สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นในการจำแนกสายพันธุ์มันขี้หนูโดยใช้เทคนิค RAPD

Preliminary Study of Hausa Potato Varieties Using RAPD Technique

นายธัญยธรณ์ พันมานิมิตร

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. อรอุมา รุ่งน้อย

ปพ.
ฉ468ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 102716
วัน,เดือน,ปี 18 ส.ค. 2552

T 102716

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่)

พุทธศักราช 2550

b.1203499
i.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นในการจำแนกสายพันธุ์มันขี้หนูโดยใช้เทคนิค RAPD

Preliminary Study of Hausa Potato Varieties Using RAPD Technique

โดย

นายธัญยธรณ์ พันมานิมิตร

ได้พิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ดร. อรอุมา รุ่งน้อย)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรอง

.....

(รศ.ดร.สมยศ เตชภิรัตนมงคล)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ 25 เดือน เมษายน พ.ศ. 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การศึกษาเบื้องต้นในการจำแนกสายพันธุ์มันขี้หนูโดยใช้เทคนิค RAPD
โดย : นายธัญยธรณ์ พันมานิมิตร
ภาควิชา : เทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. อรอุมา รุ่งน้อย

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นในการทดสอบสภาพความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้เครื่องหมาย random amplified polymorphic DNA (RAPD) ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของมันขี้หนู (*Solenostemon rotundifolius* (Poiret) J.K.Morton) สายพันธุ์ตรัง ควนเนียงและสุไหงโกลก โดยใช้แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3.125 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.75 ยูนิต dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์และ DNA แม่แบบเข้มข้น 2.5 นาโนกรัม ให้แถบ DNA ชัดเจนที่สุด ในการทดสอบหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 95 ไพรเมอร์ มี 14 ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ชัดเจนจำนวน 5-11 แถบต่อไพรเมอร์ เฉลี่ย 7 แถบต่อไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ AU-14 ให้จำนวน polymorphic band สูงสุดคือ 5 ส่วนไพรเมอร์ C-02, AB-09 และ AL-06 ให้จำนวน polymorphic band ต่ำสุดคือ 1 จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า RAPD มีประสิทธิภาพในการแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของมันขี้หนูทั้ง 3 พันธุ์ได้และสามารถที่จะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันขี้หนูในประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: มันขี้หนู ความหลากหลายทางพันธุกรรม RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : Preliminary Study of Hausa Potato Varieties Using RAPD Technique

Author : Mr. Thunyathorn Panmanimit

Department : Plant Production Technology

Faculty : Agricultural Technology

Advisor : Dr. On-uma Rungnoi

ABSTRACT

Preliminary study of optimum PCR condition using decamer random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic identification of hausa potato (*Solenostemon rotundifolius* (Poiret) J.K.Morton), Trang, Khuanniang and Sungaikolok. The most prominent bands were obtained from PCR using 3.125 mM $MgCl_2$, 0.75 U *Taq* DNA polymerase, 200 µM dNTPs and 2.5 ng DNA template. To determine the amount of genetic diversity using 95 RAPD primers, fourteen primers allowed amplification DNA bands ranging from 5-11 bands for each primer, with an average of 7 bands. AU-14 primer conducted a maximum of 5 bands and minimum in C-02, AB-09 and AL-06, 1 bands. The present study indicates that the RAPD technique provided sufficient polymorphic to identified 3 landraces hausa potato and can be used to study their genetic diversity in Thailand.

Key word: Hausa potato, genetic diversity, RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในระดับปริญญาตรี ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อรอุมา รุ่งน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่เคารพเป็นอย่างสูง ที่คอยให้คำแนะนำเทคนิคต่างๆ ทางด้านงาน DNA ตลอดระยะเวลาในการทำการทดลองจนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ คุณจิระ สุวรรณประเสริฐ ที่คอยช่วยทางด้านตัวอย่างมันขี้หนูและข้อมูลที่ทำให้รู้จักมากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ น.ส.เนตรนภา ปัญญามูล ที่คอยแนะนำการใช้อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (ADB) ทำให้สะดวกแก่การทำงานมากยิ่งขึ้น รวมทั้งเพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกๆ คนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมาจนสำเร็จด้วยดี

ธัญยธรณ์ พันมานิมิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
สารบัญภาคผนวก	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลอง	12
วิจารณ์	20
สรุป	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	26
ประวัติผู้เขียน	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	12
2	ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	13
3	ความเข้มข้นของ dNTPs ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	13
4	ความเข้มข้นของ DNA ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	13
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ และจำนวนแถบ DNA ที่ให้ polymorphism	17
6	แถบ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ 14 ชนิด กับ DNA มันขี้หนู 3 สายพันธุ์	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หัวมันขี้หนูที่ปลูกเพื่อนำใบมาสกัด DNA ทั้ง 3 สายพันธุ์	8
2	มันขี้หนูปลูกไว้ในโรงเรือนเป็นเวลา 2 สัปดาห์	9
3	genomic DNA ของมันขี้หนู (M = DNA มาตรฐานเข้มข้น 20 นาโนกรัม, 1-4 = ตรัง, 5-7 = ควนเนียง และ 8-9 = สุไหงโกลก ตามลำดับ)	12
4	ลายพิมพ์ DNA ที่ความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ของมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ โดย เทคนิค RAPD จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ H-13 (M คือแถบ DNA มาตรฐาน, 1-2=ตรัง, 3-4=ควนเนียง, 5-6=สุไหงโกลก ตามลำดับ)	14
5	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-06 (1, 2, 3), K-07 (4, 5, 6), AB-09 (7, 8, 9), C-02 (10,11,12) กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 4, 7, 10=ตรัง, 2, 5, 8, 11=ควนเนียง, 3, 6, 9, 12= สุไหงโกลก)	17
6	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AT-07 (1, 2, 3), A-11 (4, 5, 6), C-11 (7, 8, 9), Y-02 (10, 11, 12), A-09 (13, 14, 15) กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 4, 7, 10, 13=ตรัง, 2, 5, 8, 11, 14= ควนเนียง, 3, 6, 9, 12, 15=สุไหงโกลก)	18
7	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ A-10 (1, 2, 3), AA-16 (4, 5, 6), AU-14 (7, 8, 9,), D-20 (10, 11, 12) กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 4, 7, 10=ตรัง, 2, 5, 8, 11=ควนเนียง, 3, 6, 9, 12= สุไหงโกลก)	18
8	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AI-02 กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1=ตรัง, 2=ควนเนียง, 3=สุไหงโกลก)	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
การเตรียมสารเคมีในการสกัด DNA	27
การเตรียม Agarose gel	28

ตารางผนวกที่ **หน้า**

1	ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 95 ชนิด	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

มันขี้หนู หรือ อูบีกาลิง (Ubi keling) เป็นพืชท้องถิ่นในภาคใต้ชนิดหนึ่งที่เกษตรกรปลูกเป็นพืชเสริมรายได้ในระบบการปลูกพืชเขตพื้นที่ดอน มันขี้หนูเป็นพืชที่ปลูกง่าย ต้องการการดูแลรักษาน้อย สามารถให้ผลผลิตหัวสดได้ 2 – 3 ตันต่อไร่ และสามารถจำหน่ายได้ในราคาไม่ต่ำกว่ากิโลกรัมละ 10 บาท จึงเป็นพืชที่ให้ผลกำไรแก่เกษตรกรได้สูงมาก (จิระ, 2536 และ 2542) อย่างไรก็ตาม มันขี้หนูเองก็ไม่มีการแบ่งแยกหรือทราบที่มาของพันธุ์หรือกลุ่มพันธุ์ได้ มีเฉพาะลักษณะของหัวเท่านั้นที่พอจะใช้ในการแบ่งประเภทของมันขี้หนูได้ซึ่งต้องใช้เวลานาน 6 – 8 เดือนเพื่อให้หัวมันขี้หนูแก่จัดเสียก่อนจึงจะมีความแตกต่างของพันธุ์มันขี้หนูอย่างเด่นชัด จากเดิมที่เราใช้ประโยชน์เฉพาะจากส่วนหัวซึ่งเป็นรากสะสมอาหารเท่านั้น แต่ในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากส่วนอื่นของมันขี้หนูด้วย เช่น การนำสารสกัดที่ได้จากส่วนเหนือดินไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืช (Pipithsangchan *et al.*, 2000) การพบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนใบมันขี้หนูมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 integrase ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาควบคุมปริมาณเชื้อ HIV-1 ได้ (Tewtrakul *et al.*, 2003) การพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากใบมันขี้หนูมีฤทธิ์ควบคุมเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีฤทธิ์เป็นสาร antioxidant ที่มีประสิทธิภาพสูงเป็น 3 เท่าของสารมาตรฐาน (สุปรียา และ สุภิญญา, 2548) และการพบว่าแป้งมันขี้หนูมีคุณสมบัติเด่นเฉพาะตัวหลายประการ (ฎายิน, 2543) สิ่งเหล่านี้ยิ่งต้องการให้มีการระบุถึงพันธุ์ที่ให้ผลผลิตในส่วนที่เป็นที่ต้องการได้ดีที่สุด

