สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งโดยใช้เทคนิค RAPD

Identification of Genetic Diversity in Bambara Groundnut using RAPD Technique

โดย

นางสาวธัญยธรณ์ ศรีเกษวุฒิวงศ์

นางสาวณัฐกานต์ ปรารถนา

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. อรอุมา รุ่งน้อย

ม
ธ468ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....102657
วัน,เดือน,ปี.....18 ส.ค. 2552

T102657

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชไร่)

พุทธศักราช 2550

b.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งโดยใช้เทคนิค RAPD

Identification of Genetic Diversity in Bambara Groundnut using RAPD Technique

โดย

นางสาวธัญยธรณ์ ศรีเกษวุฒิวงศ์
นางสาวณัฐกานต์ ปรารถนา

ได้พิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ดร. อรอุมา รุ่งน้อย)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรอง

.....

(รศ.ดร.สมยศ เดชภิรัตนมงคล)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ 25 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งโดยใช้เทคนิค RAPD
โดย : นางสาวธัญยธรณ์ ศรีเกษวุฒิวงศ์
: นางสาวณัฐกานต์ ปรารถนา
ภาควิชา : เทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. อรอุมา รุ่งน้อย

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง (Bambara groundnut) 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Tvsu349, Tvsu351, Tvsu368 และ Tvsu370 ด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 95 primer พบว่ามี 19 ไพรเมอร์ที่แสดงออกถึงความแปรผัน (polymorphism) ของแถบ DNA ในถั่วหรั่งทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ A-04, A-13, A-15, C-02, C-04, C05, C-07, C-08, C-14, D-20, F-13, H-14, H-15, K-16, AA-16, AB-14, AL-08, AT-07 และ AU-14 ให้แถบ DNA อยู่ระหว่าง 2 - 8 แถบ เฉลี่ยประมาณ 5 แถบต่อไพรเมอร์ โดยให้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 298 แถบ ขนาด DNA อยู่ระหว่าง 0.25-2.3 กิโลเบส จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจนมากกว่า 4 แถบ ได้แก่ D-20 และ AL-08 มาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบ DNA เพื่อใช้ในการคำนวนค่า Jaccard's similarity coefficient และจัดกลุ่มตัวอย่างทั้ง 50 สายพันธุ์โดยใช้ Unweighted Pair-Group Method with the Arithmetric averages (UPGMA) ซึ่งสามารถแบ่งถั่วหรั่งออกเป็น 4 กลุ่ม จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพและความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของพันธุ์ถั่วหรั่ง อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้กับงานด้านปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: ถั่วหรั่ง, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title : Identification of Genetic Diversity in Bambara Groundnut using RAPD Technique

Author : Miss Thanyathon Sriketwutthiwong

: Miss Nattakan Prattana

Department : Plant Production Technology

Faculty : Agricultural Technology

Advisor : Dr. On-uma Rungnoi

ABSTRACT

Preliminary study of genetic characterization of four Bambara groundnut accessions, Tvsu349, Tvsu351, Tvsu368 and Tvsu370 using 95 random decamer primers. Nineteen primers allowed amplifications of DNA polymorphic bands; A-04, A-13, A-15, C-02, C-04, C-05, C-07, C-08, C-14, D-20, F-13, H-14, H-15, K-16, AA-16, AB-14, AL-08, AT-07 and AU-14. The polymorphisms obtained ranged from 2-8 bands, with an average of 5 bands. The primer D-20 and AL-08 that generated more than 4 prominent bands were selected and used to assess genetic diversity in 50 Bambara groundnut accessions. Genetic similarity between present or absent band was calculated according to Jaccard's similarity coefficient followed by cluster analysis by the UPGMA (unweighted pair-group method with the arithmetic averages) grouped 50 accessins into 4 clusters. The present provided the ability of RAPD technique to determine the amount of genetic diversity in bambara groundnut germplasm and can be used for plant breeding program.

Key word: Bambara groundnut, genetic diversity, RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

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

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ทุกๆ คนในครอบครัว และเพื่อนๆที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมาจนสำเร็จด้วยดี

นางสาวธัญยธรณ์ ศรีเกษวุฒิวงศ์

นางสาวณัฐกานต์ ปรารถนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
สารบัญภาคผนวก	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการทดลอง	15
วิจารณ์	26
สรุป	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้เขียน	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	15
2	ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	16
3	ความเข้มข้นของ dNTPs ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	16
4	ความเข้มข้นของ DNA ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA	17
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ และจำนวนแถบ DNA ที่ให้ polymorphism	18
6	แถบ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ 14 ชนิด กับ DNA ถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	genomic DNA ของถั่วหรั่ง (M= DNA มาตรฐานเข้มข้น 20 นาโนกรัม, 1= TVsu349, 2= TVsu351, 3= TVsu368 และ 4= TVsu370 ตามลำดับ)	15
2	ลายพิมพ์ DNA ของถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือแถบ DNA มาตรฐาน, 1 และ 5= TVsu349, 2 และ 6 = TVsu351, 3 และ 7= TVsu368 และ 4 และ 8 = TVsu370)	17
3	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ C-04 (1, 2, 3, 4) และ C-08 (5, 6, 7, 8) กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 5= TVsu349, 2 6= TVsu351, 3, 7= TVsu368, 4, 8= TVsu370)	19
4	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ C-14 กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu349, 2= TVsu351, 3= TVsu368, 4= TVsu370)	19
5	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 (1, 2, 3, 4) และ AU-14 (5, 6, 7, 8) กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 5= TVsu349, 2, 6= TVsu351, 3, 7= TVsu368, 4, 8= TVsu370)	20
6	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-08 (1, 2, 3, 4) และ AL-05 (5, 6, 7, 8) กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 5= TVsu349, 2, 6= TVsu351, 3, 7= TVsu368, 4, 8= TVsu370)	20
7	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์ (M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu459, 2= TVsu461, 3= TVsu464, 4= TVsu466, 5= TVsu488, 6= TVsu492, 7= TVsu510, 8= TVsu519, 9= TVsu553, 10= TVsu564, 11 = TVsu607, 12= TVsu608, 13= TVsu610, 14= TVsu619, 15=TVsu770, 16= TVsu665, 17= TVsu697)	22
8	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์ (M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu707,2= TVsu712, 3= TVsu724, 4= TVsu734, 5= TVsu744, 6= TVsu769, 7= TVsu835, 8= TVsu861, 9= TVsu862, 10= TVsu868, 11= TVsu869, 12= TVsu872, 13= TVsu873, 14= TVsu877, 15= TVsu878, 16= TVsu883)	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
9	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์ (M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu896, 2= TVsu898, 3= TVsu899, 4= TVsu900, 5= TVsu902, 6= TVsu904, 7= TVsu917, 8= TVsu918, 9= TVsu920, 10= TVsu921, 11= TVsu926, 12= TVsu927, 13= TVsu942, 14= TVsu974, 15= TVsu978, 16= TVsu989)	23
10	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-08 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์ (M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu459, 2= TVsu461, 3= TVsu464, 4= TVsu466, 5= TVsu488, 6= TVsu492, 7= TVsu510, 8= TVsu553, 9= TVsu519)	23
11	ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-08 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์ (M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu868, 2= TVsu869, 3= TVsu872, 4= TVsu873, 5= TVsu877, 6= TVsu878, 7= TVsu883, 8= TVsu887, 9= TVsu896, 10= TVsu898, 11= TVsu899, 12= TVsu900, 13= TVsu902, 14= TVsu904, 15= TVsu917, 16 = TVsu918, 17= TVsu920)	24
12	phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของถั่วหรั่ง 50 พันธุ์	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
การเตรียมสารเคมีในการสกัด DNA	33
การเตรียม Agarose gel	34

