่ในช่วง 0.831-0.985 (ตารางภาคผนวกที่ 5) โดยตัวอย่างที่มีความเหมือนกันมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MY04 กับ MY08 มีความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างอาจจะเป็นพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากมะยงชิดเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกเพื่อการค้า เมื่อดูจากประวัติพบว่าตัวอย่าง MY08 เป็นตัวอย่างที่เก็บได้จากแหล่งเพาะปลูกดั้งเดิม และตัวอย่างที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ตัวอย่างรหัส MP08 กับ MY12 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดสร้างกลุ่มความสัมพันธ์แบบ PCoA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม ดังรูปที่ 4.18 สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์โดยวิธี NJ ในรูปที่ 4.19 ที่สามารถแบ่งมะยงชิดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยมะยงชิด จำนวน 18 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 มะยงชิด 12 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์ คือ MP06, MP07 และ MY06 ซึ่งตัวอย่าง MP06 กับ MP07 นั้นมีสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน ซึ่งตัวอย่าง MP06 มีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากตัวอย่าง MP07 นั้นเป็นต้นที่มีขนาดใหญ่และปลูกมานานหลายสิบปีแล้ว พบว่าในทุกๆ เครื่องหมายไอพีบีเอส และเอสซีไอที ที่บอกระบุว่า MP06 มีความความสัมพันธ์กับพันธุ์ทองใหญ่ (MP03) ในขณะที่ MY06 อาจเป็นต้นกลายพันธุ์ระหว่างพันธุ์แม่ย่า (MY09) และพันธุ์เพชรคลองลาน (MY11) ซึ่งผลขัดแย้งกับทุกเครื่องหมาย อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อนำชุดข้อมูลทั้งหมดมารวมกัน จึงทำให้ผลมีความละเอียดมากยิ่งขึ้น และจะสังเกตได้ว่าพันธุ์ทองนพรัตน์ (MP02 กับ MP04) มีสายสัมพันธ์ที่ห่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยตัวอย่าง MP02 จะมีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์แม่องคค์ (MP01) เช่นเดียวกับผลจากทุกเครื่องหมายอื่นๆ ข้างต้น นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์หวานกลม (MP09 กับ MP13) พันธุ์ทูลเกล้า (MY03 กับ MY07) และพันธุ์บางขุนนนท์ (MY04 กับ MY10) ที่มีแนวโน้มจะไม่ใช่พันธุ์เดียวกัน มีความเป็นไปได้ที่วาทะกรรอาจเกิดความเข้าใจผิด เพราะสังเกตจากลักษณะภายนอกอย่างเดียวในการแยก แต่พบว่าตัวอย่างพันธุ์ทูลเกล้า (MY07) และพันธุ์บางขุนนนท์ (MY10) มีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์เดียวกันมากกว่า ยิ่งมากไปกว่านั้นพบว่า MY05 จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ MY07 และ MY10 ในทุกเครื่องหมาย แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางจีโนไทป์คล้ายกัน ทั้งนี้อาจต้องศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์รวมด้วย มีความเป็นไปได้ที่อาจเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมบริเวณ

coding ในส่วนของ MP13 (พันธุ์หวาน-กลม) MP14 (พันธุ์พวง) และ MP15 (พันธุ์เพชรทูลเกล้า) นั้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันซึ่งสอดคล้องไปกับผลของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ เช่นเดียวกับ MY11 (พันธุ์เพชรกลางดง) และ MY12 (พันธุ์เพชรคลองลาน) จากแหล่งตัวอย่างจะพบว่ามีโอกาสที่จะมีความสัมพันธ์กันเนื่องจากประวัติของตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่าง มีแหล่งกำเนิดจากที่เดียวกันนั่นคือจังหวัดกำแพงเพชร จากข้อมูลของคุณวิจิตรได้บอกไว้ว่าเป็นต้นที่เกิดอยู่บริเวณที่ใกล้กันแต่ลักษณะผลที่ออกมาขนาดต่างกัน รวมถึงลักษณะอื่นๆ จึงได้ตั้งชื่อต่างกัน ทำให้มีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามการนำชุดข้อมูลมารวมกันทำให้ข้อมูลที่ได้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้นเนื่องจากเครื่องหมายแต่ละเครื่องหมายมีความจำเพาะที่ต่างกัน



รูปที่ 4.18 แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์ไอพี โดยจุดเต็มดำแสดงตัวอย่างมะปราง และดาวสี่ดำแสดงตัวอย่างมะยงชิด

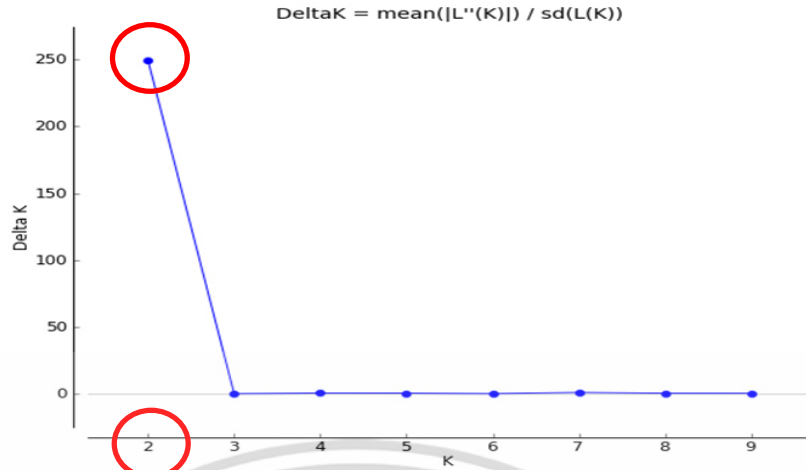


รูปที่ 4.19 แสดงสายสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์แบบ NJ ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

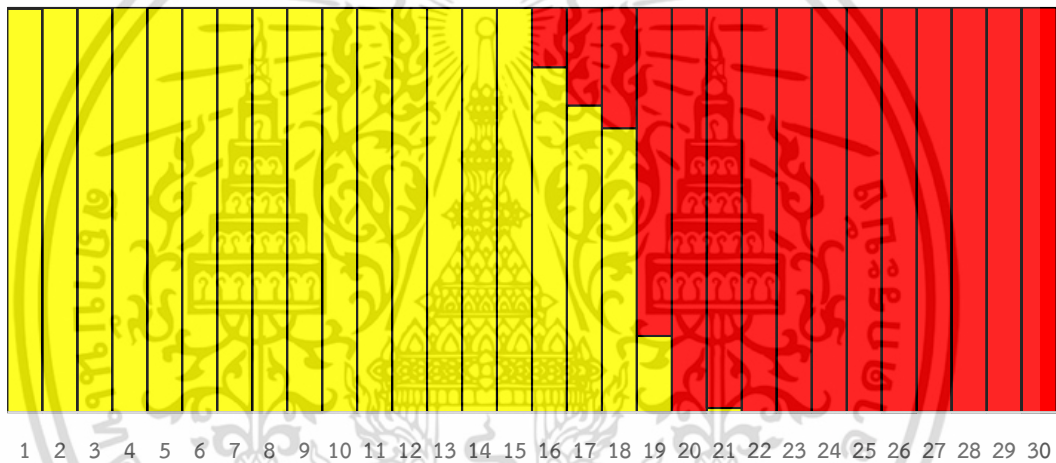
4.6.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

จากการวิเคราะห์ค่า K ซึ่งเป็นค่าจำลองความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ (Bayesian) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE v.2.3 พบว่าค่า $K = 2$ ดังรูปที่ 4.20 จากนั้นสร้างเป็นกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมดังรูปที่ 4.21

จากรูปที่ 4.21 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรจากตัวอย่างมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์โครงสร้างกลุ่มประชากรโดยใช้ STRUCTURE สอดคล้องกับการวิเคราะห์กลุ่มความสัมพันธ์และสายสัมพันธ์ที่สามารถแบ่งพืชตัวอย่างกลุ่มนี้ออกได้ 2 กลุ่ม จากกราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างแรกด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจนโดยชนิด MP01-MP18 จะเป็นมะปรางเพียงอย่างเดียว ขณะที่โครงสร้างในกลุ่มที่สอง ประกอบด้วยสายสัมพันธ์มะยงชิด MY01-MY12 สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปแบบของกลุ่มความสัมพันธ์ในรูปที่ 4.18 และสายสัมพันธ์ในรูปที่ 4.19 สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายเอสซีไอที



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงค่า K ที่เหมาะสมของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี



รูปที่ 4.21 กราฟแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างด้วยเครื่องหมายไอพีบีเอส ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี โดยตัวเลข 1-18 เป็นตัวอย่างมะปราง และ 19-30 เป็นตัวอย่างมะยงชิด เมื่อสีเหลืองแสดงกลุ่มประชากรของมะปราง และสีแดงแสดงกลุ่มประชากรของมะยงชิด

4.6.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลพันธุประวัติในภาพรวมของประชากรของมะปรางและมะยงชิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จากกลุ่มประชากรตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง จาก 7 จังหวัด เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรกลุ่มตัวอย่างมะปรางด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพีด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 PPF (percentage of polymorphic fragments) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มประชากรตามแหล่งภูมิภาคที่เก็บดังตารางที่

3.1 ในภาพรวมพบว่ามีค่าเฉลี่ยที่ 34.38 โดยค่าจำนวนแอลลีล (N_A) ทั้งหมดที่ 1.343 ± 0.476 และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย เมื่อผู้จัดทำเอกสารได้ดำเนินการที่ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเอ็ฟเพ็คทีฟแอลลีล (N_E) มีค่า 1.195 ± 0.321 และเมื่อวิเคราะห์ค่าคาดคะเนเฮเทอโรไซโกซิตี (H_E) ในภาพรวมของทุกประชากร มีค่าที่ 0.115 ± 0.180 และค่าสังเกตเฮเทอโรไซโก (H_O) มีค่า 0.173 ± 0.261 พบค่าเฉลี่ยความหลากหลายของพันธุกรรมในระดับประชากร (H_S) ที่ 0.110 ± 0.030 โดยค่าโดยค่าความหลากหลายพันธุกรรม (H_T) อยู่ที่ 0.115 ± 0.032 นอกจากนี้ยังมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (G_{ST}) และค่าการถ่ายเทเคลื่อนย้ายยีน (N_m) ที่ 0.034 และ 12.080 ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของมะปรางด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

Population	Sample Size	Polymorphic bands (%)	Observed number of alleles (N_A)	Effective number of alleles (N_E)	Expected heterozygosity (H_E)	Observed heterozygosity (H_O)
1	16	30.51	1.305 ± 0.461	1.197 ± 0.333	0.137 ± 0.185	0.168 ± 0.267
2	14	30.27	1.302 ± 0.460	1.184 ± 0.325	0.107 ± 0.179	0.159 ± 0.259
Total	30	34.38	1.343 ± 0.476	1.195 ± 0.321	0.115 ± 0.180	0.173 ± 0.261
Average gene diversity within populations (H_S)		Total gene diversity (H_T)		Coefficient of gene differentiation (G_{ST})		Estimate of gene flow (N_m)
0.110 ± 0.030		0.115 ± 0.032		0.034		12.080

การศึกษาโครงสร้างประชากรโดยค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (G_{ST}) พบว่าค่าความแตกต่างของแอลลีลระหว่างประชากร จากเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 ชนิด โดยเมื่อนำเครื่องหมายทั้ง 4 ชนิดมาวิเคราะห์ในภาพรวมพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีนในแนวคิดของ Wright (1978) ในศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 0.034 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรมีระดับต่ำ เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างที่เกิดจากสวนเพียง 2 สวน ยิ่งไปกว่านั้นมะปรางและมะยงชิดเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกเพื่อเศรษฐกิจ จึงไม่นิยมปลูกด้วยเมล็ดที่อาจจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Diaz-Matallana และคณะ (2009) ศึกษามะม่วง (*Mangifera indica* L. cvar. Hilacha) 112 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี ในประเทศโคลัมเบีย โดยมีค่า $F_{ST} = 0.035$ ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ เช่นเดียวกับมะปรางที่ค่า $G_{ST} = 0.034$ เมื่อเทียบกับงานวิจัย Hirano และคณะ (2010) ที่รายงานค่า F_{ST} ของมะม่วงด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat: SSR) อยู่ที่ 0.123 ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลาง ในขณะที่ Gálvez-López และคณะ (2009) ศึกษามะม่วง (*M. indica*) 112 ตัวอย่าง โดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism: AFLP) และเอสเอสอาร์ จาก 16 รัฐ ในประเทศเม็กซิโก พบว่ามีค่า $F_{ST} = 0.1921$ สำหรับการศึกษาด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี และ 0.1911 สำหรับการศึกษาด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก ในขณะที่ Hirano และคณะ (2011) ที่รายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า F_{ST} ของมะม่วง จำนวน 41 ตัวอย่าง เท่ากับ 0.440 ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด Souza และคณะ (2011) ได้ศึกษามะม่วง (*M. indica*) 42 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี จากประเทศบราซิล สหรัฐอเมริกา และอินเดีย พบว่ามีค่า $F_{ST} = 0.271$ นอกจากนี้ Gálvez-López และคณะ (2010) ยังได้ศึกษามะม่วง (*M. indica*) ด้วยเครื่องหมายเอเอฟเอลพีกับ 41 ตัวอย่าง จากทางตอนใต้ของประเทศเม็กซิโก พบค่า $F_{ST} = 0.237$ แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มมะม่วงซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ใกล้กับมะปรางสามารถเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ตั้งแต่ระดับต่ำจนถึงระดับสูง ขึ้นกับการเลือกความแตกต่างของกลุ่มประชากรในการศึกษา รวมทั้งภูมิหลังของการขยายพันธุ์พืชชนิดนั้นๆ อย่างไรก็ตามพบว่าพืชที่ปลูกในเชิงเกษตรกรรมจะนิยมขยายพันธ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นหลักมักมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ (Wang และคณะ, 2011; Coppi และคณะ, 2014)

พบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ส่วนใหญ่ ได้แก่ การเพาะพันธ์ การกระจาย และลักษณะทางวิเวศวิทยา กล่าวคือสิ่งสำคัญคือการเพาะและขยายพันธ์ โดย Hamrick และคณะ (1992) พบว่าพืชที่สืบพันธ์ด้วยการผสมข้ามสายพันธ์ การแพร่กระจายเมล็ดพันธ์ด้วยกระแสลมหรือสัตว์ จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง นอกจากนี้สิ่งที่มีผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรอาจเป็นวิวัฒนาการของประวัติศาสตร์ การกลายพันธ์ การรวมตัวใหม่ ระบบการผสมพันธ์ การไหลของยีน และการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Zhang และคณะ, 2012; Li และคณะ, 2012; Wang และคณะ, 2014; อ้างโดย Xiao และคณะ, 2014) ดังนั้นวิธีการเพาะพันธ์ต่างกันทำให้อัตราส่วนของเฮเทอโรไซกัส และโฮโมไซกัสต่างกัน ส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากร รวมไปถึงโครงสร้างประชากรด้วย (Wang และคณะ, 2011; Coppi และคณะ, 2014) Hamrick (1989) พบว่าถ้า $N_m > 1$ การไหลของยีนเป็นกลางโดยเกิดจากความแปรปรวนของยีน ในทางตรงข้ามหาก $N_m < 1$ ความแปรปรวนของยีนจะเป็นสาเหตุหลักของความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากร ในการศึกษามะปรางครั้งนี้การไหลยีนอยู่ที่ 12.080 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการไหลของยีนเกิดขึ้นบ่อยในหมู่ประชากรของตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงการส่งผ่านลักษณะทางพันธุกรรมในหมู่ประชากรในระดับสูง ซึ่งหากพิจารณาวิธีการขยายพันธ์พืชในกลุ่มนี้พบว่านิยมขยายพันธ์จากการไม่อาศัยเพศเป็นหลัก โดยเฉพาะการทาบกิ่งและต่อกิ่ง เพื่อป้องกันการกลายพันธ์ ซึ่งไม่นิยมเพาะจากเมล็ด เนื่องจากการเพาะเมล็ดมีข้อจำกัดตรงที่มีการกลายพันธ์จากมะปรางหวานอาจกลายเป็นมะปรางเปรี้ยวหรือหวานอมเปรี้ยว และจากมะปรางผลใหญ่อาจกลายเป็นมะปรางชนิดผลเล็กได้ จึงไม่เป็นที่นิยมของเกษตรกร รวมทั้งปลูกจากต้นเพาะเมล็ดจะใช้เวลาประมาณ 8 ปี จึงจะเริ่มออกดอกติดผล ส่วนการตอนกิ่งมีข้อจำกัดตรงที่กิ่งตอนจะไม่มีรากแก้ว จะต้องมีการเสริมรากภายหลัง ส่วนการทาบกิ่ง การต่อกิ่งและการติดตา จะต้องดำเนินการเพาะต้นต่อมะปรางก่อน และการปักชำนั้นจะได้ต้นกล้าที่ไม่มีรากแก้ว จะต้องมีการเสริมรากภายหลังเช่นกันการขยายพันธ์มะปรางที่นิยมปฏิบัติกันมากในขณะนี้จะเป็นการทาบกิ่งและการต่อกิ่งซึ่งทำให้พันธุกรรมของมะปรางต่ำ ขณะที่การไหลของยีนสูงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีพีเอส เอสซีไอที และ เอสอาร์เอพี ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปราง เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า ความสัมพันธ์ต่างๆ ในแต่ละเครื่องหมาย ดังตารางที่ 4.2 พบว่าค่าจากการวิเคราะห์ข้อมูลทาง พันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการนำ เครื่องหมายทั้งหมดมากที่สุด และผลจากแผนภูมิทั้ง PCoA และ NJ เป็นไปได้ว่าในการศึกษาครั้ง ถัดไปอาจใช้เพียงเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เพียงเครื่องหมายเดียวก็สามารถวิเคราะห์ความ หลากหลายของมะปรางได้

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลเปรียบเทียบค่าทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของมะปรางด้วย เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีพีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี

Marker	ISSR	iPBS	SCoT	SRAP	Total
percentage of polymorphic fragments	34.09	43.04	40.80	22.31	34.38
Observed number of alleles (N_A)	1.341 ± 0.477	1.430 ± 0.498	1.408 ± 0.493	1.223 ± 0.418	1.343 ± 0.476
Effective number of alleles (N_E)	1.178 ± 0.302	1.214 ± 0.327	1.250 ± 0.340	1.138 ± 0.303	1.195 ± 0.321
Expected heterozygosity (H_E)	0.109 ± 0.170	0.129 ± 0.180	0.148 ± 0.193	0.077 ± 0.165	0.115 ± 0.180
Observed heterozygosity (H_O)	0.165 ± 0.251	0.197 ± 0.262	0.220 ± 0.281	0.114 ± 0.236	0.173 ± 0.261
Average gene diversity within populations (H_S)	0.102 ± 0.027	0.120 ± 0.030	0.144 ± 0.036	0.076 ± 0.026	0.110 ± 0.030
Total gene diversity (H_T)	0.107 ± 0.029	0.130 ± 0.033	0.147 ± 0.037	0.078 ± 0.027	0.115 ± 0.032
Coefficient of gene differentiation (G_{ST})	0.048	0.074	0.023	0.026	0.034
Estimate of gene flow (N_m)	9.827	12.223	20.717	19.061	12.080

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง จากแหล่งตัวอย่างประชากร 7 จังหวัด ที่แบ่งประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม โดยภาคกลางเป็นกลุ่ม 1 และภาคเหนือตอนล่างเป็นกลุ่ม 2 จากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะปรางโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลชนิดไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี ผลการสังเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบไพรเมอร์ทั้งหมด 6, 6, 10 และ 12 ไพรเมอร์ ของเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ไอพีบีเอส เอสซีไอที และเอสอาร์เอพี ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนได้ ตามลำดับ เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย SM พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.72-1.00, 0.72-1.00, 0.57-1.00 และ 0.80-1.00 ตามลำดับ แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธี Neighbour-joining โดยทั้ง 4 เครื่องหมายสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งผลที่ได้เป็นไปตามการวิเคราะห์ผลแบบการจัดกลุ่มด้วยวิธี Principal Coordinate Analysis (PCoA) การประเมินกลุ่มประชากร (K) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจากโปรแกรม STRUCTURE พบว่าค่า K ที่เหมาะสมคือ 2 กลุ่มประชากร จากวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรกลุ่มตัวอย่างมะปรางและมะยงชิด จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (G_{ST}) จากเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 ชนิด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.023-0.074 โดยเมื่อนำเครื่องหมายทั้ง 4 ชนิดมาวิเคราะห์ที่ในภาพรวม พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีนเท่ากับ 0.034 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรรวมถึงมีค่าการไหลของยีนสูง (N_m) เท่ากับ 12.080 แสดงให้เห็นว่าการถ่ายเทพันธุกรรมของประชากรทั้งสองแหล่งโดยเฉพาะการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศที่เกิดจากมนุษย์น่าจะเป็นสาเหตุหลักของปรากฏการณ์นี้

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปรางและมะยงชิดในครั้งนี้นับเป็นงานชิ้นแรกๆ ในการเปิดเผยลักษณะทางพันธุกรรมของพืชในกลุ่มนี้สำหรับประเทศไทย ข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ของพืชกลุ่มนี้ได้ในอนาคต ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าพืชในกลุ่มมะปรางและมะยงชิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงต้องมีการวางแผนการพัฒนาพืชกลุ่มนี้ในระยะยาวเพื่อส่งเสริมความหลากหลายทางพันธุกรรมให้มากยิ่งขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาในอนาคตสามารถประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุล ทั้ง 4 ชนิดได้ อย่างไรก็ตามควรศึกษาเพิ่มเติมในเครื่องหมายชนิดที่ให้ความละเอียดมากยิ่งขึ้น เช่น เครื่องหมายเอเอฟแอลพี ซึ่งอาจให้ข้อมูลที่แตกต่างกับการศึกษาครั้งนี้ หรือวิเคราะห์โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลเพิ่ม เนื่องจากการศึกษาที่ใช้อะกาโรสเจลเท่านั้นในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ควรเพิ่มตัวอย่างให้ครอบคลุมจากทั่วประเทศ เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นเฉพาะสายพันธุ์ทางเศรษฐกิจ และในบริเวณแหล่งเพาะปลูกทางภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลางเป็นหลัก ซึ่งเป็นแหล่งเพาะปลูกมะพร้าวและมะยงชิดที่สำคัญ เนื่องจากพืชกลุ่มนี้เป็นพืชเฉพาะถิ่นของประเทศ รวมทั้งศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของคุณลักษณะสัณฐานภายนอก เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์พร้อมทั้งอนุรักษ์ ครอบงำประชากรในธรรมชาติเข้ามาศึกษามากขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความทนทานต่อโรค หรือรสชาติที่ดียิ่งขึ้น หากต้องการที่จะแยกมะพร้าวและมะยงชิดออกจากกัน ควรที่จะศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มเติม ถ้าพบว่ามีลักษณะใดที่สามารถระบุความต่างระหว่างมะพร้าวและมะยงชิดได้ จะได้เป็นข้อมูลส่งเสริมในการแยก ซึ่งอาจทำให้เกิดชนิดย่อย (subspecies) ใหม่ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2519. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เคหการเกษตร. 2531. **พืชเศรษฐกิจและพืชสวนของประเทศไทย**. *วารสารพืชสวนคุณภาพของประเทศไทย*. 39: 2-42.
- ณรงค์ แดงเปี่ยม, ปัญญา ทยานานนท์, อนุรักษ์ สุขารมย์, กฤษพร ศรีสังข์, พนิต หมวกเพชร, นรินทร์ พูลเพิ่ม, สุวรรณ ทิพย์เมืองพรหม, เพ็ญจันทร์ สุธานุกูล และวิภาวรรณ ดวนมีสุข. 2553. “โครงการวิจัยการพัฒนาระบบการผลิตพืชเศรษฐกิจในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง.” หน้า 1-3. ใน **รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปงบประมาณ 2553**. พิจิตร. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร.
- เต็ม สมิตินันท์. 2523. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย** (ชื่อพฤกษศาสตร์ – ชื่อพื้นเมือง). กรุงเทพมหานคร : กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 379 น.
- ปฐพีชล วายุอัคคี และสร้อยดี เพ็ญสกันธ์. 2531. **มะปราง**. สหมิตรออฟเซต, กรุงเทพฯ, 54 หน้า.
- ปนัดดา กาญจนะ. 2541. “การจำแนกพันธุ์ลำไยโดยวิธีอเล็กโตรโฟรีซิสและเซลล์พันธุศาสตร์.” *วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*.
- ภาณี เตมีศักดิ์. 2536. **เทคนิค RAPD สำหรับ DNA fingerprinting ในการตรวจแยกสายพันธุ์พืช**. กรุงเทพมหานคร : กรมวิชาการเกษตร.
- ยสินทร์ กิติจันทร์โรภาส และปรียา พวงสำลีหวังสมนึก, 2550. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สิบสามสายพันธุ์ในประเทศไทย”. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 38 (ฉบับพิเศษ) : 19-24.
- เรณูภา พงศ์กระทุง, สรัญญา วัชรโรทัย และประศาสตร์ เกื้อมณี. 2557. “กายวิภาคศาสตร์และคุณสมบัติบางประการของเนื้อไม้สกุลมะปรางวงกลมมะม่วง.” *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*. 6 (ฉบับพิเศษ) : 85-93.
- วิภพ สุทชนะณฐ, ปกรณ์ เดชสุภา และสารี มันเขตต์กรณ์. 2556. “การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดมะปรางและประเมินฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดชนิดที่ไวและดื้อต่อ ยา.” *ศรีนครินทร์เวชสาร*. 28: 100-109.
- วัชร อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ. 2536. **ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology**. กรุงเทพมหานคร : คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยมหิดล,
- ศานนท์ สุขสถาน. 2552. **การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำโดยใช้เทคนิคโมเลกุล Random amplified polymorphic DNA (RAPD)**. นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2557.**

กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อักษรสยามการพิมพ์, 186 น.

สรรพงค์ เบญจศรี. 2554. เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุง พันธุ์พืช. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 39: 350-363.

สุจิตรา จางตรากุล. 2551. **การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ และไอโซเอนไซม์ยีนเพื่อการประเมินสภาพแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้.**

กรุงเทพมหานคร : กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. เอกสารอัดสำเนา.

สุชาดา สุขหรั่ง. 2555. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรร.** กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. “เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช.” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัย อุบลราชธานี*. 5: 37-59.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2552. **การจำแนกพืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, การจำแนกพืชโดย เทคนิคทางชีวโมเลกุล.** มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต. ปทุมธานี 57-58.

อนงค์ ปิณฑวิหค, ศุภวิน วัชรมูล, วิสุทธิ์ นวลชื่น, สุพิชญา ตรีบุญเมือง, กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒน์, กรณิศ พัฒนชัย และสังวร อยู่สว่าง. 2552. การใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟเอลพีเพื่อการประเมินการ เกิดอะพลาทอกซินในข้าวโพดไทยที่ใช้เป็นวัตถุดิบทางปศุสัตว์. *วารสารพืชวิทยาไทย*. 24 (2) : 124-129.

อภิชาติ ศรีสะอาด และจันทรา อู่สุวรรณ (ผู้รวบรวม). 2558. **มะยงชิด มะปรางหวานเงินล้าน.** สมุทรสาคร : โรงพิมพ์นาคา อินเดียมเดีย, 112 น.

อรรธรณ ชลวานิชย์. 2547. “การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ใน ประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิต วิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โองการ วณิชชีวะ และเฟื่องฟ้า สีสร้อย. 2557. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอฟพีและไอพีบี เอสเพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไผ่รวกสยาม. *Thai Journal of Science and Technology*. 3 (1) : 45-56.

Agrawal, G. K., Pandey, R. N. and Agrawal, V.P. 1992. “ Isolation of DNA from Choerospondias asillaris leaves.” *Biotechnology Biodiversity*. 2: 19-24.

Al-Kaab, D.H., Hamdalla, M.S., Dweikat, I. and Al-Saedi, N.J., 2016. “Estimation of the Degree of Diversity for Some Iraqi Wheat Varieties through ISSR, SRAP and RAPD Markers”. *American Journal of Experimental Agriculture*. 11: 1-11.