การเก็บรวบรวมพันธุ์มันขี้หนูจากแหล่งปลูกในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคใต้ เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์โดยการใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือลักษณะทางการเกษตรอื่นๆ ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) จึงมีความจำเป็นในการบ่งชี้เอกลักษณ์ของพันธุ์และความแตกต่างระหว่างพันธุ์ เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาความซ้ำซ้อนของตัวอย่างพันธุ์ หรือป้องกันความผิดพลาดในการคัดทิ้งบางสายพันธุ์ไปเนื่องจากการจำแนกโดยการใช้เพียงลักษณะที่ปรากฏภายนอกอาจจะเกิดการผิดพลาดได้ง่ายหากลักษณะที่ปรากฏไม่เด่นชัดพอ หรือสภาพแวดล้อมเข้ามามีอิทธิพลต่อการแสดงออกลักษณะสูง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความแม่นยำ และลดระยะเวลาการทำงานได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาการจำแนกพันธุกรรมของมันขี้หนูโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงจำเป็นต้องทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของมันขี้หนูต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์มันขี้หนู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องของมันขี้หนู

มันขี้หนูเป็นพืชท้องถิ่นที่มีการปลูกกันในพื้นที่ภาคใต้ใช้สำหรับบริโภคตามวัฒนธรรมในการปรุงอาหารของท้องถิ่น โดยการใช้หัวต้มรับประทานเป็นของว่าง และใช้เป็นผักแกงในแกงเหลือง แกงไตปลาหรือแกงกะทิอื่น ๆ (เทอด, 2529) มันขี้หนูเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอาฟริกา มีการนำเข้ามาในบริเวณคาบสมุทรมาลายูเป็นเวลานานแล้ว โดยไม่มีการบันทึกถึงจำนวนพันธุ์ที่แพร่เข้ามาหรือที่มีปลูกกันอยู่ มันขี้หนูเป็นพืชในวงศ์ *Labiatae* หรือ *Lamiaceae* ซึ่งได้ชื่อว่าเป็น mint family ก่อนหน้านี้การจัดจำแนกทางพฤษศาสตร์และการให้ชื่อวิทยาศาสตร์ยังไม่ค่อยมีความแน่นอนโดยชื่อที่พบเห็นได้บ่อยคือ *Coleus tuberosus* (Blume) Benth. หรือ *Coleus parviflorus* Benth. หรือ *Coleus rotundifolius* (Poiret) A. Chev. & E. Perrot แต่การจำแนกในปัจจุบันใช้ชื่อ *Solenostemon rotundifolius* (Poiret) J.K.Morton (USDA-NRCS, 2006; ITIS, 2006) แต่ก็มีผู้ใช้ชื่อเป็นอย่างอื่นอีกคือ *Plectranthus rotundifolius* (Poiret) Sprengel (MULTILINGUAL MULTISCRIPT PLANT NAME DATABASE, 2006) ในบางครั้งพบว่ามีการอ้างอิงชื่อวิทยาศาสตร์ของมันขี้หนูเป็น *Coleus parvifolius* (Tewtrakul *et al.*, 2003; สุปรียา และ สุภิญญา, 2548) ส่วนชื่อสามัญที่ใช้กันมากได้แก่ Hausa potato, Country potato, Chinese potato, Innala และ Madagascar potato

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มันขี้หนูเป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็กมีหัวใต้ดิน ผลมีลักษณะหัวเรียวยาวหรือหัวอ้วนสั้น ผิวเปลือกสีน้ำตาลเนื้อในมีสีขาว หัวเป็นรากสะสมอาหารที่เกิดขึ้นบริเวณข้อของลำต้น มีอายุพียง 1 ฤดูปลูก (annual plant) ที่มีระบบรากฝอย (fibrous root) ซึ่งรากบางรากเปลี่ยนไปทำหน้าที่สะสมอาหารเรียกรากหัว (tuber) ลำต้นและกิ่งมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมและอวบน้ำที่บริเวณข้อจะแตกกิ่งโดยการเจริญมาจากตาข้างใบมีรูปร่างแบบ ovate ปลายใบเป็นแบบ acute ขอบใบเป็นแบบ crenate ฐานใบมีลักษณะ cuneate ขนาดของใบเมื่อเจริญเต็มที่กว้าง 4.5 ซม. ยาว 5.5 ซม. ก้านใบยาว 3.5 ซม. การเรียงตัวของใบบนกิ่งเป็นแบบ decussate ดอกเป็นดอกช่อแบบ verticillate ช่อดอกยาวประมาณ 8 ซม. ดอกย่อยมีสีม่วง ประกอบด้วยกลีบดอก 5 กลีบมีเกสรตัวผู้ 5 อัน เกสรตัวเมีย 1 อัน (จารุยา, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติและการนำไปใช้ประโยชน์ของมันขี้หนู

สารสกัดจากส่วนใบของมันขี้หนูมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV- 1 integrase ทำให้ไวรัส HIV-1 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Tewtrakul *et al.*, 2003) ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาควบคุมเชื้อ HIV-1 ได้ในอนาคต สารสกัดที่เป็นน้ำมันหอมระเหยจากใบมันขี้หนูยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งในกลุ่ม แกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งมีฤทธิ์เป็นสาร antioxidant ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า butylated hydroxytoluene ถึง 3 เท่า (สุปรียา และ สุภิญญา, 2548) สารสกัดจากใบมันขี้หนูยังมีฤทธิ์ในการควบคุมหนอนใยผักวัยที่ 3 ได้ โดยจะมีผลทำให้การพัฒนาเป็นดักแด้ไม่เป็นไปตามปกติจนไม่สามารถออกจากดักแด้มาเป็นตัวเต็มวัยได้ (Pipithsangchan *et al.*, 2000) ในประเทศศรีลังกา (Kishorekumar *et al.*, 2007) และทางใต้ของประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นพืชเขตร้อน พบว่ามันขี้หนูมีสรรพคุณทางยาสูง ใบที่นำมาสกัดจะมีกลิ่นหอมสามารถแก้โรคตาอักเสบ โรคท้องอืดจากอาหารไม่ย่อยในกระเพาะและโรงผิวหนังอักเสบ นอกจากนี้มีการศึกษาการทำงานของสาร triazole ที่สามารถทำให้มันขี้หนูมีความต้านทานต่อเชื้อราและช่วยเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Kishorekumar *et al.*, 2007)

จากการศึกษาคุณสมบัติของแป้งมันขี้หนูพบว่า เป็นแป้งที่มีขนาดเม็ดแป้งเล็กมากอยู่ระหว่าง 2-28 ไมครอน เม็ดแป้งมีลักษณะกลมและรูปไข่ที่ปลายข้างหนึ่งมีลักษณะตัดและเว้าเข้าข้างใน พบว่ามีไฮลัมเฉพาะเม็ดขนาดใหญ่แป้งมันขี้หนูดูดน้ำและพองตัวได้เร็ว มีกำลังการพองตัวสูงมาก ให้กราฟจุดความหนืดสูงสุดที่มีความข้นมากแสดงถึงเม็ดแป้งส่วนใหญ่มีขนาดใกล้เคียงกันจึงเกิดการพองตัวที่สม่ำเสมอ การสุกของเม็ดแป้งเกิดขึ้นได้ง่ายโดยมีอุณหภูมิแป้งสุกอยู่ที่ 62 องศาเซลเซียส ลักษณะภายนอกที่สัมผัสได้เป็นผงละเอียดเนียนลื่นไม่มีกลิ่นหมักหรือกลิ่นผิดปกติใด ๆ และมีคุณสมบัติที่เด่นกว่าในหลายประการเมื่อเทียบกับแป้งมันสำปะหลังซึ่งหากมีการศึกษาที่ละเอียดยิ่งขึ้นก็สามารถที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมอาหารได้ต่อไป (ฎายิน, 2543)

Jayakody *et al.* (2004) ศึกษาลักษณะโครงสร้างของเม็ดแป้งมันขี้หนู 2 สายพันธุ์ (Bola และ Dil) ดูคุณสมบัติทางเคมีและความหนืดของแป้งมาใช้ในอาหารอุตสาหกรรม ก็พบว่าในพันธุ์ Bola มีคุณสมบัติของเม็ดแป้งที่ต่ำกว่าพันธุ์ Dil

การจัดจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุล

การจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับโมเลกุลแบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ การจำแนกในระดับดีเอ็นเอเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) ซึ่งดีเอ็นเอที่นำมาใช้บอกความสัมพันธ์หรือความแตกต่างของสายพันธุ์เรียกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งหมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของ ดีเอ็นเอหรือเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) ซึ่งการใช้ DNA marker ในการตรวจวินิจฉัยหรือในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้เริ่มมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในช่วงทศวรรษที่ 1990 เดิม DNA marker ที่ใช้และได้ความนิยม คือ RFLP marker แต่ด้วยข้อจำกัดของ DNA marker ชนิดนี้ คือ มีขั้นตอนการปฏิบัติหลายขั้นตอน ต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก การตรวจสอบทำได้ยาก (Welsh and McClelland, 1990) วิธีการยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิค PCR ที่มีประสิทธิภาพมากกว่ามาใช้ (พรพันธ์, 2538)

การศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือเรียกว่า In Vitro enzymatic gene amplification เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาสั้นโดยอาศัยหลักการเกิด DNA replication ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ทำให้เกิดการ replication ในหลอดทดลอง (พรพันธ์, 2538) ซึ่งมี 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. Denaturation เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ทำให้ DNA แม่พิมพ์ (template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวอยู่เป็นอิสระและทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิด DNA replication

2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ซึ่งเป็น DNA สายเดี่ยวสั้นๆ จะเข้าไปจับกับเบสที่เป็นคู่สมของแต่ละตัวบน DNA แม่พิมพ์ ซึ่งจะเกิดที่อุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 40-60 องศาเซลเซียล

3. Extension เป็นการสังเคราะห์ DNA ให้สมบูรณ์ต่อเนื่องจากจุดที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบ โดยมีเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์เข้าไปต่อจากไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์ DNA สายใหม่

เทคนิค PCR นี้ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายจากปริมาณเพียงเล็กน้อยที่อยู่ปะปนกับ DNA อื่นๆ ให้มีปริมาณเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็ว และสามารถตรวจสอบได้ทันทีโดยวิธีอิเลคโทรโฟริซิลและย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์, 2540) ซึ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA โดยวิธีการ PCR มีดังนี้

1. Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Microsatellite

Genome ของยูคาริโอตมีส่วนของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำๆ อยู่ต่อเนื่องกัน โดยจำนวนซ้ำที่พบตำแหน่งเดียวกันของพืชแต่ละต้นจะมีไม่เท่ากัน เรียกว่า Variable Number of Tendem Repeat (VNTR) หรือ minisatellite จึงมีการประยุกต์วิธีตรวจ polymorphism ของลำดับเบสแบบนี้โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่อยู่สองด้านของชุดซ้ำที่ตำแหน่งหนึ่งๆ เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่รวมชุดซ้ำเหล่านี้ไว้ แต่เนื่องจาก PCR มีข้อจำกัดในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขยายรหัสทางพันธุกรรม ถ้ารหัสทางพันธุกรรมยาวเกินไปความสามารถในการขยายก็ต่ำลงทำให้อัลลีลของ minisatellite บางตัวไม่สามารถขยายได้ จึงใช้ microsatellite หรือ simple sequence repeat (SSR) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวสั้นๆ เพียง 2-4 นิวคลีโอไทด์ต่อกันด้วยจำนวนที่แตกต่างกันมีผลทำให้ขนาดของอัลลีลแตกต่างเช่นเดียวกับ minisatellite (สุรินทร์, 2540) เทคนิค SSR เป็น codominant marker สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote ได้ (McCouch et al., 1997) แต่ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ ต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสเพื่อพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะตำแหน่งก่อนซึ่งทำได้ยุ่งยาก

2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เทคนิคนี้เป็นการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วเชื่อมต่อด้วย adapter (DNA สายคู่ชิ้นเล็กๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้) บริเวณที่เชื่อมต่อนี้เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะมีลำดับที่เป็นคู่สมกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ และมีการเพิ่มเบส 2-3 เบสที่ปลาย 3' เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วน และสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้จากจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไป แล้วจึงนำมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิส โดย polymorphism จะเกิดจากการเพิ่มการลด หรือการจัดเรียงตัวใหม่ของเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป (สุรินทร์, 2540)

3. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNAs)

การตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase Chain Reaction; PCR) แบบสุ่ม ทำให้สารพันธุกรรมจำลองตัวเองได้ในหลอดทดลอง (in vitro) โดยมีองค์ประกอบสำคัญคือ เอ็นไซม์จำลองตัวชนิดทนความร้อน (*Taq* DNA polymerase) สารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template) ชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer) และองค์ประกอบย่อยของดีเอ็นเอ (deoxynucleotide; dNTPs) เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้นมีขนาดที่สั้น (ประมาณ 10 เบส) จึงสามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบได้หลายตำแหน่งโดยสุ่ม หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว (สุพัตรา, 2549)

RAPD marker ได้พัฒนาขึ้น โดยกลุ่มของนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่มพร้อม ๆ กัน คือ กลุ่มของบริษัท Dupont ที่รายงานโดย William *et al.* (1990) ที่ใช้ประโยชน์ RAPD ในการวางแผนที่โครโมโซม โดยเรียกชื่อเป็น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยตรง อีกกลุ่มหนึ่งพัฒนาโดย The California Institute of Biological Research ที่รายงานโดย Welsh and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

McClelland (1990) เช่นเดียวกัน แต่เรียก DNA marker ว่า Arbitrarily – Primed PCR (AP – PCR) และนำไปใช้ประโยชน์ในการทำ genome fingerprinting ทั้งสองกลุ่มก็มีหลักการเหมือนกัน

สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR

ธนวัฒน์ (2546) ทำการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน โดยใช้เทคนิค RAPD และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR โดยการปรับความเข้มข้นของสารแมกนีเซียมคลอไรด์เป็น 2.5 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของ dNTPs คือ 200 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase คือ 0.4 ยูนิต และความเข้มข้นของ DNA แม่แบบคือ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร รวมถึงการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทำให้ในการทดลองนี้มีผลต่อการเกิดแถบ DNA ที่ชัดเจนมากขึ้น

Staub *et al.* (1996) ได้ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่ใช้ในการปฏิกิริยา PCR ได้แก่ *Taq* DNA polymerase คือ 1 ยูนิต แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และ DNA แม่แบบเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าสารแต่ละชนิดมีผลต่อการปรากฏของแถบ DNA ของแตงกวา

Demeke *et al.* (1996) ศึกษาจำแนก DNA ของมันฝรั่งโดยใช้ความเข้มข้นของสารแมกนีเซียมคลอไรด์ 1.9 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต และ DNA แม่แบบเข้มข้น 3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

Parent and Page (1996) ศึกษาจำแนกพันธุ์ raspberry 15 ตัวอย่าง โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ที่ประกอบด้วยสารแมกนีเซียมคลอไรด์ 3 มิลลิโมลาร์ dNTPs เข้มข้น 160 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1.25 ยูนิต และ DNA แม่แบบเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชโดยเทคนิค RAPD

Niino *et al.* (2000) ทำการเพาะเลี้ยงตาข้างของมันขี้หนูได้เป็นสำเร็จโดยชักนำให้เกิดรากแก้วเป็นต้นที่มีความสมบูรณ์ถึง 85 % จากนั้นนำมาตรวจสอบหาลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD marker

วิไลพร (2547) ทำการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลือง โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเทคนิค RAPD และ AFLP ซึ่งใช้ถั่วเหลืองจากทางราชการ 10 สายพันธุ์และ 18 สายพันธุ์จาก AVRDC ผลที่ออกมาสามารถจัดจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม โดยใช้นิวคลีโอไทด์ 30 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบ DNA มากกว่า 4 แถบต่อไพรเมอร์

สุพัตรา (2549) จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 94 ตัวอย่าง จากการจัดจำแนกโดยวิธี RAPD พบว่าสามารถจำแนกมันสะปะหลังได้เป็น 18 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยใช้นิวคลีโอไทด์ 15 ไพรเมอร์ ซึ่งจะมีความละเอียดมากกว่าการจัดจำแนกโดยใช้ทางสัณฐานวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ใบอ่อนมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ตรัง ควนเนียง และสุไหงโกลก จากการเก็บรวบรวมพันธุ์จากแปลงปลูกของศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา

2. สารเคมี

2.1 สารที่ใช้ในการสกัด DNA

1) ไนโตรเจนเหลว

2) PEB (Plant Extraction buffer) [1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl, 20% SDS, 0.38% Sodium bisulfile, ddH_2O]

3) 5 M Potassium acetate

4) Ethanol เข้มข้น 70 และ 100 เปอร์เซ็นต์

5) TE buffer pH 8.0 (1M Tris HCl, 0.5M EDTA)

2.2 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำ RAPD

1) dNTPs

2) 25mM Magnesium Chloride

3) *Taq* DNA polymerase [Fermentas] เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร

4) Primer

5) Ultrapure water

6) 10x Buffer

2.3 สารเคมีสำหรับ electrophoresis

1) Agarose gel

2) 0.5x TBE (Tris Borate EDTA) buffer

3) Ethedium bromide

4) Bromophenol blue

3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

3.1 ตู้เย็น รุ่น SR-F517 (Sanyo)

3.2 ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส รุ่น VXE 380 (Jouan)

3.3 ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SF-C697 (GYN) (Sanyo)

3.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WNB22 (Memmert)

3.5 เครื่องสังเคราะห์ DNA (PCR) รุ่น PTC-100™(MJ Research,Inc.)