ตารางผนวกที่ **หน้า**

1	ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 95 ชนิด	35
2	ผลการสังเคราะห์ DNA ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ D-20 และ AL-08	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ถั่วหรั่ง (Bambara Groundnut) เป็นพืชไร่เฉพาะท้องถิ่นและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในภาคใต้ของประเทศไทย โดยเกษตรกรนิยมปลูกถั่วหรั่งเป็นพืชแซมในสวนยางพารา (จิระ, 2533) และพื้นที่ว่างเปล่าซึ่งเป็นที่ดอน ดินมีความร่วนซุยสูง จุดเด่นของถั่วหรั่งคือการที่สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ดีแม้ในดินทรายจัดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง และความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ซึ่งพื้นที่ลักษณะดังกล่าวมีการนำมาใช้ประโยชน์น้อย มักถูกทิ้งให้เป็นพื้นที่รกร้างอยู่เป็นจำนวนมากเนื่องจากไม่ประสบความสำเร็จในการใช้ปลูกพืชชนิดอื่น ๆ (Chomchalow, 1993) ถั่วหรั่งจัดเป็นพืชที่ปลูกง่ายและให้ผลตอบแทนสูง เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีสารอาหารอยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสมต่อความต้องการของมนุษย์ เมล็ดถั่วหรั่งมีโปรตีน 14 –24 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 50-60 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 6-12 เปอร์เซ็นต์ มีกรดอะมิโนพวกไรซีน (lysine) สูงแต่ขาดกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ซัสทีน (cystine) และเมทไฮโอนีน (methionine) แต่เมื่อเทียบกันแล้ว ถั่วหรั่งมีเมทไฮโอนีนสูงกว่าเมล็ดพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ (จิระ, 2533)

ในด้านความปลอดภัยในการบริโภคถั่วหรั่งยังเป็นที่มีความปลอดภัยในการบริโภคสูง เพราะในการผลิตมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชน้อยมากถึงไม่มีการใช้เลย และจากการนำตัวอย่างผลผลิตถั่วหรั่งไปตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราก็ไม่พบสาร aflatoxin แม้จะมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Asporgillus flavus* ก็ตาม (ชุติมันต์และคณะ, 2537)

จากความสำคัญดังกล่าวจึงทำให้ถั่วหรั่งเป็นที่น่าสนใจในทางวิชาการ (ศิริกุลและนันทวรรณ, 2545) อย่างไรก็ตามถั่วหรั่งยังมีการผลิตเฉพาะในภาคใต้เท่านั้น และมีพื้นที่ปลูกถั่วหรั่งเพื่อการค้าเพียง 4,000 ไร่ ทำให้ยังไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลายและยังไม่เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ทั้งที่ในสภาพที่เหมาะสมถั่วหรั่งสามารถให้ผลผลิตฝักสดได้สูงถึง 1,200 กิโลกรัมต่อไร่ และทำรายได้ให้กับเกษตรกรได้สูงมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ คุณภาพเมล็ดพันธุ์ที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ ทำให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้แตกต่างกัน และด้วยสาเหตุที่ถั่วหรั่งมีการปลูกกันอย่างกว้างขวางในหลายสภาพแวดล้อม โดยไม่มีพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งที่ปลูกเพื่อการค้าในพื้นที่กว้าง ทำให้พันธุ์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันล้วนแล้วแต่ได้มาจากการคัดเลือกจากพันธุกรรมที่มีความแปรปรวนอยู่ตามธรรมชาติเท่านั้น จึงทำให้ต้องนำเข้าถั่วหรั่งพันธุ์ต่าง ๆ จากแหล่งรวบรวมที่ใหญ่ที่สุดคือ สถาบันวิจัยการเกษตรเขตร้อนนานาชาติ (International Institute for Tropical Agriculture; IITA) เข้ามาทำการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อที่จะใช้ในการปรับปรุงคัดสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มากขึ้น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการใช้ลักษณะทางสันฐานวิทยาในการเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะใบ สีดอก เมล็ด รูปร่างและลักษณะของ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฝัก อาจเกิดความผิดพลาดได้ในกรณีของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ลักษณะทางสันฐานวิทยาบางอย่างอาจได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม ทำให้ยากลำบากในการจำแนกความผันแปรทางพันธุกรรม การนำเทคนิคด้านอณูพันธุศาสตร์มาช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจะช่วยขจัดอิทธิพลของสภาพแวดล้อมออกไปได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เครื่องหมาย RAPD มาใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของถั่วหรั่ง ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อจำแนกความหล' กหลายและจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ประวัติและถิ่นกำเนิด

ถั่วหรั่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาบริเวณหมู่เกาะมาดาคาสการ์และได้แพร่กระจายพันธุ์ไปยังทวีปอเมริกาใต้ และทวีปเอเชีย (กรมวิชาการเกษตร, 2551) ในปัจจุบันมีการปลูกถั่วหรั่งกันอย่างกว้างขวางทั่วเขตร้อนชื้นของทวีปอาฟริกา และมีการปลูกใน Madagasca Mauritius อินเดีย ศรีลังกา อินดีนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย รัฐไอโอวาของสหรัฐอเมริกา New Caledonia ตอนเหนือของออสเตรเลีย บริเวณเขตร้อนชื้นของอมริกากลาง ประเทศสุรีนัม และบราซิล (Duke *et al*, 1997) สำหรับประเทศไทยนั้นพบว่า มีการปลูกถั่วหรั่งในภาคใต้มาไม่น้อยกว่า 200 ปีแล้ว (กรมวิชาการเกษตร, 2541) สันนิษฐานว่าถั่วหรั่งเข้าสู่ประเทศไทยทางตอนใต้โดยผ่านมาทางประเทศมาเลเซีย และได้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในท้องถิ่นภาคใต้ที่มีราคาสูง ถั่วหรั่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น ในจังหวัดปัตตานี ยะลา และนราธิวาส เรียก กาแปโจ จังหวัดสงขลา เรียก ถั่วไทร หรือ ถั่วโบ จังหวัดภูเก็ต พังงา และกระบี่ เรียก ถั่วปันหยี ส่วนจังหวัดพัทลุง สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช เรียกกันว่า ถั่วเมล็ดเดียวหรือถั่วหรั่ง (สุกัญญา, 2543) การที่ใช้ชื่อถั่วหรั่งเป็นหลักเนื่องจากในแหล่งปลูกส่วนใหญ่นิยมเรียก "ถั่วหรั่ง" และชื่อนี้ก็ใช้เป็นชื่อหลักในสารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้ (เทอด, 2529)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna subterranea* (L.) Verdc. ชื่อสามัญคือ bambara groundnut (Linnemann and Azam-Ali,1993) เป็นพืช diploid คือ มีโครโมโซม 2 ชุดโดยมีจำนวน 2n = 22 (Frahm-Leliveld,1953)

ถั่วหรั่งเป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นทอดเลื้อยอยู่บนผิวดิน มีระบบรากแบบรากแก้ว และมีรากตามข้อในบางพันธุ์ รากมีปมที่เกิดจากการอยู่ร่วมกันกับเชื้อไรโซเบียม ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับถั่วหรั่ง (Linnemann, 1987) เมื่อเมล็ดเริ่มงอก รากแก้วจะหยั่งลึกลงไปในดินพร้อมกับรากแขนงแตกออกทางด้านข้าง