Bao Liu and Jonathan F. Wendel. 2002. “Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton.” *Molecular Ecology*. 1: 205-208.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bernardo, J.M. 1980. "A Bayesian analysis of classical hypothesis testing (with discussion). In **Bayesian Statistics 1**, Ed. J. M. Bernardo, M. H. DeGroot, D. V. Lindley and A. F. M. Smith, pp. 605-47. Valencia University Press.
- Bhattacharyya Paromik, Kumaria Suman, Kumar Shrawan and Tandon Pramod. 2013. "Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species." *Genetic*. 529: 21-26.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. 1980. "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms." *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.
- Chayamarit, K. 2010. Anacardiaceae. In: **Flora of Thailand**. Ed. Santisuk, T. and Larsen, K., Vol. 10, part 3, pp. 265-329. Prachachon, Bangkok.
- Chen, Y., Zhou, R., Lin, X., Wu, K., Qian, X. and Huang, S. 2008. "ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars." *Aquatic Botany*. 89: 311-316.
- Chen, L., Chen, F., He, S. and Ma, L. 2014. "High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers." *Electronic Journal of Biotechnology*. 17: 268-274.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J. 2009. "Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants." *Plant Molecular Biology*. 27: 86-93.
- Da-Long Guo, Ming-Xiao Guo, Xiao-Gai Hou and Guo-Hai Zhang. 2013. "Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers." *Biochemistry Systematics and Ecology*. 52: 27-32.
- Dice, L.R. 1945. "Measure of the Amount of Ecology Association Between Species." *Ecology society of America*. 26(3) : 297-302.
- Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue". *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Earl, D.A. and Vonholdt, B.M. 2012. "STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method." *Conservation Genetics Resources*. 4: 359-361.
- Faheem Shehzad Baloch, Ahmad Alsaleh, Luis E. Sáenz de Miera, Rüştü Hatipoğlu, Vahdettin Çiftçi, Tolga Karaköy, Mehtap Yıldız and Hakan Özkan. 2015. "DNA based iPBS-retrotransposon markers for investigating the population structure of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Tuekey." *Biochemical Systematics and Ecology*. 61: 44-252.

- Fang, D.Q. and Roose, M.L. 1997. "Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers." *Theoretical Applied Genetics*. 95: 408-417.
- Fernández, M.E., Figueiras, A.M. and Benito, C. 2002. "The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin." *Theoretical Applied Genetics*. 104: 845-851.
- Gálvez-López, D., Hernández-Delgado, S., González-Paz, M., Becerra-Leor, E.N., Salvador-Figueroa, M. and Mayek-Pérez, N., 2009. "Genetic analysis of mango landraces from Mexico based on molecular markers". *Plant Genetic Resources*. 7: 244-251.
- Ge, X.J. and Sun M. 1999. "Reproductive biology and genetic diversity of a crypto viviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and inter simple sequence repeat (ISSR) analysis." *Molecular Ecology*. 8: 2061-2069.
- Ghazali, M.N., Yunus, M.F. and Mohammad, A.L. 2015. "Assessment of genetic relationships within *Bouea* (Anacardiaceae) accessions in Peninsular Malaysia using inter simple sequence repeats (ISSR) markers". *African Journal of Biotechnology*. 14: 76-85.
- Gonzalez, A., Coulson, M. and Brettell, R. (2002). "Development of DNA markers (ISSRs) in mango." *Acta Horticulturae*. 575: 139-143.
- Gorji, A. M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J. 2011. "Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCOT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato." *American Journal of Potato Resources*. 88: 226-237.
- Gottlieb, L.D. 1977. "Electrophoretic evidence and plant systematics." *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 64: 161-180.
- Gunjan Tiwari, Rakesh Singh, Nivedita Singh, Debjani Roy Choudhury, Ritu Paliwal, Ashok Kumar and Veena Gupta. 2016. "Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic diversity and population structure in Kalmegh [*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees]." *Industrial Crops and Products*. 86: 1-11.
- Guo, D.L., Guo, M.X., Hou, X.G. and Zhang, G.H., 2014. "Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers". *Biochem. Syst. and Eco*. 52: 27-32.

- Gupta, M., Chyi, Y-S., Romero-Severson, J. and Owen J.L. 1994. "Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats." *Theoretical. Applied. Genetics*. 89: 998-1006.
- Hamrick, J.L., 1989. "Isozymes and analyses of genetic structure of plant populations." *Plant Biology*. 87-105.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S.L., 1992. "Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species". *New Forest*. 6: 95-124.
- Hirano R, Than H, Watanabe KN. 2010. "Myanmar mango landraces reveal genetic uniqueness over common cultivars from Florida, India, and Southeast Asia." *Genome*. 53 (4) :321-330.
- Hirano, R., Ishii, H., Oo, T.H., Gilani, S.A., Kikuchi, A. and Watanabe, K.N., 2011. "Propagation management methods have altered the genetic variability of two traditional mango varieties in Myanmar, as revealed by SSR". *Plant genetic resources*. 9: 404-410.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P. and Schulman, A.H. 2010, "iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation." *Theoretical Applied Genetics*. 121: 1419-1430.
- Kaur, S., Ford, R., Nicolas, M., Norton, R. and Taylor, W.J.P. 2004. Selection of parents for studying B tolerance in *Brassica rapa*. In *New Directions for a Diverse Planet. Proceedings for the 4th International Crop Science Congress*. Available Source : http://www.regional.org.au/au/asa/2004/poster/3/4/6/651_kaur.htm.
- Kubo, N., Hirai, M., Kaneko, A., Tanaka, D. and Kasumi, K. 2009. "Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*)." *Aquatic Botany*. 90: 191-194.
- Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J., Gao, M. P., Brown, J.S. and Schnell, R.J. 2011. "Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 39: 676-684.
- Li, G and Quiros, C. F. 2001. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*." *Theoretical Applied Genetics*. 103: 455-461.
- Li, M., Zhao, Z. and Miao, X. 2014. "Genetics diversity and relationships of apricot cultivars in north China revealed by ISSR and SRAP markers." *Scientia Horticulturae*. 173: 20-28.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Li, X., Xueping, L., Liyuan, C., Yubing, W., Xiaoling, L. and Faju, C. 2014. "Genetic diversity of endangered *Manglietia patungensis* assessed by inter simple sequence repeat and sequence-related amplified polymorphism markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 57: 231-237.
- Lim, T.K. 2012. **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants**. CBS Publishers, New Delhi, India.
- Luo Cong, He Xin-hua, Chen Hu, Shi-jin Ou, Mei-ping Gao, James Steven Brown, Cecile T. Tondo and Raymond J. Schnell. 2011. "Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 39: 676-684.
- Mahjbi, A., Baraket, G., Oueslati, A., Salhi-Hannachi, A. 2015. "Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species." *Biochemical Systematics and Ecology*. 61: 390-398.
- Mehmood A., Luo S., Ahmad N.M., Dong C., Mahmood T., Sajjad Y., Jaskani MJ. and Sharp P. 2015. "Molecular variability and phylogenetic relationships of guava (*Psidium guajava* L.) cultivars using inter-primer binding site (iPBS) and microsatellite (SSR) markers." *Genetic Resources. Crop Evolution*. 63: 1345-1361.
- Mehmood, A., Luo, S., Ahmad, N.M., Dong, C., Mahmood, T., Sajjad, Y., Jaskani, M.J. and Sharp, P., 2016. "Molecular variability and phylogenetic relationships of guava (*Psidium guajava* L.) cultivars using inter-primer binding site (iPBS) and microsatellite (SSR) markers." *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63 (8) : 1345-1361.
- Mondini, L., Noorani, A. and Pagnotta, M.A. 2009. "Assessing plant genetic diversity by molecular tools." *Diversity*. 1: 19-35.
- Meyer, W., Mitchell, T.G., Freedman, E.Z. and Vilgays, R. 1993. "Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*." *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2274-2280.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H., 1986. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51 (1) : 263-273.

- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K and Takabe, T. 1997. "Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator and possible localization of its protein in peroxisomes." *Plant Journal*. 11 (5) : 1115-1120.
- Nei, M. and Li, W.H. 1979. "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases." *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76 (10) : 5269-5273.
- Ng, W.L. and Tan, S.G. 2015. "Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: are we doing it right?" *Academy of Sciences Malaysia Science Journal*. 9 (1) : 30-39.
- Olsen, M., Hood, L., Cantor, C. and Botstein, D. 1989. "A common language for physical mapping of the human genome." *Science*. 245: 1434-1435.
- Pan, L., Quan, Z., Li, S., Liu, H., Huang, X., Ke, W. and Ding, Y. 2007. "Isolation and characterization of microsatellite markers in the sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)." *Molecular Ecology*. 7: 1054-1056.
- Pasteur, N., Iseki, A. and Georghiou, G.P. 1981. "Genetic and biochemical studies of the highly active esterases A' and B associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* complex." *Biochemical Genetics*. 19: 909-919.
- Paterson, AH, Tanksley, SD, Sorrells, ME. 1991. "DNA markers in plant improvement." *Advances in Agronomy*. 46: 39-90.
- Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J.P.T. and Hyvönen, J. 2013. "Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review." *Plant Methods*. 9: 6.
- Powell, W., Machray, C. and Provan, J. 1996. "Polymorphism revealed by simple sequence repeats." *Trends in Plant Science*. 1: 215-222.
- Pradeep T., Mitra, S., Nair, A.S. and Mukhopadhyay, R. 2002. "Dynamics of alkyl chains in monolayer protected Au and Ag clusters and silver thiolates: A comprehensive QENS investigation." *The journal of Physical Chemistry B*. 108: 7012-7020.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. "Inference of population structure using multilocus genotype data." *Genetics*. 155: 945-959.
- Qian, W., Ge, S. and Hong, D-Y. 2001. "Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers." *Theoretical Applied Genetics*. 102: 440-449.

- Ratnaparkhe, M.B., Tekeoglu, M. and Muehlbauer, F.J. 1998. "Intersimple- sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters." *Theoretical Applied Genetics*. 97: 515-519.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science*. 239: 487-491.
- Sofia Banu, Darshana Baruah, Rasika M. Bhagwat, Purabi Sarkar, Ananya Bhowmick and Narendra Y. Kadoo. 2015. "Analysis of genetic variability in *Aquilaria malaccensis* from Bramhaputra valley, Assam, India using ISSR markers." *Flora*. 217: 24-32.
- Souza I.G.B., Valente S.E.S., Britto F.B., Souza de V.A.B. and Lima P.S.C. 2011. "RAPD analysis of the genetic diversity of mango (*Mangifera indica*) germplasm in Brazil." *Genetics and molecular research*. 10 (4) : 3080-3089.
- Subhadrabandhu, S. 2001. **Under-utilized tropical fruits of Thailand**. part 1, pp. 6-8. FAO Rap publication 2001/26, Rome.
- Talebi, M., Kazemi, M. and Sayed-Tabatabaei, B.E. 2012. "Molecular diversity and phylogenetic relationships of *Pistacia vera*, *Pistacia atlantica* subsp. *mutica* and *Pistacia khinjuk* using SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 44: 179-185.
- Vanijajiva, O. 2011. "Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi Province, Thailand detected by RAPD analysis." *Journal of Agricultural Technology*. 7: 1107-1116.
- Vanijajiva, O. 2012. "Assessment of genetic diversity and relationships in pineapple cultivars from Thailand using ISSR marker." *Journal of Agricultural Technology*. 8: 1829-1838.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." *Nucleic Acids Research*. 11: 4407-4414.
- Williams. J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Wright, S. 1978. **Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations**. The University of Chicago Press, Chicago.

Xu, G.W., Magill, C.W., Schertz, K.F. and Hart, G.E. 1994. "A RFLP map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench." *Theoretical Applied Genetics*, 89 (2-3) : 139-145.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Yildiz, M., Ekbic, E., Keles, D., Sensoy, S. and Abak, K., 2011. "Use of ISSR, SRAP, and RAPD markers to assess genetic diversity in Turkish melons." *Scientia horticulturae*. 130: 349-353.
- Zhang, Y., Huang, G. and Huang, Q., 2016. "Analysis on genetic relationship of some mango (*Mangifera indica* L.) germplasms by SRAP markers and ISSR markers." *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*. 29 (9) : 2045-2051.
- Zhao, W., Fang, R., Pan, Y., Yang, Y., Chung, J. and Park, Y. 2009. "Analysis of genetic relationships of mulberry (*Morus* L.) ermplasm using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers." *African Journal of Biotechnology*. 8 (11) : 2604-2610.
- Yun-Jiang Cheng, Wen-Wu Guo, Hua-Lin Yi, Xiao-Min Pang and Xiuxin Deng. 2003. "An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* Species." *Plant Molecular Biology Reporter*. 21: 177a-g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนใบของตัวอย่าง

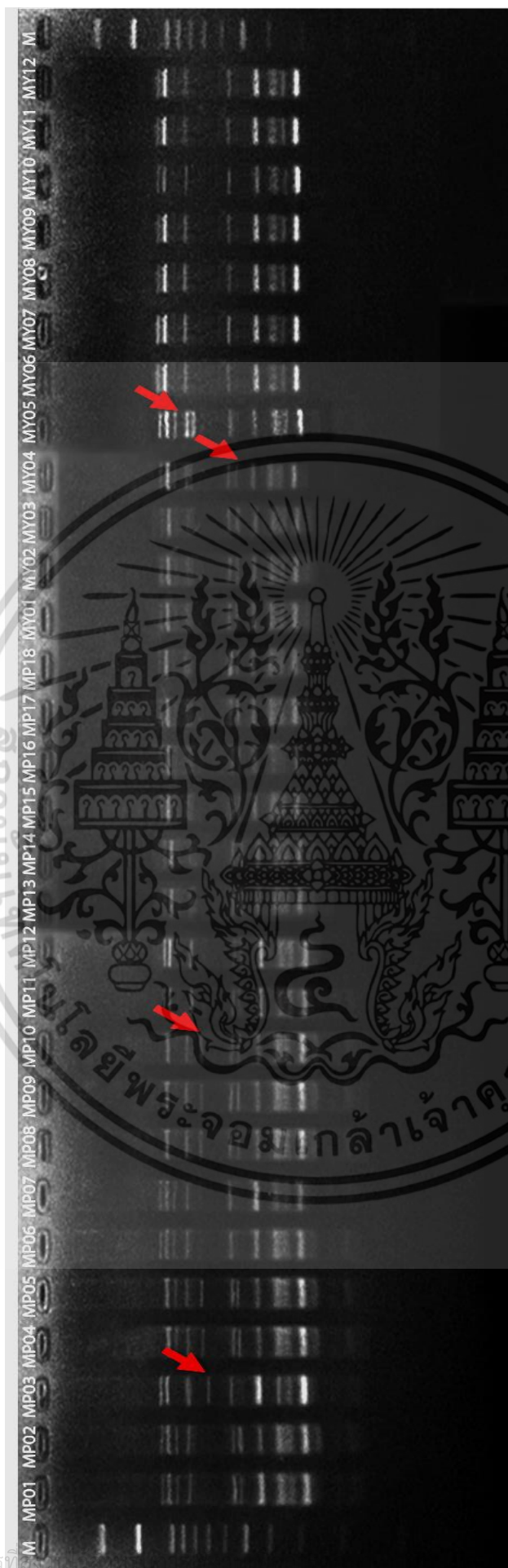
ลำดับ	รหัส ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	A260	A280	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (260/280)
1	MP01	281.5	5.63	3.76	1.5
2	MP02	66.1	1.32	0.75	1.75
3	MP03	53.7	1.07	0.60	1.78
4	MP04	162.2	3.24	1.98	1.65
5	MP05	101.6	2.03	1.17	1.74
6	MP06	49.4	0.99	0.57	1.74
7	MP07	94.5	1.89	0.80	2.36
8	MP08	31.1	0.62	0.37	1.66
9	MP09	40.1	0.80	0.47	1.71
10	MP10	40.8	0.81	0.47	1.72
11	MP11	51.8	1.04	0.63	1.65
12	MP12	429	8.58	5.29	1.62
13	MP13	82.6	1.65	0.99	1.66
14	MP14	566.6	11.33	6.48	1.75
15	MP15	64.1	1.28	0.72	1.77
16	MP16	137.2	2.74	1.56	1.76
17	MP17	195.4	3.91	2.40	1.63
18	MP18	126.9	2.54	1.45	1.75
19	MY01	138.6	2.77	1.81	1.53
20	MY02	150	3.00	1.75	1.71
21	MY03	201.8	4.04	2.98	1.35
22	MY04	123.5	2.47	1.95	1.27
23	MY05	129.2	2.58	1.73	1.49
24	MY06	60.9	1.22	0.68	1.79
25	MY07	117.2	2.34	1.33	1.75
26	MY08	119.5	2.39	1.37	1.74
27	MY09	178.2	3.56	1.93	1.83
28	MY10	116.1	2.32	1.34	1.73
29	MY11	117.4	2.35	1.33	1.76
30	MY12	166.9	3.34	1.93	1.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