3.6 เครื่องถ่ายภาพ DNA Gene Genius (SYNGene)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 โกร่งบดตัวอย่าง

3.8 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาณ (0.2, 0.5, 2, 10, 20, 200, 1000)

3.9 หลอดใส่สารขนาดเล็ก 1.5 และ 0.5 มิลลิลิตร

3.10 เครื่องแก้ว

3.11 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 310S (Sartorius)

3.12 เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BL 1500 (Sartorius)

3.13 Hotplate stirrer รุ่น HS-101 (GEM)

3.14 pH-meter รุ่น C831 (CONSORT)

3.15 หม้อนึ่งความดัน รุ่น HVE-25 (Hirayama)

3.16 เครื่อง centrifuge รุ่น 16M (Labnet)

3.17 เครื่อง vortex รุ่น G560E (Genie)

3.18 ชุด Horizontal electrophoresis รุ่น GEL X_L ULTRA™ V-2 (Labnet)

3.19 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ ไมโครเวฟ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษติดป้าย ปากกาเคมี แผ่นอะลูเนียมฟอยล์ ดินผสม

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืช

ปลูกมันขี้หนู 3 พันธุ์ (ภาพที่ 1) ซึ่งพ้นระยะพักตัวและกำลังงอกลงในกระถางขนาด 12 นิ้ว ที่ใส่ดินผสมระหว่างดินร่วนกับดินทราย และใส่หัวมันขี้หนูประมาณ 10-15 หัวต่อ 1 กระถาง แล้วกลบดินทับลงไปในหัวมันขี้หนู รดน้ำเมื่อดินขาดความชื้น เมื่อถึงอายุประมาณ 14 วัน (ภาพที่ 2) ทำการตัดใบอ่อนนำใบมาล้างให้สะอาดซับให้แห้ง ใส่ในถุงพลาสติกและแช่ในกล่องน้ำแข็ง เก็บไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอสกัด DNA ต่อไป

ภาพที่ 1 หัวมันขี้หนูที่ปลูกเพื่อนำใบมาสกัด DNA ทั้ง 3 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2 มันขี้หนูปลูกไว้ในโรงเรือนเป็นเวลา 2 สัปดาห์

2. วิธีสกัด DNA

2.1 บดตัวอย่างใบมันขี้หนูลงในโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลว ให้ละเอียด แล้วถ่ายใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 เติม PEB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ที่บ่มในอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วทำการเขย่าแรงๆ ด้วยเครื่อง Vortex

2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.4 เติม 5M KAc ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 ถึง 60 นาที

2.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.6 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.7 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.8 เทสารลงในหลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.9 เติม ethanol เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น ปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อตกตะกอน DNA

2.10 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.11 เทสารละลายทิ้ง

2.12 ล้างตะกอน DNA ด้วย ethanol เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นด้วยปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง

2.13 ตาก DNA ให้แห้ง

2.14 ละลาย DNA ด้วย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

2.15 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจสอบคุณภาพและวัดค่าความเข้มข้นของ DNA

3.1 วิธีอิเลคโทรโฟรีซิส

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5 TBE buffer หลอมในเครื่องไมโครเวฟจนเดือด นำมาวางบน hotplate stirrer และคนจนกระทั่งเจลมีอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-55 องศาเซลเซียส เตรียมถาดที่มีหวีลงไปในตำแหน่งที่กำหนด เท agarose gel ลงไปแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 45 นาที ดึงหวีออก นำเจลใส่เครื่องอิเลคโทรโฟรีซิส ใส่ 0.5xTBE buffer สูงกว่าเจล 2-3 มิลลิเมตร และเตรียมสารละลาย DNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อ dye 3 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องของแผ่นเจล เทียบกับ DNA มารตรฐาน จากนั้นต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ประมาณ 30 นาที นำมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 10 นาที แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที นำเจลไปตรวจสอบคุณภาพภายใต้แสง UV แล้วทำการบันทึกภาพ จากนั้นทำการละลาย DNA ให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บรักษา DNA ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำ PCR ต่อไป

4. การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค RAPD

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

4.1.1 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ โดยใช้ปริมาตรแตกต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่ 1 และ 1.25 ไมโครลิตร

4.1.2 ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase โดยใช้ปริมาตร 2 ระดับ ได้แก่ 0.1 และ 0.15 ไมโครลิตร

4.1.3 ความเข้มข้นของ dNTPs โดยใช้ปริมาตรแตกต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่ 0.1 และ 0.2 ไมโครลิตร

4.1.4 ความเข้มข้นของ DNA แม่แบบ โดยใช้ปริมาตรแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 2.5, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

4.2 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA มันขี้หนูโดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 95 ชนิด มาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR กับมันขี้หนู เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผล PCR ที่ชัดเจน โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

dd H_2O	5.9	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.2	ไมโครลิตร
10x buffer	1	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	1.25	ไมโครลิตร
10 µM Primer	0.5	ไมโครลิตร
2.5 ng DNA	1	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 U/µl *Taq* DNA polymerase	0.15	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

การทำ PCR จากตัวอย่างทั้ง 3 โดยเตรียมสารละลายของ buffer, $MgCl_2$, DNA template, *Taq* DNA polymerase และ น้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (Master mixture) แบ่งใส่ทีละหลอด โดยแต่ละหลอดจะมีไพรเมอร์แต่ละชนิดอยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ดังนี้

1) 94 องศาเซลเซียส 2 นาที
2) 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
3) 35 องศาเซลเซียส 30 วินาที
4) 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 45 รอบ

5) 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ

รักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวิเคราะห์ DNA ต่อไป

5. การตรวจสอบขนาดชิ้นของ DNA ด้วยวิธีอิเลคโทรโฟริซิส

ภายหลังจากทำ PCR นำผลผลิตที่ได้ปริมาตร 7 ไมโครลิตร มาตรวจสอบโดยอิเลคโทรโฟไลซิสบน agarose gel ความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ใน 0.5xTBE buffer โดยใช้ DNA มาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของ DNA ใช้แรงเคลื่อนที่ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 10 นาที และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บันทึกลักษณะรูปแบบ DNA ที่ปรากฏจากการทำ RAPD markers นำข้อมูลมาคำนวณค่าต่างๆ ดังนี้

1. คำนวณค่า Polymorphism rate สูตร

% polymorphic loci = จำนวน polymorphic loci x 100/จำนวน loci ทั้งหมดที่ศึกษา

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (ADB) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาการดำเนินงาน

เดือนสิงหาคม 2550 – เมษายน 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การสกัด DNA จากมันขี้หนู

DNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของมันขี้หนูโดยวิธีการประยุกต์จากวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) เมื่อตรวจสอบโดยอิเลคโทรโฟรีซิส พบว่าได้ DNA ที่มีคุณภาพดีดังแสดงในภาพที่ 3

ภาพที่ 3 genomic DNA ของมันขี้หนู (M = DNA มาตรฐานเข้มข้น 20 นาโนกรัม, 1-4 = ตรัง, 5-7 = ควนเนียง และ 8-9 = สุไหงโกลก ตามลำดับ)

การหาสภาพที่เหมาะสมในการทำ PCR

1. การทดสอบความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์

จากการทำปฏิกิริยา PCR โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 2 ระดับได้แก่ 1 และ 1.25 ไมโครลิตร พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ในดีเอ็นเอของมันขี้หนูคือ 1.25 ไมโครลิตร ซึ่งให้แถบ DNA ที่ชัดเจน ในขณะที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ 1 ไมโครลิตร ไม่สามารถสังเคราะห์แถบ DNA มันขี้หนูได้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ (ไมโครลิตร)	ลักษณะการเกิดแถบของ DNA
1	ไม่เกิดแถบ
1.25	เกิดแถบชัด

2. การทดสอบความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase

จากการทดสอบระดับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase 2 ระดับ ได้แก่ 0.1 และ 0.15 ไมโครลิตร พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ใน DNA มันขี้หนูคือ 0.15 ไมโครลิตร ส่วนในความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร เกิดแถบของ DNA ไม่ชัดเจน (ตารางที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase (ไมโครลิตร)	ลักษณะการเกิดแถบของ DNA
0.1	เกิดแถบไม่ชัด
0.15	เกิดแถบชัด