ลำต้น ประกอบด้วย ลำต้น 2 ชนิด คือ แบบตั้งตรง เป็นลำต้นที่เจริญในระยะแรก หลังจากนั้นมีการแตกแขนงของลำต้นทอดขนานไปกับพื้นดินเป็นลำต้นเลื้อยขนาน บริเวณของลำต้นเลื้อยขนานเกิดใบเรียงตัวสลับคล้ายขนนก นอกจากนี้บนลำต้นบริเวณใกล้มุมก้านใบจะเกิดดอกและฝัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ เป็นใบประกอบขนาดของใบเฉลี่ยมีความกว้าง 3.9 เซนติเมตร ความยาว 4.9 เซนติเมตร ก้านใบรวบยาวมากและตั้งตรง ขนาดความยาวเฉลี่ย 12 เซนติเมตร ที่ฐานของก้านใบมีหูใบ 2 อัน ส่วนก้านใบย่อยสั้นมากขนาดเฉลี่ย 0.2 เซนติเมตร

ดอก มีขนาดเล็กสีเหลือง ความกว้างของดอกเฉลี่ย 0.4 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 0.6 เซนติเมตร ดอกเกิดตามมุมก้านใบและตามข้อของลำต้นเลื้อยขนาน อาจเกิดดอกเดี่ยวหรือเกิดเป็นกลุ่ม ๆ ละ 2 – 3 ดอก มีก้านดอกสั้นมาก ขนาดความยาวเฉลี่ย 0.3 เซนติเมตร แต่ละดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบที่มีฐานเชื่อมติดกัน และส่วนปลายแยกเป็น 2 แฉก กลีบดอกมีสีเหลือง 5 กลีบ ขนาดไม่เท่ากัน ทำหน้าที่หุ้มเกสรตัวผู้และตัวเมีย เกสรตัวผู้ 10 อัน เกสรตัวเมียมีรังไข่ยาวรี (กรมวิชาการเกษตร, 2551)

ฝักและเมล็ด ฝักมีลักษณะกลมผิวเรียบหรือมีลักษณะย่นในบางพันธุ์เมื่อแก่จัด (Linnemann,1987) ฝักของถั่วหรั่งเกิดเมล็ดเดียวและเกิดเป็นกลุ่มตามลำต้น ฝักแก่เปลือกจะแข็งมีสีน้ำตาล หรือขาว ขนาดความยาวฝักเฉลี่ย 1.2 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 1 เซนติเมตร เปลือกชั้นนอกและชั้นกลางเชื่อมติดกัน ส่วนเปลือกชั้นในแยกออกต่างหาก มีลักษณะเหนียวและแข็ง ภายในมีเมล็ดมีลักษณะผิวเรียบ (กรมวิชาการเกษตร, 2551) สีของเยื่อหุ้มเมล็ดแตกต่างกันหลายสี เช่น ขาว ครีม แดง ม่วง ดำ น้ำตาล และมีลักษณะลายที่มีสีและรูปแบบที่แตกต่างกันมากมาย (Linnemann,1987) ขนาดของเมล็ดมีความยาวเฉลี่ย 1 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 0.8 เซนติเมตร มีเปลือกหุ้มเมล็ดที่ค่อนข้างหนา (กรมวิชาการเกษตร, 2551)

การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตในโลกมีอยู่มากมายหลายล้านชนิด และไม่มีสิ่งมีชีวิตใดที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังนั้นเพื่อความสะดวกที่จะศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ จึงต้องมีการแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่โดยมีหลักเกณฑ์ในการพิจารณาหลายประการ

1. พิจารณาลักษณะสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ว่าเหมือนหรือคล้ายกันเพียงใด ซึ่งการนำลักษณะโครงสร้างที่เห็นเด่นชัดมาเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตแม้ว่าจะสะดวกและรวดเร็ว แต่บางครั้งก็เกิดความผิดพลาดได้ในกรณีที่สิ่งมีชีวิตมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ต้องใช้ความชำนาญเท่านั้นจึงจะสามารถแยกความแตกต่างได้

2. พิจารณาจากแบบแผนการเจริญของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่แรก โดยอาศัยหลักที่ว่าสิ่งมีชีวิตมีความสัมพันธ์กันมากเพียงใดก็ย่อมจะมีวิธีการคล้ายกันมากเท่านั้น

3. พิจารณาถึงพฤติกรรมความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตกับสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากหลักเกณฑ์ที่กล่าวมาแล้วเหมาะสมสำหรับการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตกลุ่มใหญ่ หรือกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ห่างไกลกัน แต่ถ้าต้องการแบ่งกลุ่มเป็นกลุ่มย่อย ๆ หรือกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน จำเป็นต้องใช้ความรู้ในศาสตร์แขนงอื่น ๆ เช่น เคมี ชีวเคมี สถิติ พันธุศาสตร์ สรีรวิทยา เป็นต้น ช่วยในการศึกษาวิจัยเพื่อให้การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มีความถูกต้องมากที่สุด (วิสุทธิ์ และคณะ, 2530)

การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมาย (marker) คือตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่าง ๆ ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ได้นำเอาเครื่องหมายที่เป็นเครื่องบ่งชี้ลักษณะทางด้านการเกษตรต่าง ๆ มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิบัติให้สูงขึ้น ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

1. Morphological markers เป็นตัวบ่งชี้ทางสรีรวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยา ตือ ลักษณะที่ปรากฏโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตุได้ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือใด ๆ เป็นตัวบ่งชี้ เป็นลักษณะที่แสดงออกภายนอก เช่น ลักษณะความสูงของต้นพืช, ลักษณะสีของดอก, ลักษณะความแตกต่างของใบ เป็นต้น

2. Biochemical markers คือ การใช้โมเลกุลทางชีวเคมีเป็นตัวระบุถึงความแตกต่างในพืชที่ทำการศึกษา เช่น การใช้ isozyme หรือ โปรตีน ในการศึกษาพืชต่างชนิดหรือต่างพันธุ์

3. Molecular markers คือ การใช้ดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของยีนหรือดีเอ็นเอในพืชที่เราทำการศึกษา ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำและมีความจำเพาะมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น (นิรนาม, 2551)

เครื่องหมายโมเลกุล หรือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือลำดับเบสจากบริเวณเล็ก ๆ ช่วงหนึ่งของสายดีเอ็นเอที่สามารถแสดงถึงความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน มีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกและสามารถติดตามตรวจสอบได้ (อภิชาติ, ม.ป.ป.; Liu, 1998) แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ชนิดที่ตรวจสอบโดยใช้หลักการไฮบริไดเซชัน ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP) ซึ่งนำเสนอโดย Botstien *et al.* (1980) เริ่มต้นด้วยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปไว้บน membrane ด้วยวิธี Southern blot แล้วใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ (probe) เข้าตรวจสอบโดยวิธีไฮบริไดเซชัน เพื่อบอกความแตกต่างของแต่ละจีโนม แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล RFLP มีการแสดงออกโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับรูปแบบการข่มกันของยีน ไม่ขึ้นกับระยะเวลาการแสดงออกของยีน และเป็น co-dominant marker ก็ตาม แต่การวิเคราะห์แบบ RFLP ต้องใช้ดีเอ็นเอคุณภาพดีในปริมาณมาก ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง และมีวิธีตรวจความแตกต่างที่ซับซ้อน (วิสุทธิ์, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ชนิดที่ตรวจสอบโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยา กระบวนการเริ่มต้นด้วยเส้นดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำให้เสียสภาพและแยกตัวออกจากกันด้วยการใช้อุณหภูมิสูง ต่อมาลดอุณหภูมิลงให้เกิดการจับตัวใหม่บริเวณเส้นดีเอ็นเอแม่แบบที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันของไพรเมอร์ เพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งให้เกิดการนำเบสเข้ามาต่อเชื่อมจนได้เป็นสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่เป็นสายคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นคือลำดับเบสบริเวณเป้าหมายได้ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นและทำในลักษณะนี้วนเวียนหลาย ๆ รอบจนการเพิ่มปริมาณมากพอ ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์มีข้อดี คือ ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น ใช้แรงงานน้อย ค่าใช้จ่ายต่ำและแปลผลง่าย (อภิชาติ, ม.ป.ป.)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีการพีซีอาร์มีมากมาย วิธีที่นิยมใช้กันมากได้แก่

1. เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) เป็นเทคนิคที่รวบรวมหลักการของ อาร์เอฟแอลพี และอาร์เอพีดี เข้าไว้ด้วยกัน หลักการคือตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด และต่อเข้ากับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสอง แล้วเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adapter นั้น ๆ คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้สูง อีกทั้งเป็นได้ทั้ง co-dominant และ dominant marker แต่มีข้อด้อยคือ ยุ่งยาก และซับซ้อน

2. เอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat, SSR) อาศัยหลักการกระจายตัวของเบสซ้ำในสิ่งมีชีวิตโดยสร้างไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนต้นและปลายของเบสซ้ำนั้น แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งจะพบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากการมีชุดซ้ำไม่เท่ากัน เทคนิคนี้จะมีการได้ co-dominant marker และมีความจำเพาะเจาะจงบนจีโนม

3. เอสเอสซีพี (Single-strand Conformational Polymorphism) เป็นวิธีการตรวจหาความแตกต่างของลำดับเบสในขั้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ อาศัยหลักการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stand DNA) บนแผ่นเจลที่ขดหรือพันกันเกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งโครงสร้างที่จำเพาะนี้จะส่งผลต่อการเคลื่อนที่บนแผ่นเจล คุณสมบัติของเทคนิคนี้คือมีดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ co-dominant marker และสามารถตรวจพบการกลายแม้เพียงตำแหน่งเดียวได้

4. ซีเอฟแอลพี (Cleavase Fragment Length Polymorphism, CFLP) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิคเอสเอสพีซี โดยดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะงอพับและจับกันเป็นวง เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า hairpin หรือ stem loop เนื่องจากเกิดการจับคู่กันของเบสที่เป็นคู่สมกันที่อยู่บนดีเอ็นเอสายเดียวกัน หลังจากนั้นใช้เอ็นไซม์ cleavase I ซึ่งสามารถจดจำตำแหน่งและตัดสายดีเอ็นเอตรงจุดที่เชื่อมระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับดีเอ็นเอสายคู่มาทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีโครงสร้าง hairpin ดังนั้นจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันเพิ่มขึ้นมา เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบหาความแตกต่างของชิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอ 2 ตัวอย่างที่มีลำดับเบสแตกต่างกันแบบที่มีการเพิ่มขึ้น หรือขาดหายไปของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ หรือมีลำดับเบสที่แตกต่างกันที่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง hairpin (ปรีชา, 2543)

5. อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ในพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นโดยเทคนิค PCR ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของ DNA เป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจง (สุรินทร์, 2540) หลักการคือใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ 8-10 นิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) เพียงชนิดเดียวมาเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR ไพรเมอร์สายสั้นจะเกาะกับ DNA บนโครโมโซมหลายตำแหน่งและเพิ่มจำนวน DNA อย่างสุ่มจาก DNA แม่แบบที่ซับซ้อน ชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการทำ PCR เกิดขึ้นเนื่องจากไพรเมอร์เกาะกับ DNA แม่แบบในทิศทางตรงกันข้ามและห่างกันในระยะหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้โดยอาศัยเทคนิค PCR เทคนิค RAPD นี้มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ผลที่ได้มีความเชื่อถือได้ และสามารถใช้ระบุความผันแปรทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (Henry, 1997) นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ประหยัดรวดเร็วและให้ข้อมูลได้มาก แต่มีข้อเสียคือ การทดลองบางครั้งได้ผลต่างจากเดิม ปัญหานี้เกิดจากตัวแปรชั้นพื้นฐานต่าง ๆ เช่น คุณภาพของ DNA ที่ใช้เป็นต้นแบบ โดย DNA ที่บริสุทธิ์จะให้ผลที่ดีกว่า จึงต้องควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ (Weeden *et al*,1992)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชโดยเทคนิค RAPD

สมิตและคณะ (2551) ได้จัดจำแนกพันธุ์ไผ่โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ไผ่ได้ดี อีกทั้งยังบอกถึงความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการศึกษาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ไผ่ หรือความแปรผันทางพันธุกรรมของพันธุ์ไผ่ชนิดอื่น ๆ ด้วย

ภาณีและคณะ (2551) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมว่านชักมดลูก (พืชวงศ์ขิง) ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 15 ชนิดพบว่าว่านชักมดลูกจากแหล่งต่าง ๆ มีความเป็นเอกลักษณ์และแยกออกจากกันได้เป็น 3 กลุ่ม โดยในกลุ่มที่ 1 เป็นสายต้นจากจังหวัดกาญจนบุรีเพียงสายต้นเดียว และสายต้นที่ CM8 ที่ไม่ทราบแหล่งที่มามีความใกล้ชิดกับว่านชักมดลูกในกลุ่มที่ 2 ที่มีสายต้นจากจังหวัดสกลนคร และสายต้น CM9 มีความใกล้ชิดกับว่านชักมดลูกในกลุ่มที่ 3 ที่มีสายต้นจากจังหวัดเชียงใหม่ พิษณุโลก มุกดาหาร และหนองคาย ซึ่งสายต้นในกลุ่มเดียวกันไม่มีความสัมพันธ์กันตามภูมิภาค

วิไลพร (2547) ทำการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลือง โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเทคนิค RAPD และ AFLP ซึ่งใช้ถั่วเหลืองจากทางราชการ 10 สายพันธุ์และ 18 สายพันธุ์จาก AVRDC ผลที่ออกมาสามารถจัดจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม

สุพัตรา (2549) ทำการจัดจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ซึ่งมีพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ระยองที่มีการผสมปรับปรุงพันธุ์ แล้วมาตรวจหาความแตกต่างในระดับโมเลกุล

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 94 ตัวอย่าง จากการจัดจำแนกโดยวิธี RAPD พบว่าสามารถจำแนกมันสะปะหลังได้เป็น 18 กลุ่มอย่างชัดเจน ซึ่งจะมีความละเอียดมากกว่าการจัดจำแนกโดยใช้ทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นควรที่จะมีการใช้ทั้งสองวิธีควบคู่กันไปเพื่อเพิ่มรายละเอียดในการจัดจำแนกมากยิ่งขึ้น (Carvalho *et al.*, 2000; สุพัตรา, 2549)

การศึกษาด้านอณูชีววิทยาในถั่วหรั่ง

Pasquet *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายของถั่วหรั่งพันธุ์ปลูก 79 accessions และพันธุ์ป่า 21 accessions พบว่าในระหว่างพันธุ์ปลูกมีความแตกต่างกันน้อยกว่าระหว่างพันธุ์ป่า และพบว่าระหว่างพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่ามีส่วนของความเหมือนกันอยู่ในระดับสูงทำให้มั่นใจได้ว่าถั่วหรั่งพันธุ์ป่าเป็นบรรพบุรุษของถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกจริง