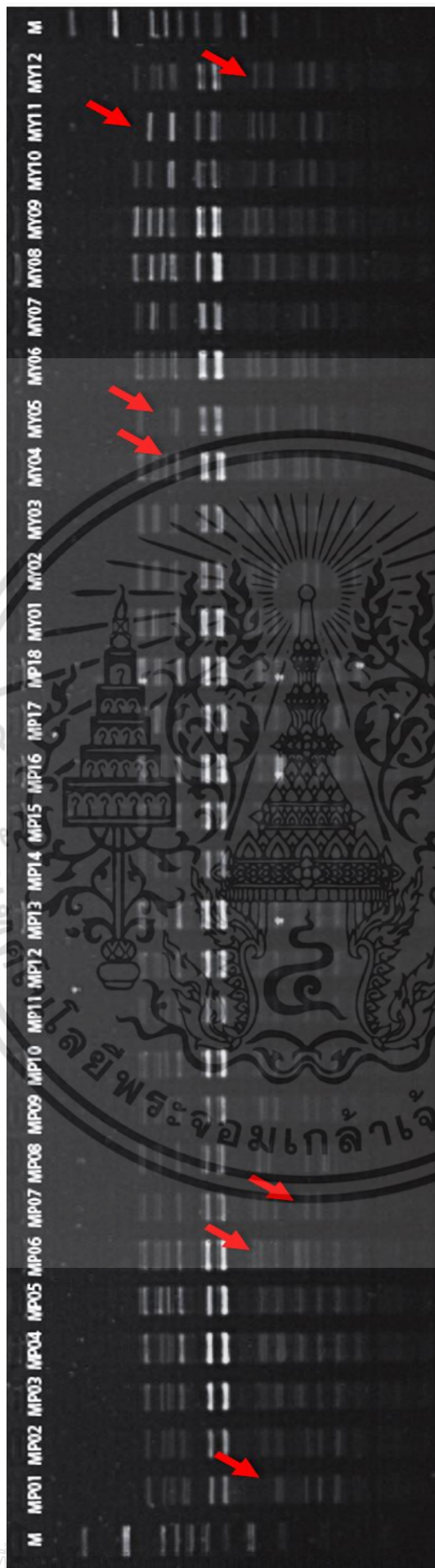
ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาพผนวกที่ 1 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของมะพร้าว (MP) และมะยงชิด (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ UBC807
เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่... วัตถุประสงค์ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาพผนวกที่ 2 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของมะพร้าว (MP) และมะขงชิด (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายไอทีบีเอสโดยใช้ไพรเมอร์ 2380

เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีอนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า



รูปภาพผนวกที่ 3 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของมะพร้าว (MP) และมะยมขี้ต (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายเอสซีไอที่ใช้โดยผู้ใช้ไฟรเมอร์ SCOT03
เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน

อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาพพัฒนาที่ 4 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของมمبرาง (MP) และมมยงชิต (MY) จำนวน 30 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายเอสอาร์เอพีที่ใช้พรเมอร์ ME3EM3

เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสมบัติ แก้วผ่องอำไพ
วัน เดือน ปีเกิด	15 มีนาคม พ.ศ.2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	69/560 พระยาสุเรนทร์ 35 แขวงบางชัน เขตคลองสามวา กรุงเทพฯ 10510
ประวัติการศึกษา	(2557) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา เกรตเฉลี่ย 3.58 มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร (2560) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรตเฉลี่ย 3.21 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนประเภทยกเว้นค่าธรรมเนียบการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
รางวัลที่ได้รับ	โปสเตอร์ยอดเยี่ยม จากงานประชุมวิชาการ International Conference on Biodiversity เมืองบาหลีปาปัว ประเทศอินโดนีเซีย ณ. วันที่ 14-16 มกราคม พ.ศ.2559.
ผลงานทางวิชาการ	1. สมบัติ แก้วผ่องอำไพ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และองการ วณิชชีวะ. 2558. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อ ประเมินลักษณะทางพันธุกรรมของมะปราง. <i>วารสารเกษตรพระจอมเกล้า</i> . 194-200. 2. Sombhat Kaewpongumpai, Supattra Poeaim and Ongkarn Vanijajiva. 2016. “Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) analysis for studying genetic characterization of <i>Bouea macrophylla</i> .” <i>Biodiversitas</i> . 17 (1) : 539-543. 3. Sombhat Kaewpongumpai, Supattra Poeaim and Ongkarn Vanijajiva. 2016. “Molecular variability of <i>Bouea macrophylla</i> cultivars using inter-primer binding site (iPBS) marker.” <i>The 5th International Biochemistry and Molecular Biology Conference</i> . 237-240.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ผลงานทางวิชาการจากงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อประเมินลักษณะทางพันธุกรรมของมะปราง
Application of molecular markers to assess genetic characterization in *Bouea macrophylla*

สมบัติ แก้วผ่องอำไพ¹ สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม¹ และองการ วณิชชาวีระ²
Sombhat Keawpongumpai¹ Supattra Poeaim¹ and Ongkarn Vanijajiva²

บทคัดย่อ

เครื่องหมายทางพันธุกรรมนับว่าเป็นเครื่องมือสำคัญในการวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่สำคัญ โดยเฉพาะการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคไอพีบีเอส (inter primer binding site) และไอเอสเอสอาร์ (Inter simple sequence repeats) เพื่อตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของมะปรางเบื้องต้น โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมาใช้ในการศึกษา พบว่าในการทำพีซีอาร์ที่เหมาะสมมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอมะปรางต้นแบบ 100 ng และ MgCl₂ 5 mM จากการทดสอบโดยเทคนิคไอพีบีเอสใช้ไพรเมอร์ 20 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมะปรางได้ทั้งหมด 179 แถบโดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 8.95 แถบ จากการทดสอบโดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ 13 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมะปรางได้ทั้งหมด 83 แถบโดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 6.38 แถบ สรุปได้ว่าเทคนิคไอพีบีเอส และไอเอสเอสอาร์เป็นเทคนิคที่ทำการศึกษาง่ายและรวดเร็วสามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของพืชกลุ่มมะปรางได้

คำสำคัญ: เครื่องหมายโมเลกุล มะปราง ไอพีบีเอส ไอเอสเอสอาร์

Abstract

Molecular marker is an important tool in biological research, particularly of genetic diversity and evolution of organisms. In this study, iPBS (inter primer binding site) and ISSR (Inter simple sequence repeats) markers were preliminary applied to assess genetic characterization of *Bouea macrophylla*. Genomic DNA was extracted from fresh leaf samples. The result clearly showed that at 100 ng template DNA and MgCl₂ 5 mM concentration are suitable for further PCR analysis. Twenty primers of iPBS makers were primarily screened for analysis and all primers were chosen for further analysis. For iPBS technique, DNA band was 179 DNA fragments by 8.95 per DNA primers. Thirteen primers of ISSR makers were applied for further analysis which DNA band was 83 DNA fragments by 6.38 per DNA primer. Therefore, iPBS and ISSR are simply, rapid and suitable methods for analysis of genetic study for *Bouea* species.

Keywords: Molecular marker, *Bouea macrophylla*, iPBS, ISSR

คำนำ

มะปราง (*Bouea macrophylla* Griffith) เป็นพืชที่อยู่อาศัยอยู่ในวงศ์มะม่วงหิมพานต์ (Anacardiaceae) มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เจริญเติบโตได้ดีในแถบภูมิอากาศเขตร้อนชื้น มะปรางเป็นไม้ผลยืนต้นขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นพุ่มทรงกลม ใบเรียวยาว ผลมีทั้งรสชาติหวานและเปรี้ยวหรือเปรี้ยวอมหวาน มะปรางมีสรรพคุณทางยา พบว่าเมล็ดของมะปรางมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ (วิภพ และคณะ, 2556) รวมทั้งมีรสชาติดีร่อยและมีคุณค่าทางอาหารสำคัญ ปัจจุบันนับเป็นผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทย นิยมปลูกกันในแถบภาคกลาง โดยเฉพาะจังหวัดนครนายก และจังหวัดนนทบุรี รวมทั้งมีการส่งเสริมเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เข้ามามีบทบาทในศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการรวมทั้งในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์เศรษฐกิจ โดยการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตเดิมใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้เกิดข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (สรพวงค์, 2554) อาจ

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10220

ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลสามารถจึงเป็นเครื่องมือในการช่วยบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตที่มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น (สุริพร, 2546; Paterson *et al.*, 1991)

เทคนิคไอพีบีเอส (IPBS, inter primer binding sites) เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลรูปแบบใหม่พัฒนาขึ้นโดย Kalendar *et al.* (2010) อาศัยหลักการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากการใช้รูปแบบของไพรเมอร์ที่มีขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์บริเวณ tRNA เข้าไปผสมจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของ long terminal repeat (LTR) บริเวณ retrotransposon ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอมักเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่ายพบในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาติโอดทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชแทบทุกชนิด ดังนั้นข้อดีของเทคนิคนี้คือผู้วิจัยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อนทำได้ง่ายไม่ซับซ้อนให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่ความคงตัวสูง

เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR: Inter Simple Sequence Repeat) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) 2 ตำแหน่ง ไมโครแซทเทลไลท์คือชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วย 1-6 นิวคลีโอไทด์พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไมโครแซทเทลไลท์พบกระจายแบบไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และส่วนใหญ่พบในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) ซึ่งความผันแปรจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในจีโนมสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (สุรินทร, 2540) เทคนิคไอเอสเอสอาร์ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสเช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอฟดีเอ็มหลักการคือใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นไมโครแซทเทลไลท์และเติมนิวคลีโอไทด์คัดเลือก โดยไพรเมอร์จะเข้าจับกับไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง ใกล้เคียงกันแล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 2 ตำแหน่งนั้น

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เครื่องมือทางโมเลกุล โดยเทคนิคไอพีบีเอส และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ เพื่อศึกษาเป็นข้อมูลเบื้องต้นของลักษณะทางพันธุกรรมของมะปราง เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิคไอพีบีเอส และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ในการสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะปรางต่อไป

อุปกรณ์วิธีการ

นำส่วนของใบอ่อนมะปราง จำนวน 100-150 กรัม มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น บดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบโดยใช้สารละลาย CTAB ดัดแปลงตามวิธีของโองการ (2555) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) เข้มข้น 0.8 % การตรวจสอบโดยเทคนิคไอพีบีเอสนำดีเอ็นเอมะปรางที่สกัดได้มาทดสอบเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้นตาม Table 1 โดยปริมาณสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย 10x Promega reaction buffer (100mM Tris-HCl pH 9, 500 m MKCl, 1% Triton X-100) 2.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, 2.5 mM dNTP4 μ l, 100 μ M primer 2 μ l, 500 unit (5 unit / 1 μ l) Taq DNA polymerase (Promega), 50 ng, ดีเอ็นเอมะปราง 2 μ l จากนั้นปรับปริมาณให้ได้ 25 μ l ด้วยการเติมน้ำกลั่นแล้วนำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ThermoHybaid PX2 ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ initiation denaturation อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 45-50 °C นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ การตรวจสอบโดยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับเทคนิคไอพีบีเอสเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้นในตารางที่ 2 แต่ปรับอุณหภูมิและรอบในการทำพีซีอาร์ดังนี้เริ่มด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ 52 °C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 °C นาน 8 นาที จำนวน 1 รอบ ทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจล เข้มข้น 1.8 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เทียบกับดีเอ็นเอขนาด 100 bp โดยตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 Code, sequence and nucleotide length of primers used in the iPBS analysis

primer	sequence (5'-3')	primer	sequence (5'-3')
2081	GCA ACG GCG CCA	2380	CAA CCT GAT CCA
2272	GGC TCA GAT GCC A	2392	TAG ATG GTG CCA
2076	GCT CCG ATG CCA	2393	TAC GGT ACG CCA
2077	CTC ACG ATG CCA	2394	GAG CCT AGG CCA
2079	AGG TGG GCG CCA	2273	GCT CAT CAT GCC A
2080	CAG ACG GCG CCA	2277	GGC GAT GAT ACC A
2083	CCT CTA GCG CCA	2279	AAT GAA AGC ACC A
2085	ATG CCG ATA CCA	2382	TGT TGG CTT CCA
2374	CCC AGC AAA CCA	2389	ACA TCC TTC CCA
2378	GGT CCT CAT CCA	2391	ATC TGT CAG CCA

Table 2 Code, sequence and nucleotide length of primers used in the ISSR analysis

primer	sequence (5'-3')	primer	sequence (5'-3')
UBC801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	UBC824	CTC TCT CTC TCT CTC CG
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC811	GAG AGA GAGAGA GAG AC	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CA
UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	UBC861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	UBC863	AGT AGT AGT AGT AGT AGT
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	UBC868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
UBC819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	UBC870	TGC TGC TGC TGC TC TGC
UBC820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A
UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	UBC881	GGG TGG GGT GGG GTG