3. ผลการปรับความเข้มข้นของ dNTPs

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ dNTPs 2 ระดับได้แก่ 0.1 และ 0.2 ไมโครลิตร พบว่าความเข้มข้นของ dNTPs ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR คือ 0.2 ไมโครลิตร และที่ความเข้มข้นของ dNTPs 0.1 ไมโครลิตร ไม่เกิดแถบ DNA (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ dNTPs ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

ความเข้มข้นของ dNTPs (ไมโครลิตร)	ลักษณะการเกิดแถบของ DNA
0.1	ไม่เกิดแถบ
0.2	เกิดแถบชัด

4. การทดสอบความเข้มข้นของ DNA แม่แบบ

ในการเปรียบเทียบเพื่อหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA โดยเปรียบเทียบความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 2.5, 5, 10, 20 และ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR คือ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ DNA ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

ความเข้มข้นของ DNA (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	ลักษณะการเกิดแถบของ DNA
2.5	เกิดแถบชัด
5	ไม่เกิดแถบ
10	ไม่เกิดแถบ
20	ไม่เกิดแถบ
40	เกิดแถบไม่ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองเตรียมส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา PCR โดยนำความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์ 1.25 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.15 ไมโครลิตร, dNTPs 0.2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ H-13 เข้มข้น 0.5 ไมโครลิตร, DNA แม่แบบ 1 ไมโครลิตร, 10x buffer 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 5.9 ไมโครลิตร รวมทั้งหมดเป็น 10 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบกับ DNA มันขี้หนูจำนวน 3 สายพันธุ์ สามารถให้แถบของ DNA ของมันขี้หนูที่ชัดเจนและแสดงความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ DNA ที่ความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ของมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ โดยเทคนิค RAPD จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ H-13 (M คือแถบ DNA มาตรฐาน, 1-2=ตรัง, 3-4=ควนเนียง, 5-6=สุไหงโกลก ตามลำดับ)

การจำแนกพันธุ์มันขี้หนูโดยเทคนิค RAPD

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์จำนวน 95 ชนิด (ตารางผนวกที่ 1) กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ตรัง ควนเนียง และสุไหงโกลก เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ DNA ของมันขี้หนูได้ พบว่ามี 38 ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ทั้ง 3 พันธุ์ คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด และให้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 100 แถบ จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่เกิดแถบ DNA ชัดเจนมากกว่า 4 แถบมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในมันขี้หนูทั้ง 3 พันธุ์ จำนวน 14 ไพรเมอร์ ได้แก่ A-09, A-10, A-11, C-02, C-11, D-20, K-07, Y-02, AA-16, AB-09, AI-02, AL-06, AT-07 และ AU-14

จากการทดสอบทั้ง 14 ไพรเมอร์ พบว่าแต่ละไพรเมอร์ให้จำนวนแถบ DNA 5-11 แถบ โดยมีจำนวน polymorphic band 1-5 โดยไพรเมอร์ AU-14 ให้จำนวน polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphic bands สูงสุดคือ 5 และ 55.6 ตามลำดับ ในขณะที่ไพรเมอร์ AL-06, AB-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

09 และ C-02 ให้จำนวน polymorphic bands ต่ำสุดคือ 1 และให้เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands 9.1, 12.5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และแต่ละไพรเมอร์สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้แตกต่างกัน

ไพรเมอร์ A-09 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอมันขี้หนูได้จำนวน 6 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 370-1,500 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 650, 750, 800, 1,250 และ 1,500 คู่เบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 370 คู่เบส พบได้ในสายพันธุ์สุไหงโกลกและควนเนียง แตกต่างกับสายพันธุ์ตรังที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ในขณะที่แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส พบเฉพาะในสายพันธุ์สุไหงโกลก

ไพรเมอร์ A-10 สังเคราะห์ดีเอ็นเอมันขี้หนูจำนวน 5 แถบ ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 700, 750, 800 และ 1,300 โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 750 และ 800 คู่เบส ในมันขี้หนูสายพันธุ์สุไหงโกลกและควนเนียง

ไพรเมอร์ A-11 พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอมันขี้หนูจำนวน 7 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 370-1,000 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 450, 500, 600, 750, 900 และ 1,000 โดยพบแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขนาด 370 และ 450 คู่เบส เฉพาะในสายพันธุ์สุไหงโกลกในขณะที่สายพันธุ์ตรังและควนเนียงไม่สามารถสังเคราะห์ได้

ไพรเมอร์ C-02 สร้างดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 370-1,000 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 600, 650, 870 และ 1,000 ซึ่งพบความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวคือที่แถบ DNA ขนาดประมาณ 370 คู่เบส ในสายพันธุ์สุไหงโกลก

ไพรเมอร์ C-11 พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 8 แถบ ขนาด 500-1,500คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 500, 600, 650, 700, 800, 1,000, 1,200 และ 1,500 พบว่าสายพันธุ์สุไหงโกลกและควนเนียงสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500, 600 และ 1,500 คู่เบส ซึ่งสายพันธุ์ตรังไม่สามารถสังเคราะห์ได้

ไพรเมอร์ D-20 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอมันขี้หนูจำนวน 7 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 700-1,500 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 700, 750, 800, 900, 1,000, 1,200 และ 1,500 โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส สามารถสังเคราะห์ในสายพันธุ์ควนเนียงและสุไหงโกลก ส่วนในสายพันธุ์ตรังไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ ในขณะที่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส พบในสายพันธุ์ตรังและควนเนียง แต่ไม่พบในสายพันธุ์สุไหงโกลกได้

ไพรเมอร์ K-07 พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 8 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 370-1,120 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 400, 500, 550, 600, 650, 870 และ 1,120 โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส สามารถสังเคราะห์ได้ในสายพันธุ์สุไหงโกลกและควนเนียง และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,120 พบเฉพาะในสายพันธุ์สุไหงโกลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพรเมอร์ Y-02 สร้างแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 500-1,400 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 500, 700, 750, 1000, 1,200 และ 1,400 ซึ่งดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 และ 1,400 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ในสายพันธุ์สุไหงโกลกและควนเนียง ในสายพันธุ์ตรังไม่สามารถสังเคราะห์ได้

ไพรเมอร์ AA-16 พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 500-1,300 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 500, 700, 750, 800, 1,000 และ 1,300 โดยแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 และ 1,300 คู่เบส สามารถสังเคราะห์ได้เฉพาะในสายพันธุ์สุไหงโกลก

ไพรเมอร์ AB-09 สังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 8 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 400-1,400 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 400, 500, 600, 700, 750, 870, 1,000 และ 1,400 ซึ่งมีเพียงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบสเท่านั้นที่พบในสายพันธุ์สุไหงโกลกและควนเนียง

ไพรเมอร์ AI-02 สร้างแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 400-1,200 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 400, 550, 700, 1,000, 1,100 และ 1,200 ซึ่งแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 คู่เบส พบเฉพาะในสายพันธุ์สุไหงโกลก ในขณะที่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 และ 1,000 ในสายพันธุ์ควนเนียงและสุไหงโกลก แต่ไม่พบในสายพันธุ์ตรัง

ไพรเมอร์ AL-06 สังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 11 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 370-1,250 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 400, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 870, 1,120 และ 1,250 มีเพียง 1 แถบที่ขนาดประมาณ 370 คู่เบส ในสายพันธุ์ควนเนียง แต่ไม่พบในสายพันธุ์ตรังและสุไหงโกลก

ไพรเมอร์ AT-07 สังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 8 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 370-1,000 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 400, 450, 500, 600, 750, 870 และ 1,000 โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400, 500, 600 และ 750 คู่เบส ในสายพันธุ์ควนเนียงและสุไหงโกลก