Massawe *et al.* (2000) ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งพันธุ์ท้องถิ่น 16 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพีสามารถแสดงให้เห็นความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง 2 กลุ่ม คือกลุ่มจาก West Africa และกลุ่มจาก Tanzania

Amadou *et al.* (2001) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในถั่วหรั่ง 25 สายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยมีความสอดคล้องกับสภาพทางภูมิศาสตร์ของแหล่งปลูก

INCO-DC (2001, 2002 อ้างโดย จิระ, 2549) รายงานการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมถั่วหรั่งที่รวบรวมอยู่ที่ IITA เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยขั้นแรกได้จัดกลุ่ม 103 accession ตามลักษณะ phenotype และจัดกลุ่ม 40 accession โดยใช้เครื่องหมาย AFLP และ microsatellite พบว่าเครื่องหมาย microsatellite ของถั่วพุ่มสามารถใช้ได้กับถั่วหรั่ง และมีการเผยแพร่เทคนิคมาตรฐานในการสกัดดีเอ็นเอ และการใช้เทคนิค RAPD ให้แก่ประเทศต่าง ๆ ที่ร่วมโครงการด้วย

Singrün and Schenkel (2003) พบว่าโดยเฉลี่ย ในทุก ๆ 263 พันธุ์ท้องถิ่นที่ทำการวิเคราะห์จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีจะมี 3-8 ยีโนไทป์ ที่มีความแตกต่างไปอย่างเด่นชัดมาก

Massawe *et al.* (2005) สรุปผลจากการศึกษาความสัมพันธุ์ระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ท้องถิ่นจากแหล่งต่าง ๆ ของอาฟริกาว่า ความหลากหลายที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับสถานที่ปลูกหรือแหล่งเก็บตัวอย่างมากกว่าความคล้ายคลึงกันเนื่องจากลักษณะแสดงออกที่พบเห็นได้ และสามารถใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างมากกว่าความคล้ายคลึงกันเนื่องจากลักษณะแสดงออกที่พบเห็นได้ และสามารถใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นพันธุ์ท้องถิ่นในบริเวณต่าง ๆ และความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ใบอ่อนของถั่วหรั่งจำนวน 54 พันธุ์ ซึ่งได้จาก สถาบันวิจัยการเกษตรเขตร้อนนานาชาติ เมือง Ibadon ประเทศไนจีเรีย

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) 10 mM dNTP

2) 25mM Magnesium Chioride

3) Taq DNA polymerase (Fermentas) เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร

4) 10 µM Primer

5) Ultrapure water

2.3 สารเคมีสำหรับ electrophoresis

1) Agarose gel

2) 0.5x TBE (Tris Borate EDTA) buffer

3) Etheydium 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)

3.7 โกร่งบดตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3.9 หลอดใส่สารขนาดเล็ก 1.5 และ 0.2 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

ปลูกถั่วหรั่งจำนวน 54 พันธุ์ ในถาดหลุมที่ใส่ดิน โดยปลูก 1 - 2 เมล็ด/หลุม แล้วกดเมล็ดให้ลงไปในดิน รดน้ำทุกวัน เมื่อถึงอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ทำการตัดใบอ่อนเก็บไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอสกัด DNA ต่อไป

2. วิธีสกัด DNA

2.1 บดตัวอย่างใบถั่วหรั่งลงในโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วถ่ายใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 เติม PEB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ที่บ่มในอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วเขย่าแรง ๆ ด้วยเครื่อง Vortex

2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.4 เติม 5M KAc ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มบนน้ำแข็งนาน 30 - 60 นาที

2.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.6 ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.7 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.8 เทสารลงในหลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.9 เติม ethanol ที่เย็นปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายในหลอดเพื่อตกตะกอน DNA ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอน DNA

2.11 เทสารละลายทิ้ง

2.12 ล้างตะกอน DNA ด้วย ethanol เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นด้วยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง

2.13 ตาก DNA ให้แห้ง

2.14 ทำการละลาย DNA ด้วย TE 50 ไมโครลิตร

2.15 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. การตรวจสอบคุณภาพและวัดค่าความเข้มข้นของ DNA

3.1 วิธีอิเลคโทรโฟรีซิส

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5 TBE buffer หลอมในเครื่องไมโครเวฟจนเดือด นำมาวางบน hotplate stirrer และคนจนกระทั่งเจลมีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 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 มาตรฐาน จากนั้นต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 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 โดยใช้ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 1 และ 1.25 ไมโครลิตร

4.1.2 ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase โดยใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0.1, 0.15 และ 0.2 ไมโครลิตร

4.1.3 ความเข้มข้นของ dNTPs โดยใช้ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 0.1 และ 0.2 ไมโครลิตร

4.1.4 ความเข้มข้นของ DNA แม่แบบ โดยใช้ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 10 และ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วหรั่งโดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 95 ชนิด มาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR กับถั่วหรั่ง เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผล PCR ที่ชัดเจน โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

Water dd H_2O	5.95	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.1	ไมโครลิตร
10x buffer	1	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	1.25	ไมโครลิตร
10 µM Primer	0.5	ไมโครลิตร
20 ng/ µl DNA	1	ไมโครลิตร
5U/ µl *Taq* DNA polymerase	0.2	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

การทำ PCR จากตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยเตรียมสารละลายของ buffer, $MgCl_2$, DNA template, *Taq* DNA polymerase และ น้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (Master mixture) และแบ่งใส่ทีละหลอด โดยแต่ละหลอดจะมี Primer อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

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 จนนำมาวิเคราะห์ DNA ต่อไป

5. การตรวจสอบขนาดชิ้นของ DNA ด้วยวิธีอิเลคโทรโฟริซิส

ภายหลังจากทำ PCR นำผลผลิตที่ได้ปริมาตร 7 ไมโครลิตร มาตรวจสอบโดยอิเลคโทรโฟไลซิสบน agarose gel ความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ใน 0.5x TBE buffer โดยใช้ DNA มาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดของ DNA ใช้แรงเคลื่อนที่ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 10 นาที และย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บันทึกลักษณะรูปแบบ DNA ที่ปรากฏจากการทำ RAPD markers นำข้อมูลมาคำนวณค่าต่าง ๆ ดังนี้

1. คำนวณค่า Polymorphism rate

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

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (ADB) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาการดำเนินงาน

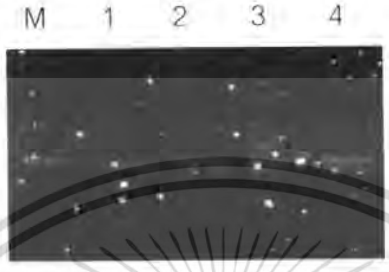
เดือนสิงหาคม 2550 - เมษายน 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

การสกัด DNA จากถั่วหรั่ง

DNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของถั่วหรั่งโดยวิธีการประยุกต์จากวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) เมื่อตรวจสอบโดยอิเลคโทรโฟรีซิส พบว่ามี DNA ที่มีคุณภาพดี



ภาพที่1 genomic DNA ของถั่วหรั่ง (M= DNA มาตรฐานเข้มข้น 20 นาโนกรัม, 1= TVsu349, 2= TVsu351, 3= TVsu368 และ 4= TVsu370 ตามลำดับ)