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาการสกัดดีเอ็นเอของมะพร้าวด้วยวิธี CTAB โดยการสกัดตามวิธีประยุกต์ของโองการ (2555) พบว่าดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดีใช้เวลาในการสกัดน้อยสามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวันและควรสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนจะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่สามารถนำไปใช้ในการทดลองได้ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถปรับเปลี่ยนปริมาณสารในขั้นต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับพืชชนิดอื่นได้ง่ายและราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับน้ำยาสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ โดยจากการสกัดดีเอ็นเอในครั้งนี้พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นแตกต่างกันโดยเมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทียบอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ผลไม่ต่างกันใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งหามิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดค่าความบริสุทธิ์และค่าความเข้มข้นนั้นพบว่าค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสามารถหาได้จากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280นาโนเมตรแล้วเปรียบเทียบผลพบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 1.62 ถึง 1.93 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์เหมาะแก่การนำไปศึกษาถ้าค่าดีเอ็นเอที่ได้เท่ากับ 1.5 หรือต่ำกว่าแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มากและถ้าค่าที่ได้เท่ากับ 2.0 หรือมากกว่าแสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่มาก อาจต้องนำกลับไปกำจัดด้วย Rnase (โองการ และเฟื่องฟ้า, 2557) จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์มีลักษณะเป็นแถบชัดเจนเพียงแถบเดียว

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมะพร้าว ด้วยเทคนิคไอพีบีเอส โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 20 ชนิด ที่มีปริมาณ G+C ตั้งแต่ 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เพื่อใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมะพร้าว พบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอพีบีเอส โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ และเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยวิธี อากาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ต้นแบบของมะพร้าว 50 ng/ μ ให้ลักษณะแถบของดีเอ็นเอที่ชัดเจน ไพรเมอร์ที่ใช้ทั้ง 20 ไพรเมอร์ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมะพร้าวได้ทั้งหมด 179 แถบ เฉลี่ย 8.95 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ และพบว่าขนาดของแถบดีเอ็นเอจะอยู่ในช่วง 180 – 2,000bp (Figure 1–2)

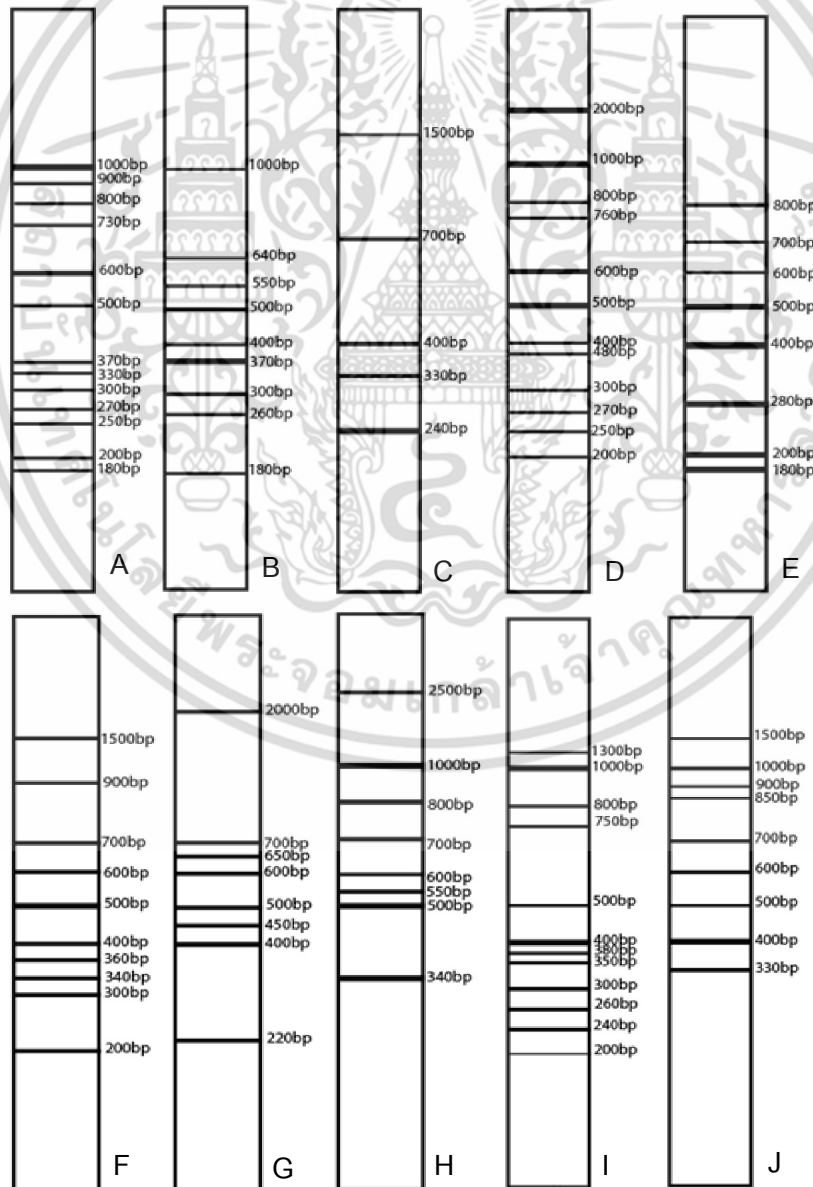


Figure 1 DNA profiles of iPBS primers: A 2081, B 2272, C 2076, D 2077, E 2079, F 2080, G 2083, H 2085, I 2374, J 2378. ทั้งห้ามีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

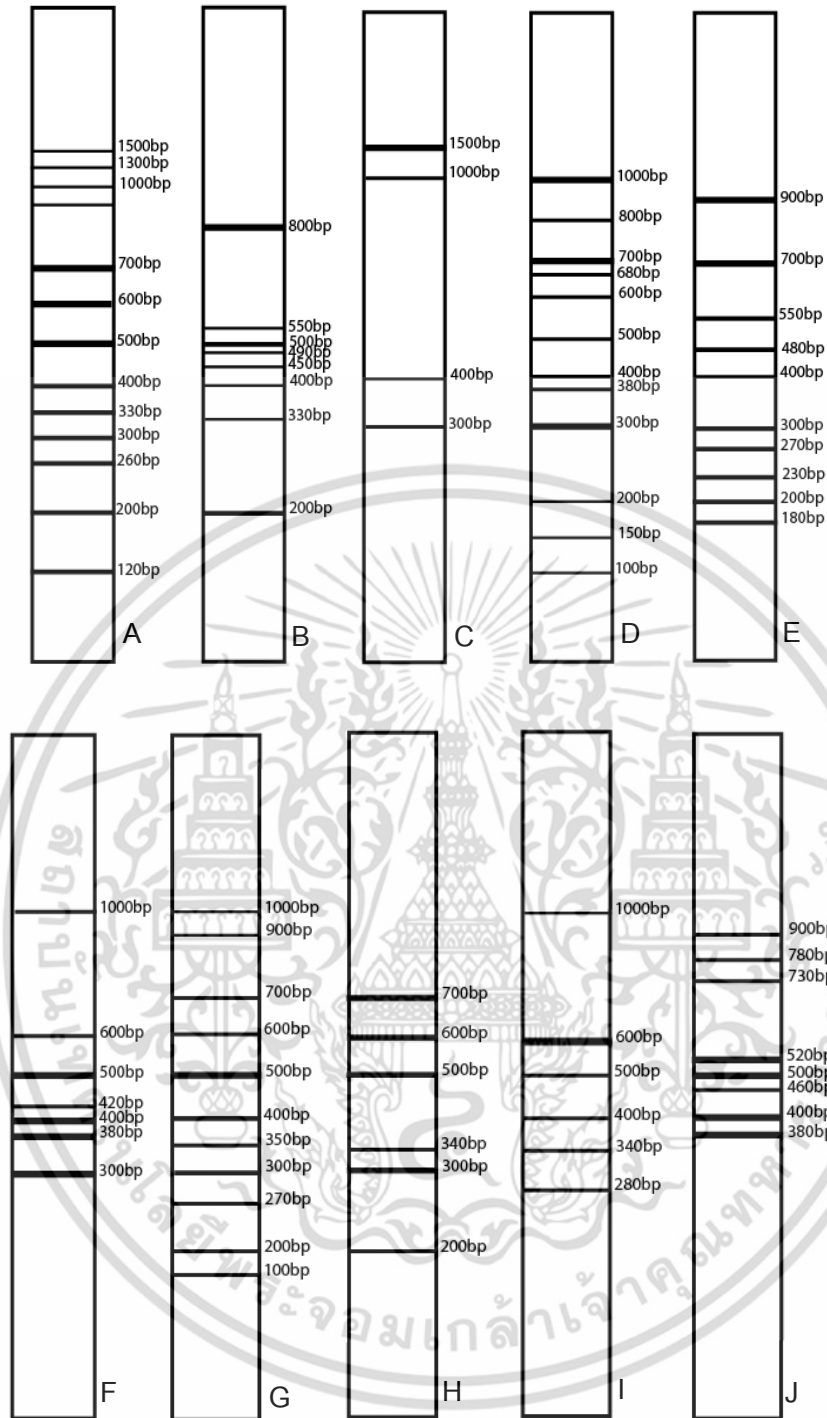


Figure 2 DNA profiles of iPBS primers: A 2380, B 2392, C 2393, D 2394, E 2273, F 2277, G 2279, H 2382, I 2389, J 2391.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

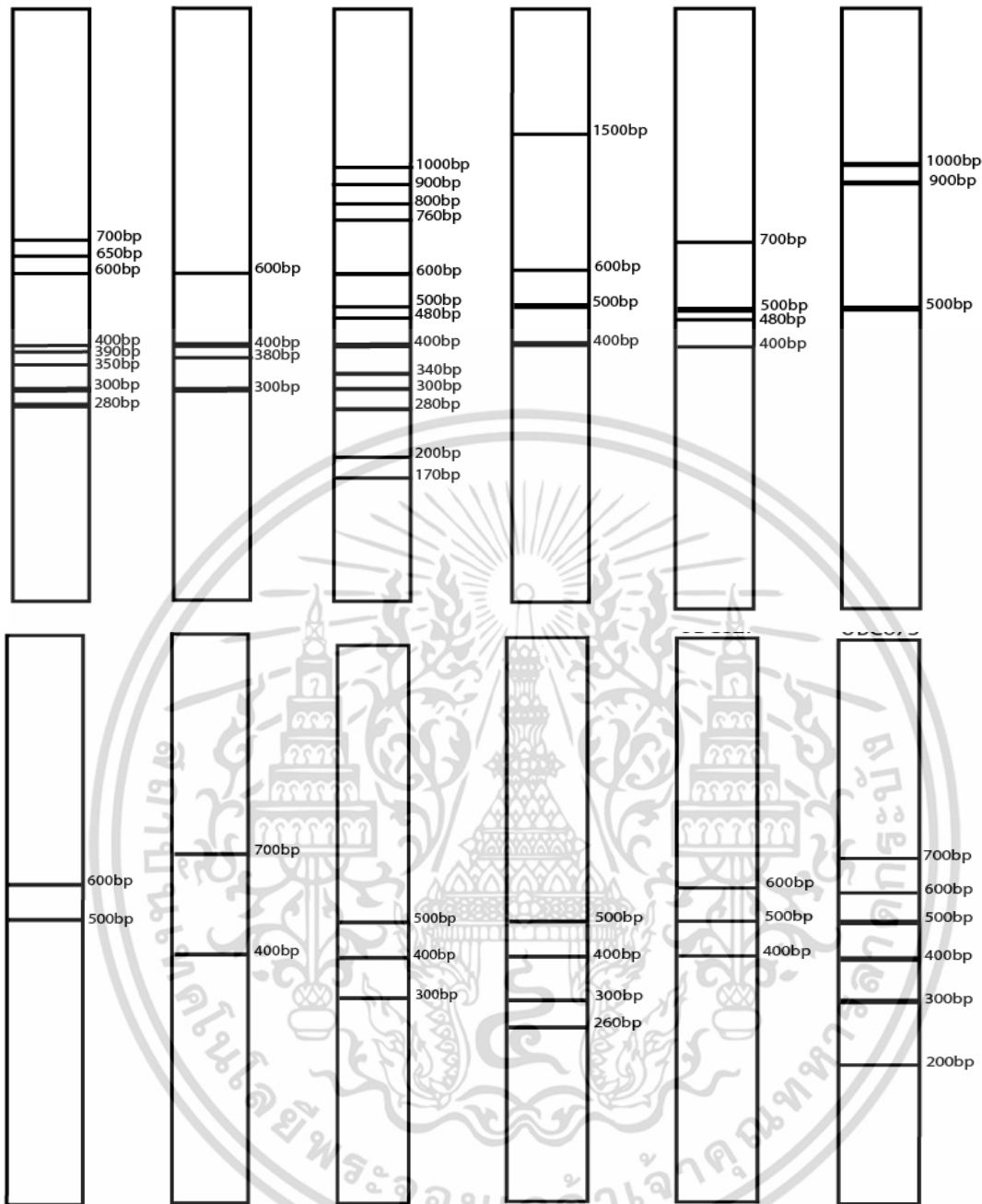


Figure 3 DNA profiles of ISSR primers: A (UBC807), B (UBS810), C (UBC811), D (UBC815) E (UBC817), F (UBS819), G (UBC822), H (UBC824), I (UBC825), J (UBC826), K (UBC827), L (UBC873).