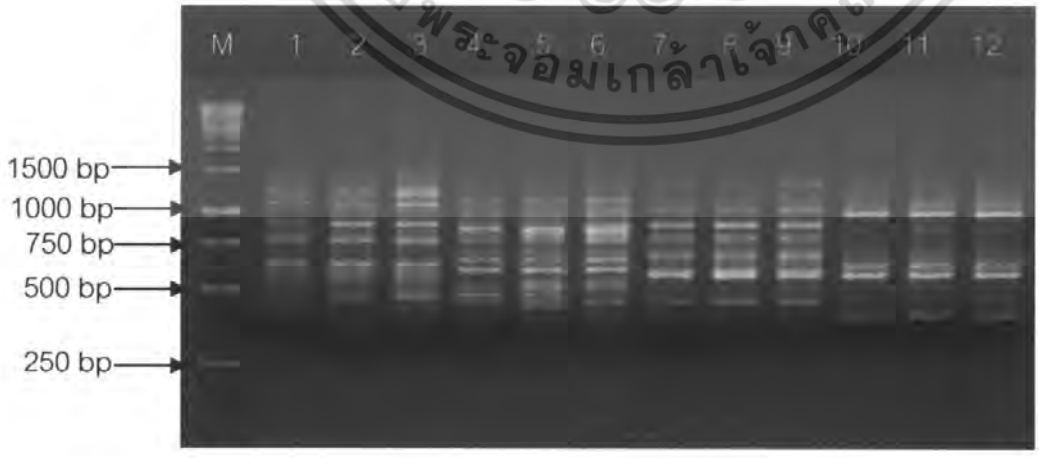
ไพรเมอร์ AU-14 สังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวน 9 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 370-1,000 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 370, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 900 และ 1,000 ซึ่งแถบที่มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส พบในสายพันธุ์ควนเนียง ส่วนสายพันธุ์ตรังและสุไหงโกลกไม่สามารถพบแถบดังกล่าว ในขณะที่การสังเคราะห์ที่ขนาดประมาณ 550, 600, 700 และ 1,000 คู่เบส พบได้ทั้งในสายพันธุ์สุไหงโกลกและควนเนียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ และจำนวนแถบ DNA ที่ให้ polymorphism

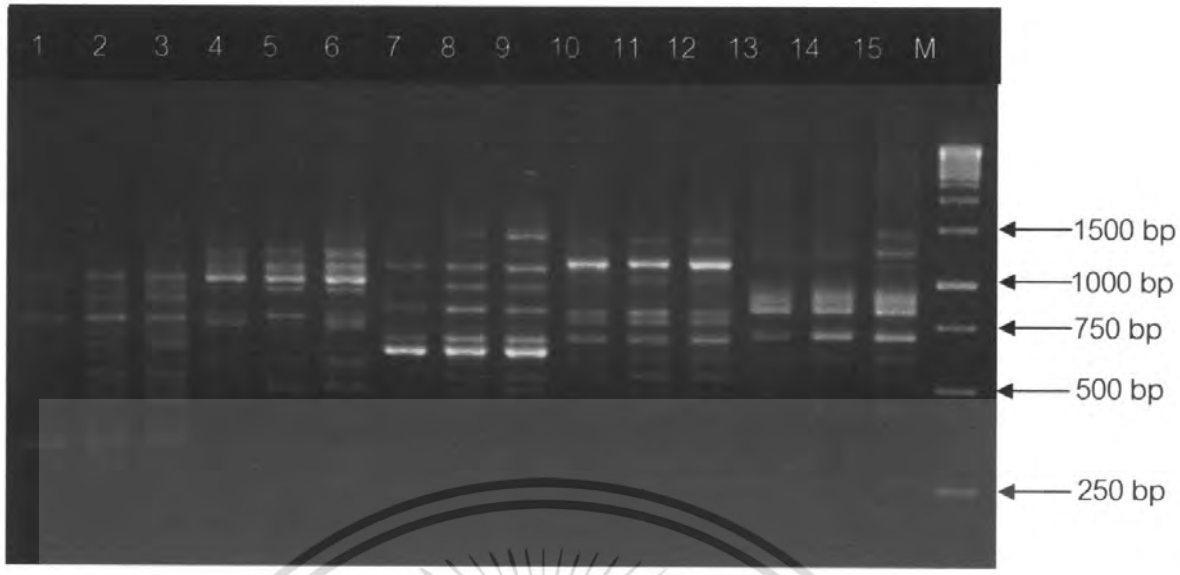
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	% polymorphic bands
A-09	gggTAACgCC	6	2	33.3
A-10	gTgATCgCAg	5	2	40.0
A-11	CAATCgCCgT	7	2	28.6
C-02	gTgAggCgTC	5	1	20.0
C-11	AAAgCTgCgg	8	3	37.5
D-20	ACCCggTCAC	7	2	28.6
K-07	AgCgAgCAAg	8	2	25.0
Y-02	CATCgCCgCA	6	2	33.3
AA-16	ggAACCCACA	6	2	33.3
AB-09	gggCgACTAC	8	1	12.5
AI-02	AgCCgTTCAg	6	3	50.0
AL-06	AAgCgTCCTC	11	1	9.1
AT-07	ACTgCgACCA	8	4	50.0
AU-14	CACCTCgACC	9	5	55.6



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-06 (1, 2, 3), K-07 (4, 5, 6), AB-09 (7, 8, 9), C-02 (10, 11, 12) กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 4, 7, 10=ตรัง, 2, 5, 8, 11=ควนเนียง, 3, 6, 9, 12=สุไหงโกลก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

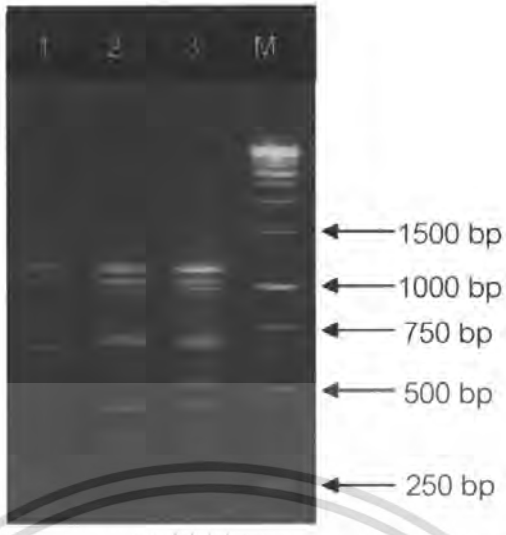
102716



ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AT-07 (1, 2, 3), A-11 (4, 5, 6), C-11 (7, 8, 9), Y-02 (10, 11, 12), A-09 (13, 14, 15) กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 4, 7, 10, 13=ตรัง, 2, 5, 8, 11, 14=ควนเนียง, 3, 6, 9, 12, 15=สุไหงโกลก)

ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ A-10 (1, 2, 3), AA-16 (4, 5, 6), AU-14 (7, 8, 9,), D-20 (10, 11, 12) กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 4, 7, 10=ตรัง, 2, 5, 8, 11=ควนเนียง, 3, 6, 9, 12=สุไหงโกลก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AI-02 กับมันขี้หนู 3 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1=ตรัง, 2=ควนเนียง, 3=สุไหงโกลก)

ตารางที่ 6 แถบ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ 14 ชนิด กับ DNA มันขี้หนู 3 สายพันธุ์

ไพรเมอร์	จำนวนแถบ DNA	ขนาดของแถบ DNA (กิโลเบส)
A-09	6	0.37, 0.65, 0.75, 0.8, 1.25, 1.5
A-10	5	0.37, 0.7, 0.75, 0.8, 1.3
A-11	7	0.37, 0.45, 0.5, 0.6, 0.75, 0.9, 1.0
C-02	5	0.37, 0.6, 0.65, 0.87, 1.0
C-11	8	0.5, 0.6, 0.65, 0.7, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5
D-20	7	0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5
K-07	8	0.37, 0.4, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.87, 1.12
Y-02	6	0.5, 0.7, 0.75, 1.0, 1.2, 1.4
AA-16	6	0.5, 0.7, 0.75, 0.8, 1.0, 1.3
AB-09	8	0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.75, 0.87, 1.0, 1.4
AI-02	6	0.4, 0.55, 0.7, 1.0, 1.1, 1.2
AL-06	11	0.37, 0.4, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.87, 1.12, 1.25
AT-07	8	0.37, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.75, 0.87, 1.0
AU-14	9	0.37, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.7, 0.9, 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

การปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ โดยความเข้มข้นที่ 1.5 ไมโครลิตร เป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ทดลองโดยทั่วไป (สุรินทร์, 2545) สำหรับในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ 1.25 ไมโครลิตร จากเดิมใช้ 1 ไมโครลิตร ทำให้เห็นแถบ DNA ชัดขึ้น เนื่องจากแมกเนียมเซียมไอออนเป็นสารที่ช่วยเร่งในปฏิกิริยา PCR โดยตรง กรณีที่มีปริมาณแมกเนียมไอออนมากทำให้รวมสารเข้ามาจับตัวกันมากเกินทำให้ได้แถบ DNA ที่ไม่ใช้เป้าหมายที่แท้จริงเพิ่มมากขึ้น ถ้ามีแมกเนียมไอออนในปริมาณน้อย (น้อยกว่า 0.5 ไมโครลิตร) ผลในการทำปฏิกิริยาก็จะลดลง (Dieffenbach and Gabriela, 2003)

ในการหาความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase จาก 0.1 ไมโครลิตร เพิ่มเป็น 0.15 ไมโครลิตร ทำให้มีการสังเคราะห์ DNA ได้ดีมากขึ้น และเพิ่มเวลาในขั้นสุดท้ายของการสังเคราะห์ DNA ต่อจากการจับของไพรเมอร์กับ DNA แม่แบบ โดยอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดสำหรับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase คือ 72 องศาเซลเซียส (สุรินทร์, 2545) เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เห็นแถบ DNA ชัดมากขึ้น และความเข้มข้นของ dNTPs ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA คือ 0.2 ไมโครลิตร เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับแมกนีเซียมไอออนให้ช่วยเข้าทำปฏิกิริยา ปริมาณ dNTPs จึงเป็นตัวกำหนดปริมาณ free Mg^{2+} ในปฏิกิริยา (ธนวัฒน์, 2546) ความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมคือ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ทำการทดลองในมันฝรั่งโดยที่ DNA แม่แบบมีความเข้มข้น 3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Demeke *et al.*, 1996)

ผลการใช้เทคนิค RAPD ในมันขี้หนู

จากการทดลองพบว่าเทคนิค RAPD ทำให้เกิดความหลากหลายของรูปแบบการสังเคราะห์แถบ DNA ระหว่างสายพันธุ์มันขี้หนู ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างกันเกิดจากสาเหตุการเปลี่ยนแปลงเบสใดเบสหนึ่งที่เข้าไปจับกับไพรเมอร์ รูปแบบของแถบ DNA ที่เกิดจากการใช้ arbitary primer ในการทำ RAPD สามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ (William *et al.*, 1990) เทคนิค RAPD เป็นวิธีที่สะดวกและทำได้รวดเร็วกว่าเทคนิคอื่น แต่การใช้เทคนิค RAPD มีข้อจำกัดที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยอาจได้ผลที่แตกต่างออกไป ดังนั้นแต่ละครั้งที่ทำการทดลองขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้สามารถเปลี่ยนแปลงค่าที่เกิดขึ้น (Ellsworth *et al.*, 1993) นอกจากนี้คุณภาพดีเอ็นเอต้นแบบก็มีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (สุพัตรา, 2549) จากการสังเกตดีเอ็นเอที่สกัดในการทดลองครั้งนี้มีสีขาวจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอที่ได้ไม่บริสุทธิพอ การหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับมันขี้หนูจึงมีความสำคัญต่อการนำไปใช้เพื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันขี้หนูต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ RAPD marker พบว่าการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3.125 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.75 ยูนิต dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์และ DNA แม่แบบเข้มข้น 2.5 นาโนกรัม ให้แถบ DNA ชัดเจนที่สุด และเมื่อนำไปใช้ในการจำแนกมันขี้หนูจำนวน 3 สายพันธุ์ โดยใช้ RAPD จำนวน 95 ไพรเมอร์ พบว่ามี 14 ไพรเมอร์ ที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ได้แก่ A-09, A-10, A-11, C-02, C-11, D-20, K-07, Y-02, AA-16, AB-09, AI-02, AL-06, AT-07 และ AU-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จารุยา ขอพลอยกลาง. 2537. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสภาพการปลูกของมันหนู. รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 11. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. หน้า 213-218.

จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2536. การผลิตมันพื้นเมืองภาคใต้: มันขี้หนู. ใน: กองฝึกอบรมกรมส่งเสริมการเกษตร, ผู้รวบรวม. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรพืชเศรษฐกิจสำคัญในท้องถิ่น. วันที่ 25-28 เมษายน 2536 ณ โรงแรมกาลพฤกษ์ จ.สุพรรณบุรี. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2542. มันขี้หนู. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการเรื่องทิศทางการผลิตพืชไร่ภาคใต้ในทศวรรษหน้า. วันที่ 9-10 มิถุนายน 2542 ณ โรงแรมเจบี อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา. ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา, สงขลา.(อัดสำเนา)

ฏายิน ทัศนเสถียร. 2543. คุณสมบัติและการนำไปใช้ประโยชน์ของแป้งมันขี้หนู. วิทยานิพนธ์วิทยศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เทอด สุวรรณคีรี. 2529. มันขี้หนู: พืช, น. 2766. ใน: สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์, บรรณาธิการ. สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. สถาบันทักษิณคดีศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สงขลา, สงขลา.

ธนวัฒน์ ชูช่อ. 2546. การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยใช้เทคนิค อาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 93 หน้า.

พรพันธ์ ภูพร้อมพันธุ์. 2538. เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี RAPD. อ้างโดย: วิไลพร น้อยบุรี. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุ์กรรมในถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merrill] โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิค RAPD และ AFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 146 หน้า.

วิไลพร น้อยบุรี. 2547. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุ์กรรมในถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merrill] โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิค RAPD และ AFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 146 หน้า.

สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ และสุภิญญา ติ๋วตระกูล. 2548. องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยและฤทธิ์ทางชีวภาพของใบมันขี้หนู (*Coleus parvifolius*.) วารสารสงขลานครินทร์. 27 (ฉบับพิเศษ 2): 497-502.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุพัตรา คงสมมาตย์. 2549. การใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ในการจัดจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 98 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

Dellaporta, S.L., Wood J. and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation:version II. Plant Mol. Biol. Reporter. 1:19-21.

Demeke, T. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. อ้างโดย: ธนวัฒน์ ซูซ่อ. การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) **โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 93 หน้า.**

Dieffenbach Carl, W. and S. Gabriela. 2003. PCR Primer : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Harbor, New York. 519 pp.

Ellsworth, D.L., Rittenhouse K.D. and R.L. Honeycutt. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. Biotechnique. 14: 214-217.

IT IS. 2006. *Solenostemon rotundifolius* (Poiret) J.K. Morton; Taxonomic Serial No. 506021. IT IS Report. [http://www.itis.usda.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506021] June 5, 2006.

Jayakody, L., Hoover R., Liu Q. and E. weber. 2004. Studies on tuber and root starches. I: Structure and physiochemical properties of innala (*Solenostemon rotundifolius.*) starches grown in Sri Lanka. Food Research International. [http://www.sciencedirect.com] February 24, 2008.

Kishorekumar, A., Jaleel C.A., Manivannan P., Sankar B., Panneerselvam R. and R. Sridharan. 2007. Comparative effects of different triazole compounds on antioxidant metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. [http://www.sciencedirect.com] February 24, 2008.

Kishorekumar, A., Jaleel C.A., Manivannan P., Sankar B., Panneerselvam R. and R. Sridharan. 2007. Comparative effects of different triazole compounds on growth, photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. [http://www.sciencedirect.com] February 24, 2008.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

McCouch, S.R. 1997. Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. อ้างโดย: วิไลพร น้อยบุรี. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุ์กรรมในถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merrill] โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเทคนิค RAPDและ AFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 146 หน้า.

MULTILINGUAL MULTISCRIPT PLANT NAME DATABASE, 2006. Sorting Plectranthus names. [http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Plectranthus.html] June 5,2006.

Niino, T., Hettiarachchi A., Takahashi J. and P.K. Samarajeewa. 2000. Cryopreservation of lateral buds of in vitro-grown innala plants (*Solemostemon rotundifolius*) by vitrification. Cryo Letters. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db= pubmed&uid =12148027&cmd=showdetailview&indexed=google] February 24, 2008.

Parent, J.G. and D. Page. 1998. Identification of rasberry cultivars by sequence characterized amplified region DNA analysis. อ้างโดย: ธนวัฒน์ ชูช่อ. การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 93 หน้า.

Pipithsangchan, S., Butpha T., Palintorn P., Yuenyongsawad S. and S. Subhadhirasakul. 2000. Study on activity of some indigenous plants of Southern Thailand on the mortality of diamondback moth. Songkhlanakarin J. Sci. Technol. 22 : 447- 455.

Staub, J. 1996. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. อ้างโดย: ธนวัฒน์ ชูช่อ. การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 93 หน้า.

Tewtrakul, S., Miyashiro H., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., Yoshinaga T., Fujiwara T., Supavita T., Yuenvongsawad S., Rattanasuwon P. and S. Dej-Adisai. 2003. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. Phytother Res. 17 : 232-239.

USDA-NRCS, 2006. *Solenostemon rotundifolius* (Poiret) J.K. Morton; hausa potato. PLANTS Profile. [http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SORO5] June 5, 2006.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Welsh, J. and M. Meclelland. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. Nucleie Acids Res. [http://dna.kps.ku.ac.th/mcrop/Technique11_RAPD.html] February 23, 2008.