การหาสภาพที่เหมาะสมในการทำ PCR

1. การปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์

จากการทำปฏิกิริยา PCR การเปรียบเทียบความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 2 ระดับได้แก่ 1 และ 1.25 ไมโครลิตร พบว่าในการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร ไม่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์จาก 1 ไมโครลิตร มาเป็น 1.25 ไมโครลิตร ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏชัดเจนมากขึ้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

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

2. การปรับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase

ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase 3 ระดับ ได้แก่ 0.1, 0.15 และ 0.2 ไมโครลิตร พบว่า ในการใช้ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.1 และ 0.15 ไมโครลิตร เกิดแถบ DNA น้อย ปรากฏแถบ DNA ที่ไม่ชัดเจน และ ไม่สามารถแยกขนาดของแถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase มาเป็น 0.2 ไมโครลิตร จะให้แถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA ที่ขัดเจนมากขึ้น มีแถบ DNA ขนาดต่าง ๆ เพิ่มขึ้นจากเดิม สามารถแยกแถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ และ สามารถแสดงการเกิด polymorphism ในแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase (ไมโครลิตร)	ลักษณะการเกิดแถบของ DNA
0.1	เกิดแถบ,ไม่ชัดเจน
0.15	เกิดแถบ,ไม่ชัดเจน
0.2	เกิดแถบ,ชัดเจน

3. การปรับความเข้มข้นของ dNTPs

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ dNTPs 2 ระดับได้แก่ 0.1 และ 0.2 ไมโครลิตร พบว่า dNTPs ความเข้มข้น 0.2 ไมโครลิตร ไม่ปรากฏแถบ DNA แต่ dNTPs ความเข้มข้น 0.1 ไมโครลิตร สร้างแถบ DNA ที่มีความคมชัดมากขึ้นและสามารถแยกแถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ dNTPs ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

ความเข้มข้นของ dNTPs (ไมโครลิตร)	ลักษณะการเกิดแถบของ DNA
0.1	เกิดแถบ
0.2	ไม่เกิดแถบ

4. การปรับความเข้มข้นของ DNA แม่แบบ

ในการเปรียบเทียบเพื่อหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาโดยเปรียบเทียบความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 10 และ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าการใช้ DNA เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสังเคราะห์แถบ DNA ได้ไม่ชัดเจน และไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DNA เป็น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนขึ้น และแยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ดีขึ้น (ตารางที่ 4)

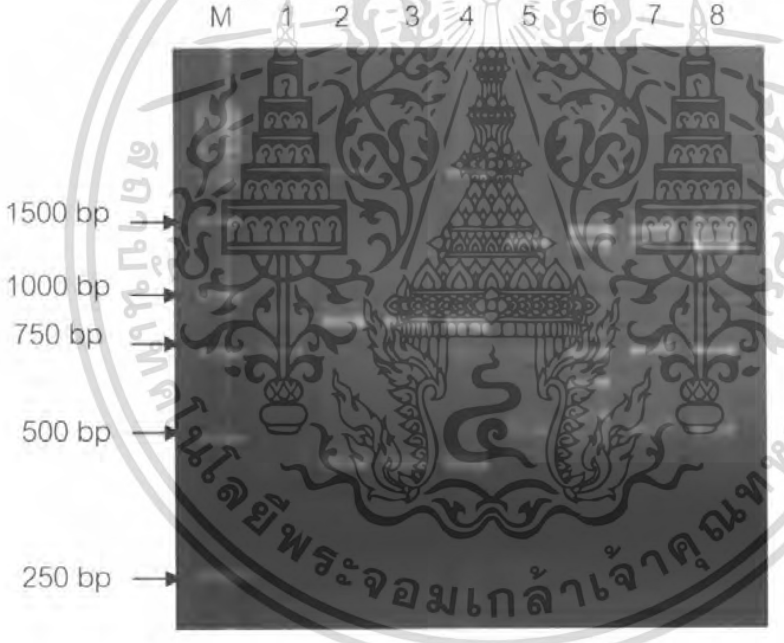
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 4 ค่าปริมาตรความเข้มข้นของ DNA ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA

ความเข้มข้นของ DNA (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	ลักษณะการเกิดแถบของ DNA
10	เกิดแถบไม่ชัดเจน
20	เกิดแถบ

ผลการทดลองเตรียมส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา PCR โดยนำความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์ 1.25 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร, dNTPs 0.1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 0.5 ไมโครลิตร, DNA แม่แบบ 1 ไมโครลิตร, 10x buffer 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 5.95 ไมโครลิตร รวมทั้งหมดเป็น 10 ไมโครลิตร (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือแถบ DNA มาตรฐาน, 1 และ 5= TVsu349, 2 และ 6 = TVsu351, 3 และ 7= TVsu368 และ 4 และ 8 = TVsu370)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์จำนวน 95 ชนิด (ตารางผนวกที่ 1) กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ TVsu349, TVsu351, TVsu368 และ TVsu370 เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ DNA ของถั่วหรั่งได้ พบว่ามี 19 ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ทั้ง 4 สายพันธุ์ คิดเป็น 20เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด (ตารางที่ 5) จำนวนแถบ DNA ที่เข้มข้นชัดเจนและปานกลางจากแต่ละไพรเมอร์พบอยู่ระหว่าง 2-8 แถบ (ภาพที่ 3-6) เฉลี่ยประมาณ 5 แถบต่อไพรเมอร์ ได้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 359

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

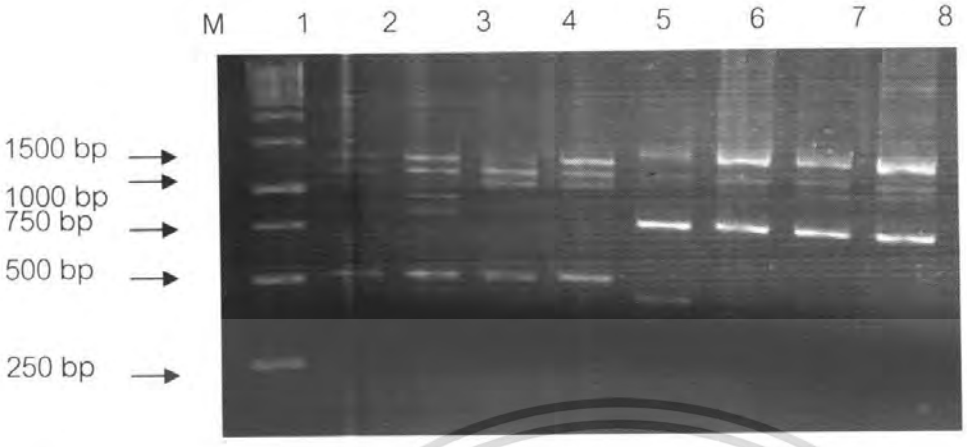
102657

แถบ โดยไพรเมอร์ C-07 ให้จำนวนแถบ DNA มากที่สุดคือ 9 แถบ และไพรเมอร์ A-13, C-14, C-08 และ AU-14 ให้แถบ DNA น้อยที่สุดคือ 3 แถบ (ตารางที่ 5) ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 0.25-2.3 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบ DNA มาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentas, USA.) ซึ่งมีขนาด 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กิโลเบส (ตารางที่ 6)