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมะปราง โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ทั้ง 20 ชนิด ที่มีปริมาณ G+C ตั้งแต่ 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เพื่อใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอของมะปราง พบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ และเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยวิธีอากาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส นำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ มะปรางต้นแบบ 50 ng/ μ l ให้ลักษณะแถบของดีเอ็นเอที่ชัดเจน ไพรเมอร์ที่ใช้สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 12 ไพรเมอร์จาก 20 ไพรเมอร์ และสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมะปรางได้ทั้งหมด 83 แถบ เฉลี่ย 6.91 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ และพบว่ามีความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอ โดยจะอยู่ในช่วง 170–1,500 bp จากการวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Luo *et al.*, (2011) ที่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ในการศึกษามะม่วงของประเทศจีน อย่างไรก็ตามพบว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์ยังไม่เคยมีการประยุกต์ใช้กับมะปรางมาก่อนเช่นเดียวกับเทคนิคไอพีบีเอส โดยทั้งสองเทคนิคเป็นเทคนิคที่ทำการศึกษาง่ายและรวดเร็วสามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของพืชกลุ่มมะปรางได้

สรุปผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอทำโดยใช้ CTAB ซึ่งดัดแปลงวิธีการมาจากวิธีการของโองการ (2555) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชหลายชนิดเนื่องจากได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดีใช้เวลาในการสกัดน้อยสามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวันและควรสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนจะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่ การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลของมะปรางโดยเทคนิคไอพีบีเอสจำนวน 20 โพรเมอร์พบว่าให้แถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด 179 แถบเฉลี่ย 8.95 แถบต่อโพรเมอร์สำหรับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ใช้โพรเมอร์ทั้งหมด 13 โพรเมอร์พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของมะปรางได้ทั้งหมด 83 แถบโดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 6.38 แถบดีเอ็นเอต่อโพรเมอร์ส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 100–2,000 คู่ ดังนั้นสรุปได้ว่าเทคนิคไอพีบีเอสและเทคนิคไอเอสเอสอาร์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในพืชวงศ์มะปรางได้ดีและเหมาะที่จะนำไปศึกษาพืชกลุ่มนี้ต่อไปในอนาคตเนื่องจากการทดลองได้ง่ายให้รูปแบบแถบของดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูงและราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร สำหรับการสนับสนุนในทุกด้าน

เอกสารอ้างอิง

- วิภาพ สุทธรณนุช ปกรณี เดชสุภา และลำรี มั่นเขตต์กรณ์. 2556. การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดมะปรางและประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและมะเร็งปอดชนิดที่ไวและดื้อต่อยา. ศรีนครินทร์เวชสาร. 28:100-109.
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5:37-59.
- สุรินทร์ ปิยโชคนากุล. 2540. การจำแนกพืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, การจำแนกพืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี หน้า 57-58.
- สรรพศรี เบญจศรี. 2554. เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิทยาศาสตร์ มช. 39:350-363.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. การผลิตการตลาดมะปรางจังหวัดนครนายก ปีการผลิต 2553. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.
- โองการ วณิชชาวีระ. 2555. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับต่ำของกระชายกระบี่พืชเฉพาะถิ่นที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดี. Thai J. Genet. 5(1): 63-75.
- โองการ วณิชชาวีระ และ เฟื่องฟ้า สีสร้อย. 2557. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอฟดีและไอพี บีเอสเพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไม้รวกสยาม. Thai J. Sci. Tech. 3: 45 – 56.
- Luo, C., He, X. H., Chen, H., Ou, S. J., Gao, M. P., Brown, J. S. and Schnell, R. J. 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. Biochem. Syst. Ecol. 39: 676-684.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P. and Schulman, A.H., 2010, iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theor. Appl. Genet. 121: 1419–1430.
- Paterson, AH, Tanksley, SD, Sorrells, ME. 1991. DNA markers in plant improvement. Adv. Agr. 46: 39–90.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) analysis for studying genetic characterization of *Bouea macrophylla*

SOMBHAT KAEWPONGUMPAI¹, SUPATTRA POEAIM¹, ONGKARN VANIJAJIVA²

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

² Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University, Bangkok, 10220, Thailand. Tel./fax. +66-271-663375, ✉email: vanijajiva@gmail.com

Manuscript received: 17 December 2015. Revision accepted: 29 June 2016.

Abstract. *Kaewpongumpai S, Poeaim S, Vanijajiva O. 2016. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) analysis for studying genetic characterization of Bouea macrophylla. Biodiversitas 17: 539-543. Bouea macrophylla* Griff. is well-known as one of native typical fruits in Southeast Asia which needs to be preserved and continuously cultivated because of economical and ecological significances. More recently, sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers have been developed, which are used to amplify coding regions of DNA with primers targeting open reading frames. This technique has proven to be robust and highly variable and is attained through a significantly less technically demanding process. In this research, SRAP method was preliminary applied to assess genetic characterization of *B. macrophylla*. Genomic DNA was extracted from fresh leaf samples. The result clearly showed that at 100 ng template DNA and MgCl₂ 5 mM concentration are suitable for further PCR analysis. Thirty SRAP primer combinations were initially screened for analysis and 26 primer combinations were chosen for further analysis. A total of 222 DNA fragments, varying from 90-2500 bp, were amplified. The produced band number for each optimal primer set ranged from 3 to 12 with a percentage of polymorphic bands spanning from 33.33 to 80.00%. Therefore, SRAP analysis is suitable for further analysis method on genetic study of *Bouea* species and related genera.

Keywords: *Bouea macrophylla*, SRAP, genetic characterization

INTRODUCTION

Bouea macrophylla Griff. is a tropical fruit tree indigenous to Southeast Asia. The species belongs to the cashew family (Anacardiaceae) (Chayamarit 2010). In appearance it closely resembles the mango, to which it is related, but its size, foliage and fruit are all smaller. It is commonly known as Marian plum or plum mango, also called ramania or gandaria in Indonesia and kundang, rembungia or setar in Malaysia, mayun in Myanmar, and maprang, mayong or mayongchid in Thailand, respectively (Lim 2012; Rajan et al. 2014). The species is one of the oldest fruit crops, which has been cultivated in Southeast Asia region for more than hundred years. The immature fruit is pale green when the fruit is small and becomes dark green as the fruit develops. The ripe fruit is yellow-orange, mango-like in character, roundish, and juicy with a sour to sweet taste according to the variety, and has a faint turpentine smell. There is one seed in a fruit; the seed is similar to that of the mango but smaller in size (Rifai 1992). The endosperm is white and pinkish purple, and has a bitter and astringent taste. Ripe fruits are consumed fresh, but sometimes they are made of whole or pieces of fruit in sugar syrup. On the other hand, unripe fruits are also consumed by local people as an ingredient of chillies paste as well as traditional salad dish. Many researchers found that an extract of unripe and ripe fruit exhibited various bioactive compound and antioxidant activity (Khoo et al. 2008; Rajan et al. 2014, 2016).

With the introduction of sweet-flesh ripe fruits, *B. macrophylla* has received more attention in recent years. This edible fruit species may have good potential for commercial development if subjected to more research on marketing and postharvest storage. Marian plum is gaining popularity among local consumers in recent years particular in ASEAN countries. The Thai government, for example, is trying to help in exporting this fruit as many exporter firms have started to advertise Marian plum fruit for export. This suggests that *B. macrophylla* has good prospects for wider commercialization. Over the centuries, various *B. macrophylla* cultivars have arisen in Thailand. The plant is normally cultivated in small-scale mixed orchards and is usually grown together with other economic crops and usually sold at local markets when in season (Subhadrabandhu 2001). *B. macrophylla* used to be grown with mixed results from seeds of trees bearing superior quality fruit, but are now propagated by layering, or more commonly, by grafting, including bud, veneer, wedge, whip or grafting onto seedlings of randomly selected rootstocks. One of the reasons for this is the selection of cultivars with high quality fruits. Growers in the central and lower northern regions of Thailand cultivate these high quality Marian plum cultivars in their orchards. More than 50 *B. macrophylla* cultivars have been named in Thailand. However, the difference between its cultivars is practically not studied. There is not much information available on the genetic characterization between cultivated Marian plum cultivars in Thailand.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Knowledge of genetic characterization within crop species is a fundamental resource, which has been employed in breeding programs for the improvement of the crops. Detection of polymorphism among germplasm collections for selected species will provide insight into the genome evolution, origin of cultivated species, and current level of diversity in modern agricultural crops. One of the most promising is the molecular marker technique as it offers great possible to the analysis of plant genetic structure, diversity, and functionality that are required for marker assisted breeding schemes. Nowadays, molecular markers have been incorporated in conventional breeding programs or utilized as a substitute for conventional phenotypic selection on the assumption that efficiency and precision of the genetic improvement could be greatly increased. The available molecular marker techniques include random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), inter primer binding site (iPBS), inter simple sequence repeat (ISSR), and simple sequence repeat (SSR) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (Agarwal et al. 2008; Kalendar et al. 2010; Zheng et al. 2015). Of these, the SRAP technique is recognized as a simple, efficient, and cost-effective marker system that could be used in multiple molecular biology studies, including genetic-diversity analysis, genomic and cDNA fingerprinting, map construction, gene tagging, and map-based cloning. Compared to other marker systems, this technique is specifically targeted to genome open reading frame (ORF) sequences, which provide more genetic information associated with phenotypes. For successful application of SRAP, the most critical step is the selection of optimal forward and reverse primer pairs that permit an effective polymorphism characterization of various fruit species, such as apple (Si et al. 2010), pear (Zhang et al. 2013), citrus (Hazarika et al. 2014) and guava (Padmakar et al. 2015).

The objectives of this study was to survey the variability of *B. macrophylla* collected from major cultivated area in Thailand and to evaluate the availability of SRAP technique in terms of genetic characterization and significant marker-trait associations, aiming to profile these cultivars properly for further utilize. Currently, no specific SRAP marker is available for Anacardiaceae including this species, and the development of a new marker for this species would be time-consuming and costly. Therefore a more practical approach is to use SRAP marker on *Bouea*. To our knowledge, this is the first report on application of SRAP marker to detect variations among *Bouea* species and related genera.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Bouea macrophylla was mainly collected from central and lower northern regions of Thailand (Table 1). As for the 30 accessions collected in our survey, 29 samples are under cultivation and one sample (MP18) is uncultivated. The obtained fresh leaves were stored at -20 °C until further processing.

Table 1. The names *Bouea macrophylla* cultivar and origins of samples for SRAP analysis

Cultivar name	Origin	Code
Maprang-Mae Anong	Nakhon Nayok, Thailand	MP01
Maprang-Thong Nopparat	Nakhon Nayok, Thailand	MP02
Maprang-Thong Yai	Nakhon Nayok, Thailand	MP03
Maprang-Maha Chanok	Nakhon Nayok, Thailand	MP04
Maprang-Suwan Nabat	Nakhon Nayok, Thailand	MP05
Maprang-Chao Sua	Nakhon Nayok, Thailand	MP06
Maprang-Lung Chit	Nakhon Nayok, Thailand	MP07
Maprang-Waan Yai	Phetchabun, Thailand	MP08
Maprang-Waan Thong	Phetchabun, Thailand	MP09
Maprang-Patum Thong	Sukothai, Thailand	MP10
Maprang-Rung Arun	Prachinburi, Thailand	MP11
Maprang-Phet Wan Yao	Kamphaengphet, Thailand	MP12
Maprang-Waan Kom	Kamphaengphet, Thailand	MP13
Maprang-Puang	Phetchabun, Thailand	MP14
Maprang-Phet Noppakao	Kamphaengphet, Thailand	MP15
Maprang-Cheong Lan	Kamphaengphet, Thailand	MP16
Maprang-Yai	Phetchabun, Thailand	MP17
Maprang	Ayutaya, Thailand	MP18
Mayongchid-Suan Waan	Nakhon Nayok, Thailand	MY01
Mayongchid-Chit Sanga	Nakhon Nayok, Thailand	MY02
Mayongchid-Tan Kao	Nakhon Nayok, Thailand	MY03
Mayongchid-Bang Khun Non	Nakhon Nayok, Thailand	MY04
Mayongchid-Tan Tawai	Nakhon Nayok, Thailand	MY05
Mayongchid-Tadaan	Nakhon Nayok, Thailand	MY06
Mayongchid-Tan Kao	Lopburi, Thailand	MY07
Mayongchid-Neang Siam	Sukothai, Thailand	MY08
Mayongchid-Mae Ya	Sukothai, Thailand	MY09
Mayongchid-Bang Khun Non	Kamphaengphet, Thailand	MY10
Mayongchid-Phet Kang Dong	Kamphaengphet, Thailand	MY11
Mayongchid-Phet Cheong Lan	Kamphaengphet, Thailand	MY12

Genomic DNA isolation

Total genomic DNA was extracted individually from young leaves of 30 accessions using the CTAB method (Doyle and Doyle, 1987) with minor modification. The leaves (500 mg) were ground in a mortar with a pestle. Extraction buffer [(1% (w/v) CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 0.7 M NaCl, 0.1% β -mercaptoethanol)] 500 μ L was added and the solution was incubated at 60 °C for 30 min. The homogenate was mixed with 25: 24: 1 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (v/v/v) by gentle inversion. After centrifugation at 13,000 rpm for 15 min, the upper aqueous layer was transferred to a fresh tube. RNA was removed by treating with 2.5 μ L of the RNase (10 μ g/ μ l) for 30 min at 37 °C. The extraction of DNA with phenol/chloroform/isoamyl alcohol was repeated one more time. DNA in the solution was precipitated with 0.6 volume of ice-cold isopropanol and washed with 70% ethanol. Following this, the DNA was extracted using CTAB DNA extraction protocol without RNase. The process was repeated until the DNA pellet was free of color (two to three times) and the final pellet was dissolved in sterile deionized water. DNA quality and quantity were determined on 0.8% agarose gel. The DNA was stored at -20 °C, for further use as templates for PCR amplification. The quality of DNA was also evaluated by reading the absorbance at 260 and 280 nm.

Table 1. SRAP primers used in this study

Forward primer	Sequence (5'-3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
me4	TGAGTCCAAACCGGACC
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
Reverse primer	Sequence (5'-3')
em1	GACTGCGTACGAATTAAT
em2	GACTGCGTACGAATTTGC
em3	GACTGCGTACGAATTGAC
em4	GACTGCGTACGAATTTGA
em5	GACTGCGTACGAATTAAC
em6	GACTGCGTACGAATTGCA

SRAP analysis

Primers pairs used in this study were synthesized by Ward Medic Ltd., Part. Thailand (Table 1). The PCR was performed using a Thermohybrid Px2 (Roche Molecular Systems, Inc., USA). The PCR reaction mixtures (25 µL total volumes) consisted of 10x Reaction Buffer, 100 ng template DNA, 0.6 mM dNTP mixture, 5 mM MgCl₂, 1 unit of Taq polymerase and 0.6 µM of each primers. The SRAP amplification conditions were 5 min initial denaturation at 94°C and 5 cycles consisting of 1 min denaturation at 94°C, 1 min primer annealing at 35°C, and 2 min extension at 72 °C. In the following 30 cycles, the annealing temperature was increased to 50°C and a final 8 min extension at 72 °C.