Williams, J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski K.J. and S.U. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. [http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique11_RAPD.html] February 23, 2008.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารเคมีในการสกัด DNA

1. Plant extraction buffer (PEB)

1M Tris-HCl [pH8]	10	ml
0.5M EDTA [pH8]	10	ml
5M NaCl	10	ml
20% SDS	6.25	ml
Sodium bisulfile	0.38	ml
ddH_2O	63.75	ml

ปรับ pH = 8 ด้วย 4N NaOH

2. การเตรียม 1M Tris-HCl [pH8]

ชั่งสาร Tris-(hydroxymethy)-aminomethane 121.1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8 โดย HCl ประมาณ 42 มิลลิลิตร (ใส่ตอนที่สารมีอุณหภูมิเท่ากับห้อง) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใส่ขวด และทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (ถ้าสารเป็นสีเหลืองให้ทิ้ง)

3. การเตรียม 0.5M EDTA [pH8]

ชั่งสาร Disodium ethylenediamineletra acetate 186.1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนสารแรงๆ และปรับ pH เท่ากับ 8 ด้วย NaOH ประมาณ 20 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ใส่ขวดและทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (EDTA จะไม่ละลายถ้า pH ไม่ถึง 8)

4. การเตรียม 5M NaCl

ชั่งสาร Sodium chloride 292.2 กรัม ใส่น้ำกลั่นลงไป 800 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส คนจนสารละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. การเตรียม 20% SDS

ชั่งสาร Sodium dodecyl Sulfate 200 กรัม ค่อยๆ เทลงในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับ pH เท่ากับ 7.2 โดยใช้สาร HCl ประมาณ 3 หยด แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

6. การเตรียม 5X TBE buffer

ชั่งสาร Tris-(hydroxymethy)-aminomethane 54 กรัม Boric acid 27.5 กรัม 0.5M EDTA (pH8) = 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

7. การเตรียม 5M KAc

ชั่งสาร Potassium acetate 98.15 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 180 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH เท่ากับ 7.5 ด้วย 2M acetic acid ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร (ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. การเตรียม 4N NaOH

ชั่งสาร Sodium hydroxide 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

9. การเตรียม TE buffer pH8

ใส่น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เติม 1M Tris-HCl [pH8] 1มิลลิลิตร, 0.5M EDTA [pH8] 0.2, ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียม Agarose gel

1. ชั่งสาร Agarose ใส่ลงในสารละลาย 0.5X TBE หลอมใน microwave จนละลายหมด

2. วางสารที่หลอมไว้บน stirrer คนจนกระทั่ง gel มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (อย่าให้มีฟองอากาศ) แล้วนำมาเทลงตรงกลาง Tray ไล่ฟองอากาศออกให้หมด

3. วางทิ้งไว้ 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 95 ชนิด

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	บริษัท
A-01	CAggCCCTTC	Operon Technologies
A-02	TgCCgAgCTg	Operon Technologies
A-03	AgTCAgCCAC	Operon Technologies
A-04	AATCgggCTg	Operon Technologies
A-05	AggggTCTTg	Operon Technologies
A-06	ggTCCCTgAC	Operon Technologies
A-07	gAAACgggTg	Operon Technologies
A-08	gTgACgTAgg	Operon Technologies
A-09	gggTAACgCC	Operon Technologies
A-10	gTgATCgCAg	Operon Technologies
A-11	CAATCgCCgT	Operon Technologies
A-12	TCggCgATAg	Operon Technologies
A-13	CAgCACCCAC	Operon Technologies
A-14	TCTgTgCTgg	Operon Technologies
A-15	TTCCgAACCC	Operon Technologies
A-16	AgCCAgCgAA	Operon Technologies
A-17	gACCgCTTgT	Operon Technologies
A-18	AggTgACCgT	Operon Technologies
A-19	CAAACgTCgg	Operon Technologies
A-20	gTTgCgATCC	Operon Technologies
C-01	TTCgAgCCAg	Operon Technologies
C-02	gTgAggCgTC	Operon Technologies
C-03	gggggTCTTT	Operon Technologies
C-04	CCgCATCTAC	Operon Technologies
C-05	gATgACCgCC	Operon Technologies
C-06	gAACggACTC	Operon Technologies
C-07	gTCCCgACgA	Operon Technologies
C-08	TggACCggTg	Operon Technologies

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 **(ต่อ)** ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 95 ชนิด

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	บริษัท
C-09	CTCACCgTCC	Operon Technologies
C-10	TgTCTgggTg	Operon Technologies
C-11	AAAgCTgCgg	Operon Technologies
C-12	TgTCATCCCC	Operon Technologies
C-13	AAgCCTCgTC	Operon Technologies
C-14	TgCgTgCTTg	Operon Technologies
C-15	gACggATCAg	Operon Technologies
C-16	CACACTCCAg	Operon Technologies
C-17	TTCCCCCCAg	Operon Technologies
C-18	TgAgTgggTg	Operon Technologies
C-19	gTTgCCAgCC	Operon Technologies
C-20	ACTTCgCCAC	Operon Technologies
D-20	ACCCggTCAC	Operon Technologies
E-18	ggACTgCAgA	Operon Technologies
F-07	CCgATATCCC	Operon Technologies
F-09	CCAAgCTTCC	Operon Technologies
F-12	ACggTACCAg	Operon Technologies
F-13	ggCTgCAgAA	Operon Technologies
F-18	TTCCCgggTT	Operon Technologies
G-13	CTCTCCgCCA	Operon Technologies
H-11	CTTCCgCAgT	Operon Technologies
H-12	ACgCgCATgT	Operon Technologies
H-13	gACgCCACAC	Operon Technologies
H-14	ACCAggTTgg	Operon Technologies
H-15	AATggCgCAg	Operon Technologies
H-18	gAATCggCCA	Operon Technologies
K-04	CCgCCCAAAC	Operon Technologies
K-07	AgCgAgCAAg	Operon Technologies

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 95 ชนิด

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	บริษัท
K-08	gAACACTggg	Operon Technologies
K-16	gAgCgTCgAA	Operon Technologies
Q-05	CCgCgTCTTg	Operon Technologies
Y-02	CATCgCCgCA	Operon Technologies
AA-09	AgATgggCAg	Operon Technologies
AA-16	ggAACCCACA	Operon Technologies
AA-17	gAgCCCgACT	Operon Technologies
AB-02	ggAAACCCCT	Operon Technologies
AB-09	gggCgACTAC	Operon Technologies
AB-14	AAgTgCgACC	Operon Technologies
AD-20	TCTTCggAgg	Operon Technologies
AE-19	gACAgTCCCT	Operon Technologies
Ag-14	CTCTCggCgA	Operon Technologies
Ag-16	CCTgCgACAg	Operon Technologies
AH-17	CAgTggggAg	Operon Technologies
AI-01	ggCATCggCT	Operon Technologies
AI-02	AgCCgTTCAg	Operon Technologies
AI-07	ACgAgCATgg	Operon Technologies
AI-09	TCgCTggTgT	Operon Technologies
AI-11	ACggCgATgA	Operon Technologies
AI-17	CCTCACgTCC	Operon Technologies
AK-04	AgggTCggTC	Operon Technologies
AK-10	CAAgCgTCAC	Operon Technologies
AL-05	gACTgCgCCA	Operon Technologies
AL-06	AAgCgTCCTC	Operon Technologies
AL-08	gTCgCCCTCA	Operon Technologies
AL-20	AggACTCggA	Operon Technologies
AN-02	CACCgCAgTT	Operon Technologies

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 95 ชนิด

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	บริษัท
AN-05	gggTgCAgTT	Operon Technologies
AN-19	ACCACgCCTT	Operon Technologies
AO-18	gggAgCgCTT	Operon Technologies
AT-07	ACTgCgACCA	Operon Technologies
AU-03	ACgAAACggg	Operon Technologies
AU-14	CACCTCgACC	Operon Technologies
AV-08	TgAgAAgCgg	Operon Technologies
AW-07	AgCCCCCAAg	Operon Technologies
AW-15	CCAgTCCCAA	Operon Technologies
AX-01	gTgTgCCgTT	Operon Technologies
AX-17	TgggCTCTgg	Operon Technologies

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล : นายธัญยธรณ์ พันมานิมิตร

วันเดือนปีเกิด : 19 มกราคม พ.ศ. 2529

ที่อยู่ในสำเนาทะเบียนบ้าน : 5/28 ถ.นางแว่นแก้ว ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี

โทรศัพท์ : 089-0194455

ที่อยู่ปัจจุบัน : 5/28 ถ.นางแว่นแก้ว ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี

โทรศัพท์ : 035-545706

การศึกษา : พ.ศ. 2535-2540 ระดับประถมศึกษาโรงเรียนเทศบาล 1 วัดประตูสาร
จังหวัดสุพรรณบุรี

พ.ศ. 2541-2543 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนกรรณสูตศึกษาลัย
จังหวัดสุพรรณบุรี

พ.ศ. 2544-2546 ระดับ มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนกรรณสูตศึกษาลัย
จังหวัดสุพรรณบุรี

พ.ศ. 2547-2550 ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่)
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้