The SRAP products were all analysed by agarose (1.8% w/v) gel electrophoresis at 150 volts for 30 minutes in 0.04 M TAE (Tris-acetate 0.001 M-EDTA) buffer pH 8. The gels were stained with ethidium bromide (10 mg/ml). The gels were viewed and photographed by Bio-Imaging System (Syngene, Genenguis). To determine SRAP profiles, the size of each DNA band was inferred by comparison with a 100 bp DNA ladder (Promega), used as a molecular weight marker (M). Polymorphisms at all loci were confirmed by three repeating tests for each primer at different times.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA isolation and optimization of SRAP-PCR parameters

The extraction of high quality DNA from *Bouea macrophylla* is challenging because presence of high polyphenolics in the tissues. A high throughput DNA extraction protocol is prerequisite. The presence of polyphenols, which are influential oxidizing agents show in many tropical plant species, can decrease the yield and purity by binding covalently with the extracted DNA making it useless of most research applications (Vanijajiva 2011). The extraction of high quality DNA was optimized by re-extracting the DNA using CTAB DNA isolation protocol and phenol: chloroform: isoamyl alcohol extraction instead of chloroform: isoamyl alcohol

extraction. The polyphenolics with the DNA were simply removed and good SRAP electrophoretograms were obtained with all samples. DNA extracted from *B. macrophylla* leaf using an above modified gave a good and sufficient quality DNA for SRAP-PCR reaction. DNA isolated by minor modification method yielded strong and reliable amplification products and the amount of DNA extracted from the accessions ranged from 125 to 245 µg/g fresh weight leaf material. The ratios of A260/A280 varied from 1.84 to 1.98. The quality of DNA was also tested by PCR, which confirmed that the DNAs were suitable for PCR reaction. The parameters for the sequence-related amplified polymorphism protocol from *B. macrophylla* cultivars were also studied. Several parameters had an effect on banding patterns and reproducibility such as concentration of dNTPs, magnesium chloride concentration, concentration of enzyme, concentration of primer and concentration of template DNA (Sun et al. 2011), but the concentration of template DNA and magnesium chloride were most important. The result clearly showed that at 100 ng template DNA and MgCl₂ 5 mM concentration are suitable for further PCR analysis.

SRAP analysis

Genetic characterization is one of the key successes to crop breeding programs. Knowledge of the genetic variation between the different accessions supplying this diversity can greatly assist the development of efficient germplasm-management and -utilization strategies. Currently, genetic marker technology designed to detect naturally occurring polymorphisms at the DNA level had become an invaluable and revolutionizing tool for both applied and basic studies of plant. In this study, *Bouea macrophylla* was used for analyzing molecular characterization using a novel molecular marker sequence-related amplified polymorphism (SRAP). The selected primers were based on earlier reports of Li and Quiros (2001) and Vanijajiva and Kunder (2014). There were 30 sets of primer combinations that combined 5 forward primers and 6 reverse primers. Based on preliminary test, 26 sets of combination primers which steadily produced well-defined and scorable amplification products showed polymorphisms in all 30 *B. macrophylla* cultivars. Figure 1 was the illustration amplification electrophoretograms of MP18 accession of *B. macrophylla*.

Total and polymorphic band number and polymorphism ratio of *Bouea macrophylla* accessions were processed in Table 2. The main criteria by which the primer selection was made are: clarity, reproducibility of amplified bands and high rates of polymorphism. The 26 primer combinations generated 222 electrophoretic profiles, of which 150 bands were polymorphic (57.27%). A high degree of polymorphism was revealed by these combinations that ranged from 33.33 to 80.00% across all the genotypes studied. The size of amplified bands ranged from 90 to 2,500 bp. The number of fragments amplified by each primer ranged from 3 to 12 with the average of 8.53 per primer combination. By scoring the bands from forward or reverse primer directed primer combinations, the results showed that the amplification ability of either

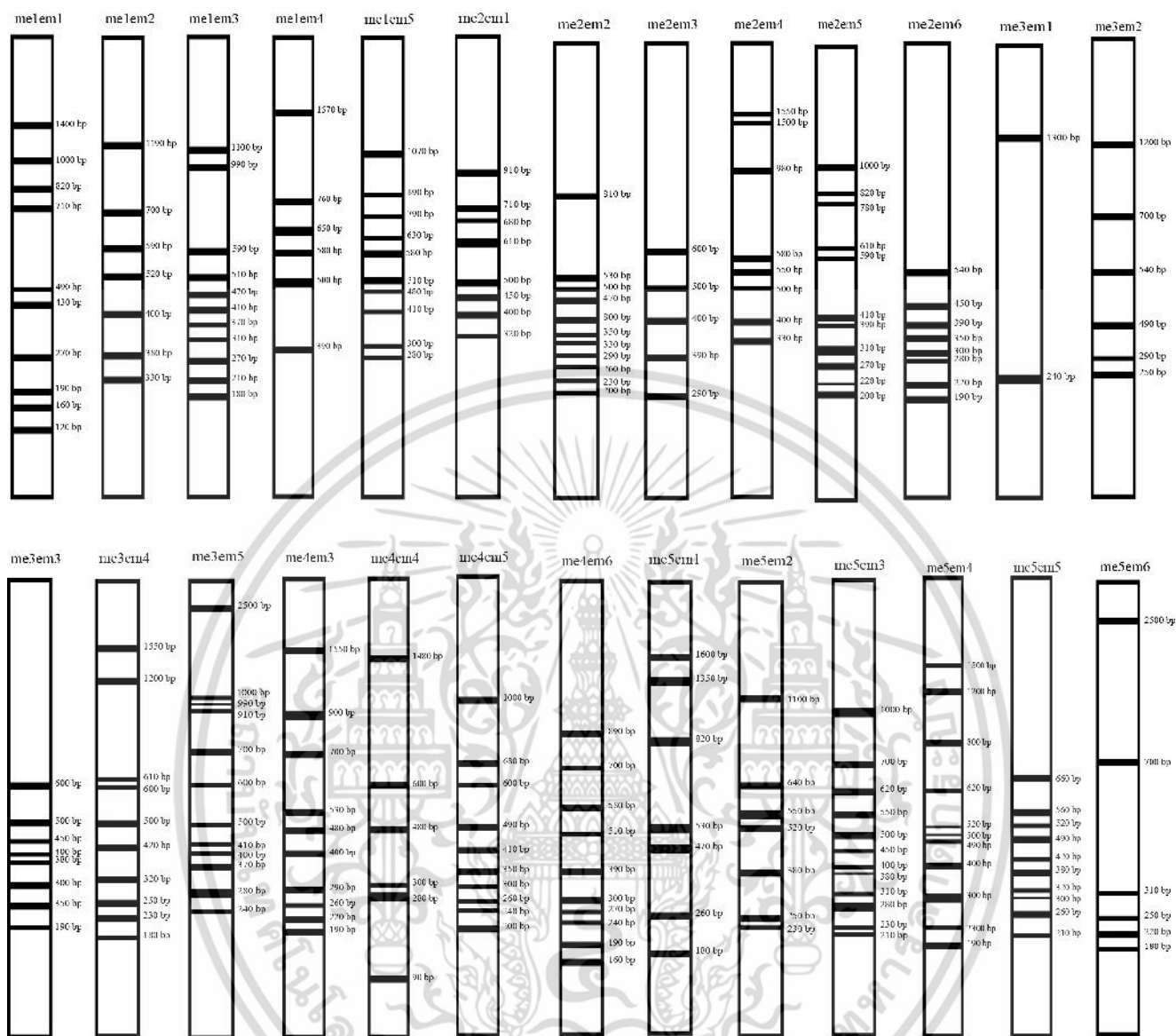


Figure 1. The representative SRAP profiles in this study. The electrophoretograms are employed as representative of clear, distinguished, stable profiles from 26 combination primers of MP18 wild accession

the forward or reverse primers varied significantly with each other, revealing a genomic bias of *B. macrophylla* cultivars on different forward- and reverse-primer nucleotides. In fact, primer preference for successful SRAP-PCR assays has been widely recognized in many plant species (Agarwal et al. 2008).

This preliminary result indicated that the SRAP technique could be used as an alternative molecular tool on *B. macrophylla*. Recently, ISSR and SSR has been applied in the molecular biology studies of *Bouea* species (Damodaran et al. 2013; Ghazali et al. 2015). However, SSR and ISSR techniques provided limited functional gene information associated with the traits of interest. In other plant species, such as buffalograss cultivars, SRAP technology prove useful for varietal identification than SSR and ISSR markers (Budak et al. 2004) as well as *Dianthus*

accessions, the information given by SRAP markers was more concordant to the morphological variability and to the evolutionary history of the morphotypes than that of ISSR markers (Fu et al. 2008). These contrasting levels of SRAP, SSR and ISSR correlation with morphological traits may be related to the fact that, unlike SSR and ISSR which are targeted to microsatellite regions, SRAP markers preferentially amplify ORFs (open reading frames). Exons are usually GC rich and, thus, the 'CCGG' sequence in the core of the forward SRAP primers is designed to target such coding regions (Li and Quiros 2001; Shao et al. 2010). Thus, SRAP technique may be helpful in deciphering the genomic basis of complex traits that are related to the economic value of *B. macrophylla* and are likely to better reflect genetically determined morphological variation.

Table 2. Total and polymorphic band number and polymorphism ratio of *Bouea macrophylla* accessions

Primer combinations	Total bands	Poly-morphic bands	% Poly-morphism	Size (bp)
me1em1	10	7	70.00	120-1400
me1em2	7	6	85.71	330-1190
me1em3	11	8	72.72	180-1100
me1em4	6	3	50.00	390-1570
me1em5	10	7	70.00	280-1070
me2em1	8	6	75.00	320-910
me2em2	11	6	54.55	200-810
me2em3	5	4	80.00	290-600
me2em4	8	3	37.50	330-1550
me2em5	11	8	72.73	200-1000
me2em6	8	6	75.00	190-540
me3em1	3	1	33.33	240-1300
me3em2	6	1	16.67	250-1200
me3em3	8	3	37.50	190-600
me3em4	10	7	70.00	180-1550
me3em5	11	8	72.72	240-2500
me4em3	10	4	40.00	190-1550
me4em4	6	4	66.67	90-1480
me4em5	10	8	80.00	200-1000
me4em6	10	2	20.00	160-890
me5em1	7	5	71.43	180-1600
me5em2	7	3	42.86	230-1100
me5em3	12	8	66.67	210-1000
me5em4	11	6	54.55	190-1500
me5em5	10	4	40.00	210-660
me5em6	6	2	33.33	180-2500
Total	222	130		90-2500
Mean	8.53	5	57.27	

In conclusion, the present study is, to the best of our knowledge, the first report of genetic investigation of *Bouea macrophylla*, using SRAP markers. It is concluded that SRAP is a useful DNA fingerprinting tool for evaluation of genetic diversity of species, cultivars and breeding lines, especially for species with underdeveloped marker systems. It is a fast, low-cost and efficient molecular method applicable to plant breeding.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Vichit Kaisornsawad and Amnuay Hongthong for supplying the plant materials. This work was supported by Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang, Thailand and Phranakhon Rajabhat University, Thailand.

REFERENCES

Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *PI Cell Rep* 27: 617-631.

Budak H, Shearman RC, Parmaksiz I, Dweikat I. 2004. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theor Appl Genet* 109: 280-288.

Chayamarit K. 2010. Anacardiaceae. In: Santisuk T, Larsen K (eds) *Flora of Thailand* 10(3). Prachachon, Bangkok.

Damodaran T, Ahmad I, Nagarajan B. 2013. *Bouea oppositifolia*-A fast disappearing native mango genetic resource from Andamans: Morphological and molecular evidences. *Indian J Hort* 70: 161-164.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.

Fu X, Ning G, Gao L, Bao M. 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Scientia Horticulturae* 117: 263-270.

Ghazali MN, Yunus MF, Mohammad AL. 2015. Assessment of genetic relationships within *Bouea* (Anacardiaceae) accessions in Peninsular Malaysia using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *African J Biotechnol* 14: 76-85.

Hazarika TK, Hazarika BN, Shukla AC. 2014. Genetic variability and phylogenetic relationships studies of genus *Citrus* L. with the application of molecular markers. *Genetic Res Crop Evol* 61 (8): 1441-1454.

Kalendar R, Antonius K, Smykal P, Schulman AH. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor Appl Genet* 121: 1419-1430.

Khoo HE, Ismail A, Mohd-Esa N, Idris S. 2008. Carotenoid content of underutilized tropical fruits. *PI Food Human Nutr* 63: 170-175.

Li G, Quiros CF. 2001. Sequence related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple per reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor Appl Genet* 103: 455-461.

Lim TK. 2012. *Edible medicinal and non-medicinal plants* (Vol. 1, pp. 656-687). Springer.

Padmakar B, Kanupriya C, Latha PM, Prashant KS, Dinesh MR, Sailaja D, Aswath C. 2015. Development of SRAP and SSR marker-based genetic linkage maps of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae* 192: 158-165.

Rajan NS, Bhat R, Karim AA. 2014. Preliminary studies on the evaluation of nutritional composition of unripe and ripe Kundang fruits (*Bouea macrophylla* Griffith). *Intl Food Res J* 21: 949-954.

Rajan NS, Bhat R. 2016. Antioxidant compounds and antioxidant activities in unripe and ripe kundang fruits (*Bouea macrophylla* Griffith). *Fruits* 71: 41-47.

Rifai MA. 1992. *Bouea macrophylla* Griffith. In: Coronel RE, Verheij EWM (eds.) *Plant resources of South-East Asia*. No. 2: Edible fruits and nuts. Prosea Foundation, Bogor.

Shao QS, Guo QS, Deng YM., Guo HP. 2010. A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochem Syst Ecol* 38: 1160-1169.

Si P, Dai H Y. 2010. Establishment of SRAP-PCR reaction system in apple. *J Fruit Sci* 27(2): 168-173.

Subhadrabandhu S. 2001. Under utilized tropical fruits of Thailand. *FAO Rap publication* 2001/26, Rome.

Sun F, Huo JW, Qin D. 2011. Establishment and Optimization of SRAP amplification system in *Lonicera caerulea* L. *J Northeast Agric Univ* 18: 26-31.

Vanijajiva O, Kundee N. 2014. Genetic uniformity of exotic medicinal plant *Gynura divaricata* in Thailand. *Phranakhon Rajabhat Res J* 9: 77-86.

Vanijajiva O. 2011. Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand detected by RAPD analysis. *J Agric Technol* 7: 1107-1116.

Zhang RP, Wu J, Li XG, Khan MA, Chen H, Korban SS, Zhang SL. 2013. An AFLP, SRAP, and SSR genetic linkage map and identification of QTLs for fruit traits in pear (*Pyrus* L.). *PI Mol Biol Rep* 31: 678-687.

Zheng H, Duan H, Hu D, Wei R., Li Y. 2015. Sequence-related amplified polymorphism primer screening on Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). *J For Res* 26: 101-106.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Molecular variability of *Bouea macrophylla* cultivars using inter-primer binding site (iPBS) marker

Sombhat Kaewpongumpai^a, Supattra Poeaim^a and Ongkarn Vanijajiva^{b*}

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand.

^b Faculty of Science and Technology, Phranakorn Rajabhat University, Bangkok, 10220, Thailand.

Abstract

Molecular markers have significantly aided in evaluating crop variations that can lead to an early identification of useful variants. One recently described retrotransposon-based molecular marker technique has been used to identify the varieties in many crop species. In this preliminary study, thirty *Bouea macrophylla* Griff. cultivars were evaluated for their molecular variability based on markers for an inter-primer binding site (iPBS). The 12 and 18 iPBS-retrotransposon primers generated a total of 267 scorable bands, and 126 of these were revealed to be polymorphic (46.23%), with an average of 9 polymorphic fragments per primer. This study showed that the iPBS marker is a simple, informative, reproducible and suitable method for evaluation of *B. macrophylla* genetic diversity.

Keywords: Retrotransposons, genetic variation, edible fruit.

1. Introduction

Molecular markers have a key role in the study of genetic variability of organisms. The appearance of marker systems has closely followed developments in biochemistry and molecular biology for the past 40 years. The shortcomings of biochemically derived markers, such as isozymes, drove the development of markers based on DNA polymorphisms. A DNA molecular marker in essence detects nucleotide sequence variations at a particular location in the genome. A variation must be found between the parents of the chosen cross for the marker to be informative among their offspring and to allow its pattern of inheritance to be analyzed. DNA markers can generate 'fingerprints,' which are characteristic patterns of DNA fragments resolved by electrophoresis and detected by staining or labeling. The introduction of the PCR was an advance for molecular marker technologies, and made potential many fingerprinting techniques (Agarwal *et al.*, 2008).

Retrotransposons are a class of repetitive and movable sequences and are ubiquitous and abundant components of virtually all known eukaryotic genomes. In higher plants, they can constitute often 50-90%. Retrotransposons have played a significant role in the establishment of genetic diversity and are also useful for marker developments due to their high abundance and specific genome distribution (Schulman *et al.*, 2012). Several PCR-based marker methods have been developed to reveal insertional polymorphisms of long terminal repeat (LTR) retrotransposons, including retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP), interretrotransposon amplified polymorphism (IRAP), retrotransposon-microsatellite and amplified polymorphisms (REMAP) (Kalendar *et al.*, 2011; Schulman *et al.*, 2012). At present another exceedingly universal and efficient molecular marker based on the conserved sequences of retrotransposons, which are inter-primer binding sites (iPBS), have been developed by Kalendar *et al.* (2010). The iPBS primer was designed on the conserved parts of a primer binding site (PBS) sequence for tRNAs for reverse transcription during the replication cycle for the retrotransposons. Significantly, the iPBS amplification technique can be a powerful DNA fingerprinting technology without the need for previous sequence knowledge. In addition, they are highly reproducible due to their primer length and the high stringency achieved by the annealing temperature. The iPBS marker has been successfully applied for identification of cultivars and genetic variation analysis in many crop species.

Bouea macrophylla Griffith, commonly known as Maprang, Mayong or Mayongchid in Thailand, belongs to the Anacardiaceae family in the order of Sapindales (Chayamarit, 2010). The species can be found growing in home gardens or orchards as well as in wild forests. *B. macrophylla* is native to Asia and Malaysia, extending from north-eastern India to the Moluccas. It is a tropical fruit tree native to Southeast Asia and commercially grown in the ASEAN areas. *B. macrophylla* produces fruits, which look like, small mangos. The fruits are green in color when young and yellow when matured and encompass brightly colored purple seeds. The endosperm of the seed is bitter but edible. Ripe fruits are normally consumed fresh or cooked into syrup or made into a very delicious compote or jam (Subhadrabandhu, 2001).

* Corresponding author. Tel./Fax. +66-254-48000

E-mail address: vanijajiva@gmail.com, Faculty of Science and Technology, Phranakorn Rajabhat University, Bangkok, 10220, Thailand.

In Thailand, *B. macrophylla* has gained popularity among local consumers in recent years. Approximately 50 cultivars names are now known. Identification of *B. macrophylla* cultivars is one of the main problems at present due to misleading transliterations, local names, synonyms and homonyms. Cases of synonymies and homonyms do exist in accessions collected from different sites, and the possible names for a given genotype that did not correspond to the denomination of the true to type accession held by the germplasm reference collections of the original.

The aim of this study was to use iPBS markers to evaluate genetic diversities, especially to the extent of the retrotransposon related variability, of a collection of 30 *B. macrophylla* cultivars mainly from Thailand. Furthermore, we aimed to explore the potential of these markers for *B. macrophylla* characterization and discrimination between cultivars.

2. Materials and Methods

Samples of *Bouea macrophylla* cultivars were mainly collected from the central and lower northern regions of Thailand (Table 1). Young leaves from these samples were well washed in distilled water and stored at -20 °C until further processing. Another related species *Bouea oppositifolia* (Roxb.) Meiss from Krabi province, Thailand was also included as an outgroup species in this study. Genomic DNA was extracted from the leaves of four cultivars using the CTAB method with a minor modification as outlined by Vanijajiva, 2011.

Table 1. The names of *Bouea macrophylla* cultivars and origins of samples for iPBS analysis

No.	Cultivar name	Origin	Code
1	Maprang-Mae Anong	Nakhon Nayok Province, Thailand	MP01
2	Maprang-Thong Nopparat	Nakhon Nayok Province, Thailand	MP02
3	Maprang-Thong Yai	Nakhon Nayok Province, Thailand	MP03
4	Maprang-Maha Chanok	Nakhon Nayok Province, Thailand	MP04
5	Maprang-Suwan Nabat	Nakhon Nayok Province, Thailand	MP05
6	Maprang-Chao Sua	Nakhon Nayok Province, Thailand	MP06
7	Maprang-Lung Chit	Nakhon Nayok Province, Thailand	MP07
8	Maprang-Waan Yai	Phetchabun Province, Thailand	MP08
9	Maprang-Waan Thong	Phetchabun Province, Thailand	MP09
10	Maprang-Patum Thong	Sukothai Province, Thailand	MP10
11	Maprang-Rung Arun	Prachinburi Province, Thailand	MP11
12	Maprang-Phet Wan Yao	Kamphaengphet Province, Thailand	MP12
13	Maprang-Waan Kom	Kamphaengphet Province, Thailand	MP13
14	Maprang-Puang	Phetchabun Province, Thailand	MP14
15	Maprang-Phet Noppakao	Kamphaengphet Province, Thailand	MP15
16	Maprang-Cheong Lan	Kamphaengphet Province, Thailand	MP16
17	Maprang-Yai	Phetchabun Province, Thailand	MP17
18	Maprang	Ayutaya Province, Thailand	MP18
19	Mayongchid-Suan Waan	Nakhon Nayok Province, Thailand	MY01
20	Mayongchid-Chit Sanga	Nakhon Nayok Province, Thailand	MY02
21	Mayongchid-Tan Kao	Nakhon Nayok Province, Thailand	MY03
22	Mayongchid-Bang Khun Non	Nakhon Nayok Province, Thailand	MY04
23	Mayongchid-Tan Tawai	Nakhon Nayok Province, Thailand	MY05
24	Mayongchid-Tadaan	Nakhon Nayok Province, Thailand	MY06
25	Mayongchid-Tan Kao	Lopburi Province, Thailand	MY07
26	Mayongchid-Neang Siam	Sukothai Province, Thailand	MY08
27	Mayongchid-Mae Ya	Sukothai Province, Thailand	MY09
28	Mayongchid-Bang Khun Non	Kamphaengphet Province, Thailand	MY10
29	Mayongchid-Phet Kang Dong	Kamphaengphet Province, Thailand	MY11
30	Mayongchid-Phet Cheong Lan	Kamphaengphet Province, Thailand	MY12

Thirty iPBS primers were initially screened for analysis (Table 2). PCR was performed using a Thermohybrid Px2 (Roche Molecular Systems, Inc., USA). iPBS-PCR reactions were conducted in a 25 µl volume containing 10x reaction buffer (100 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 100 ng template DNA, 0.6 mM dNTP mixture, 5 mM MgCl₂, 1 unit of Taq polymerase and 5 µM primers. The iPBS amplification conditions were: 5 min initial denaturation at 94 °C; 42 cycles consisting of 1 min denaturation at 94 °C, 1 min primer annealing at 47-55 °C, and 2 min extension at 72 °C and a final 7 min extension at 72 °C.

The iPBS products were all analysed by agarose (1.8% w/v) gel electrophoresis at 150 A for 30 minutes in 0.04 M TAE (Tris-acetate 0.001 M-EDTA) buffer pH 8. The gels were stained with ethidium bromide (10 mg/ml). The gels were viewed and photographed by a Bio-Imaging System (Syngene, Genegenius). To determine ISSR and SRAP profiles, the size of each DNA band was inferred by comparison with a 100 bp DNA ladder (Promega), used as a molecular weight marker (M). Polymorphisms at all loci were confirmed by three repeated tests for each primer at different times

3. Results and Discussion

The extraction of high quality DNA from *Bouea* is challenging because of the presence of high polyphenolics in the tissues. A high throughput DNA extraction protocol was a prerequisite. The presence of polyphenols, which are influential oxidizing agents present in many tropical plant species, can decrease the yield and purity by binding covalently with the extracted DNA and making it useless for most research applications (Doyle and Doyle, 1987; Vanijajiva, 2011). The extraction of high quality DNA was optimized by re-extracting the DNA using a CTAB DNA isolation protocol and phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction instead of chloroform:isoamyl alcohol extraction. The polyphenolics with the DNA were simply removed and good iPBS electrophoretograms were obtained for all samples. DNA extracted from *B. macrophylla* leaf using the above modified gave a good and sufficient quality DNA for PCR reactions. DNA isolated by a minor modification method yielded strong and reliable amplification products and the amount of DNA extracted from the accessions ranged from 125 to 245 µg/g fresh weight leaf material. The ratios of A260/A280 varied from 1.84 to 1.98.

Table 2. Total and polymorphic band numbers and polymorphism ratios of *Bouea macrophylla* accessions.

primer	Sequence (5'-3')	Total bands	Polymorphic bands	% Polymorphism	Size (bp)
2076	GCTCCGATGCCA	11	5	45.45	180-1400
2077	CTCACGATGCCA	13	6	46.15	190-2500
2079	AGGTGGGCGCCA	8	2	25.00	170-800
2080	CAGACGGCGCCA	10	3	30.00	180-1300
2081	GCAACGGGGCCA	6	3	50.00	370-990
2083	CCTCTAGCGCCA	10	3	30.00	80-950
2085	ATGCCGATACCA	7	3	42.86	250-950
2272	GGCTCAGATGCCA	10	3	30.00	170-980
2273	GCTCATCATGCCA	13	7	53.85	170-1200
2374	CCCAGCAAACCA	11	3	27.27	140-700
2277	GGCGATGATACCA	8	5	62.50	270-600
2279	AATGAAAGCACCA	12	5	41.67	150-610
2378	GGTCCTATCCA	6	3	50.00	170-900
2380	CAACCTGATCCA	10	6	60.00	120-1300
2382	TGTTGGCTTCCA	5	3	60.00	270-600
2389	ACATCTTCCA	6	0	0.00	230-600
2391	ATCTGTAGCCA	5	2	40.00	410-520
2392	TAGATGGTGCCA	6	3	50.00	210-800
2393	TACGGTACGCCA	4	1	25.00	250-1000
2394	GAGCCTAGGCCA	11	9	81.82	150-1000
2251	GAACAGGCGATGATACCA	10	5	50.00	190-520
2252	TCATGGCTCATGATACCA	11	6	54.55	250-1100
2253	TCGAGGCTCTAGATACCA	8	5	62.50	190-780
2256	GACCTAGCTCTAATACCA	8	5	62.50	220-700
2295	AGAACGGCTCTGATACCA	12	7	58.33	220-1150
2398	GAACCCTTGCCGATACCA	9	7	77.78	210-1100
2400	CCCCTCTTCTAGCGCCA	8	2	25.00	210-1500
2401	AGTTAAGCTTTGATACCA	8	3	37.50	250-800
2402	CTCAAGCTTTGATACCA	7	4	57.14	200-1000
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	14	7	50.00	180-850
		267	126	46.23	80-2500

For the iPBS-PCR, a total of 30 primers were screened, and all of them that gave clear reproducible fragments were selected for further analysis. A total of 267 reproducible fragments were amplified with the number of amplified fragments ranging from four (2393) to fourteen (2415). The band size ranged from 80 to

2,500 bp (Table 2). These results indicated that the iPBS marker system used in this study revealed a wide range of genomic DNA diversity in *Bouea* and its related genera.

4. Conclusions

The present study was to the best of our knowledge, the first report of a genetic diversity investigation of *Bouea macrophylla*, using iPBS markers. It was concluded that iPBS was a useful DNA fingerprinting tool for evaluation of genetic diversity of species, cultivars and breeding lines, especially for species with underdeveloped marker systems. It is a fast, low-cost and efficient molecular method applicable to plant breeding program.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Mr. Vichit Kaisornsawad and Mr. Amnuay Hongthong for supplying the plant materials. This work was supported by Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Phranakhon Rajabhat University.

6. Conflict of interest: none.

7. References

- Agarwal, M. Shrivastava, N. and Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27, 617–631.
- Chayamarit, K. 2010. Anacardiaceae. In: Santisuk T, Larsen K (eds) *Flora of Thailand* 10(3). Prachachon, Bangkok.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19, 11–15.
- Kalendar, R.A., Smykal, P. and Schulman, A.H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*. 121, 1419–1430.
- Kalendar, R. Flavell, A.J, Ellis, T.H. Sjakste, T. Moisy, C. and Schulman, A.H. 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*. 106, 520–530.
- Schulman, A.H. Flavell, A.J. Paux, E. and Ellis, T.H. 2012. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods in Molecular Biology*. 859, 115–153.
- Subhadrabandhu, S. 2001. Underutilized tropical fruits of Thailand. *FAO Rap publication*. 2001/26, Rome.
- Vanijajiva, O. 2011. Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand detected by RAPD analysis. *Journal of Agricultural Technology*. 7, 1107-1116.
- Zhang, R.P. Wu, J. Li, X.G. Khan, M.A. Chen, H. Korban, S.S. and Zhang, S.L. 2013. An AFLP, SRAP, and SSR genetic linkage map and identification of QTLs for fruit traits in pear (*Pyrus L.*). *Plant Molecular Biology Reporter*. 31, 678-687.