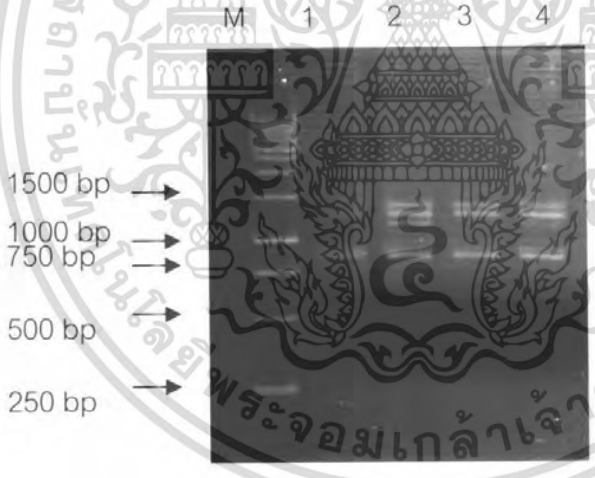
ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ และจำนวนแถบ DNA ที่ให้ polymorphism

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	% polymorphic bands
A-04	AATCgggCTg	4	2	50.0
A-13	CAgCACCCAC	3	1	33.3
A-15	TTCCgAACCC	5	1	20.0
C-02	gTgAggCgTC	4	2	50.0
C-04	CCgCATCTAC	5	2	40.0
C-05	gATgACCgCC	5	2	40.0
C-07	gTCCCgACgA	9	1	11.1
C-08	TggACCggTg	3	1	33.3
C-14	TgCgTgCTTg	3	1	33.3
D-20	ACCCggTCAC	5	2	40.0
F-13	ggCTgCAgAA	4	2	50.0
H-14	ACCAggTTgg	8	2	25.0
H-15	AATggCgCAg	8	2	25.0
K-16	gAgCgTCgAA	8	4	50.0
AA-16	ggAACCCACA	6	1	16.7
AB-14	AAgTgCgACC	5	2	40.0
AT-07	ACTgCgACCA	4	2	50
AU-14	CACCTCgACC	3	1	33.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

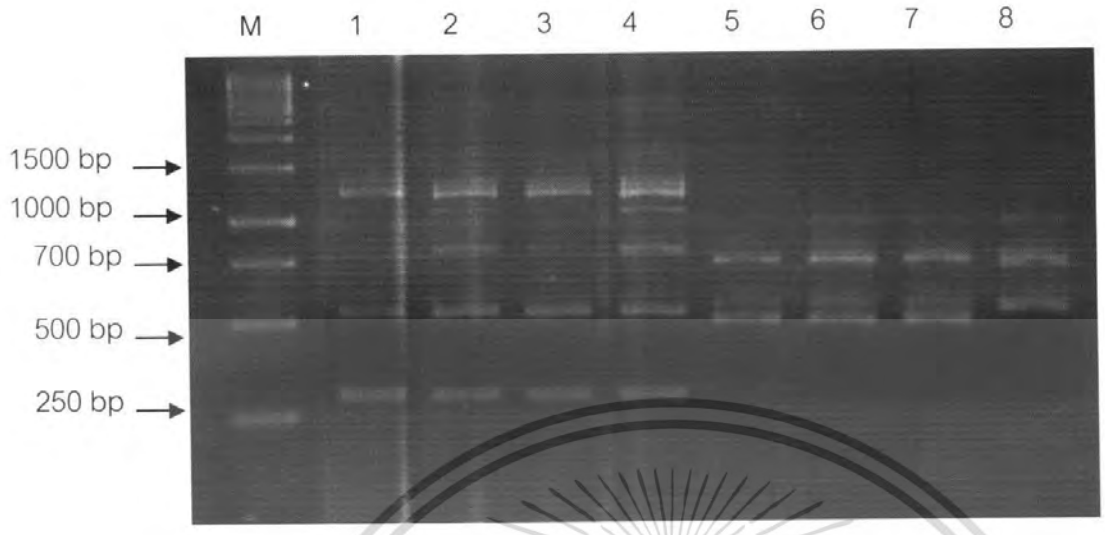


ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ C-04 (1, 2, 3, 4) และ C-08 (5, 6, 7, 8) กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 5= TVsu349, 2, 6= TVsu351, 3, 7= TVsu368, 4, 8= TVsu370)



ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ C-14 กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu349, 2= TVsu351, 3= TVsu368, 4= TVsu370)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 (1, 2, 3, 4) และ AU-14 (5, 6, 7, 8) กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 5= TVsu349, 2, 6= TVsu351, 3, 7= TVsu368, 4, 8= TVsu370)

ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-08 (1, 2, 3, 4) และ AL-05 (5, 6, 7, 8) กับถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์ (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1, 5= TVsu349, 2, 6= TVsu351, 3, 7= TVsu368, 4, 8= TVsu370)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แถบ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ 19 ชนิด กับ DNA ถั่วหรั่ง 4 สายพันธุ์

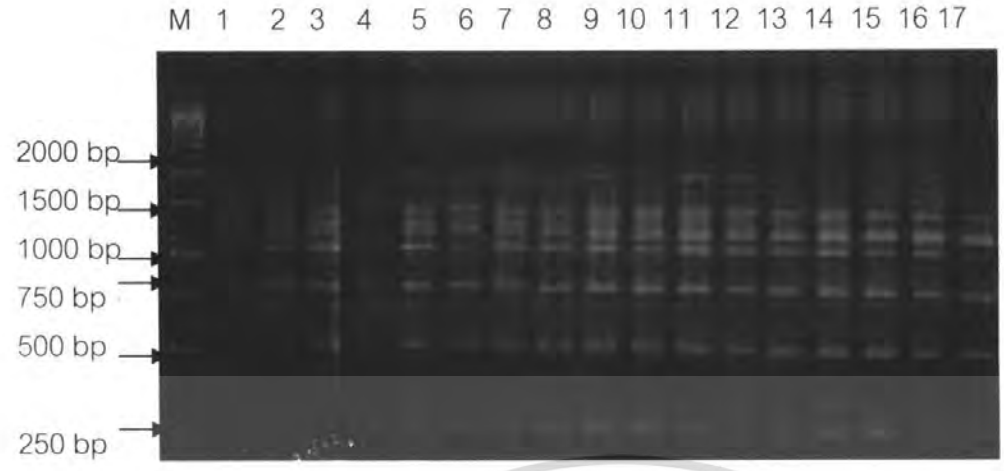
ไพรเมอร์	จำนวนแถบ DNA	ขนาดของแถบ DNA (กิโลเบส)
A-04	4	0.4, 0.7, 0.9, 2.2
A-13	3	0.75, 0.9, 1.3
A-15	5	0.9, 1.3, 1.4, 1.6, 2.0
C-02	4	0.6, 0.8, 1.0, 1.1
C-04	5	0.5, 0.8, 0.9, 1.2, 1.3
C-05	5	0.7, 0.75, 0.9, 1.0,1.5
C-07	9	0.3, 0.35, 0.4, 0.55, 0.6, 0.7, 0.75, 1.0, 1.1
C-08	3	0.8, 1.0, 1.3
C-14	3	0.8, 1.3, 1.4
D-20	6	0.27, 0.55, 0.8, 1.1, 1.2, 2.0
F-13	4	0.6, 0.75, 0.8, 1.0
H-14	8	0.8, 0.9, 1.2, 1.5, 1.7, 2.0, 2.2
H-15	8	0.55, 0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1.2, 1.5, 2.3
K-16	8	0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.75, 0.8, 0.9, 1.0
AA-16	8	0.35, 0.48, 0.6, 0.8, 0.9, 1.3, 1.75, 2.2
AB-14	5	0.25, 0.65, 0.75, 0.9, 1.0
AL-08	8	0.4, 0.5, 0.6, 0.9, 1.3, 1.55
AT-07	4	0.75, 0.8, 1.3, 2.0
AU-14	3	0.7, 0.75, 1.0

จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ ที่เกิดแถบ DNA ชัดเจนมากกว่า 4 แถบมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วหรั่ง 50 พันธุ์ (ภาพที่ 7-14) โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ D-20 ให้จำนวนแถบ DNA 6 แถบ และ AL-08 ให้แถบ DNA 8 แถบ ได้จำนวนแถบ DNAทั้งหมด 684 แถบ ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 0.2-2.2 กิโลเบส

การใช้ไพรเมอร์ D-20 ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอถั่วหรั่ง พบว่ามีดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ ที่มีขนาดอยู่ระหว่างประมาณ 250-2,000 คู่เบส ได้แก่ขนาดประมาณ 2,000, 1,200, 1,100, 800, 550 และ 270 คู่เบส โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส สามารถให้ความแตกต่างภายในกลุ่มสายพันธุ์

ไพรเมอร์ AL-08 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ระหว่างประมาณ 350-2,500 คู่เบส จำนวน 8 แถบ ได้แก่ขนาดประมาณ 2,200, 1,750, 1,300, 900, 800, 600, 480 และ 350 โดยแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส สามารถให้ความแตกต่างภายในกลุ่มสายพันธุ์ได้

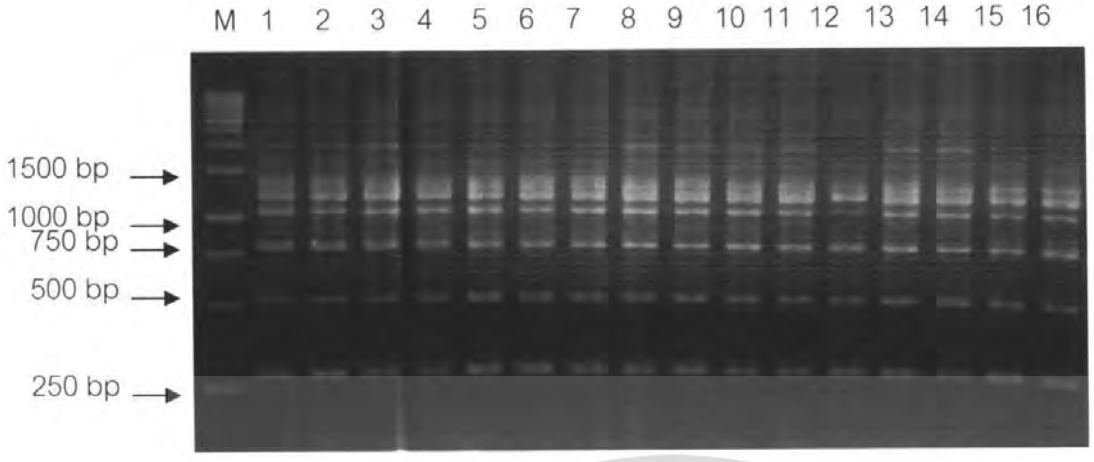
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



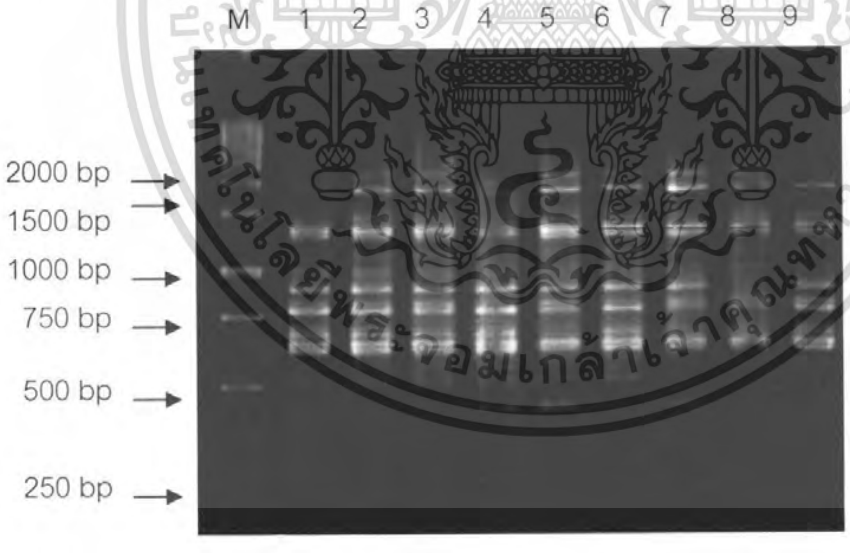
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์
(M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu459, 2= TVsu461, 3= TVsu464, 4= TVsu466,
5= TVsu488, 6= TVsu492, 7= TVsu510, 8= TVsu519, 9= TVsu553,
10= TVsu564, 11= TVsu607, 12= TVsu608, 13= TVsu610, 14= TVsu619,
15=TVsu 770, 16= TVsu665, 17= TVsu697)

ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์
(M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu707,2= TVsu712, 3= TVsu724, 4= TVsu734,
5= TVsu744, 6= TVsu769, 7= TVsu835, 8= TVsu861, 9= TVsu862,
10= TVsu868, 11= TVsu869, 12= TVsu872, 13= TVsu873, 14= TVsu877,
15= TVsu878, 16= TVsu883)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

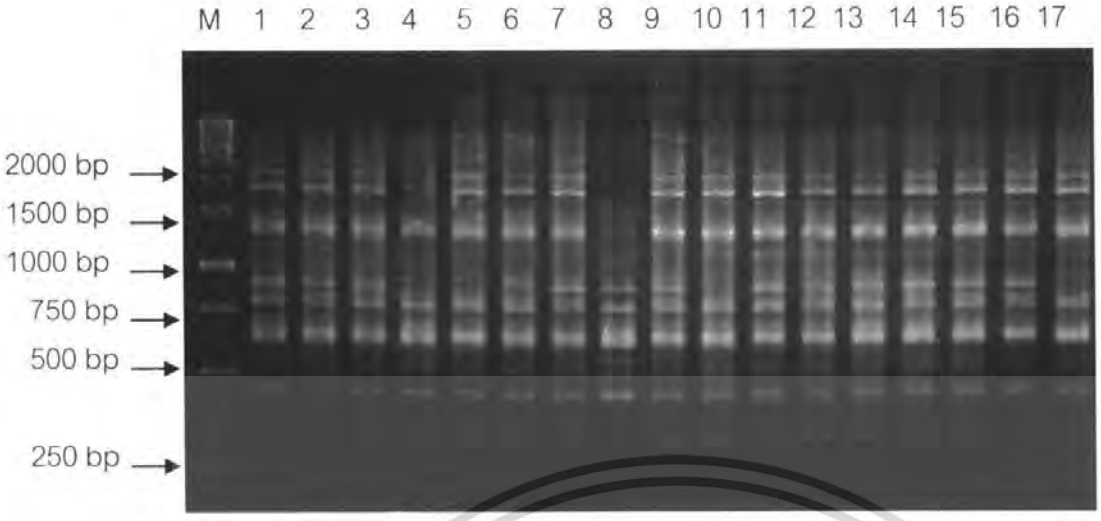


ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ D-20 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์
(M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu896, 2= TVsu898, 3= TVsu899,
4= TVsu900, 5= TVsu902, 6= TVsu904, 7= TVsu917, 8= TVsu918,
9= TVsu920, 10= TVsu921, 11= TVsu926, 12= TVsu927, 13= TVsu942,
14= TVsu974, 15= TVsu978, 16= TVsu989)



ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-08 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์
(M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu459, 2= TVsu461, 3= TVsu464, 4= TVsu466,
5= TVsu488, 6= TVsu492, 7= TVsu510, 8= TVsu553, 9= TVsu519)

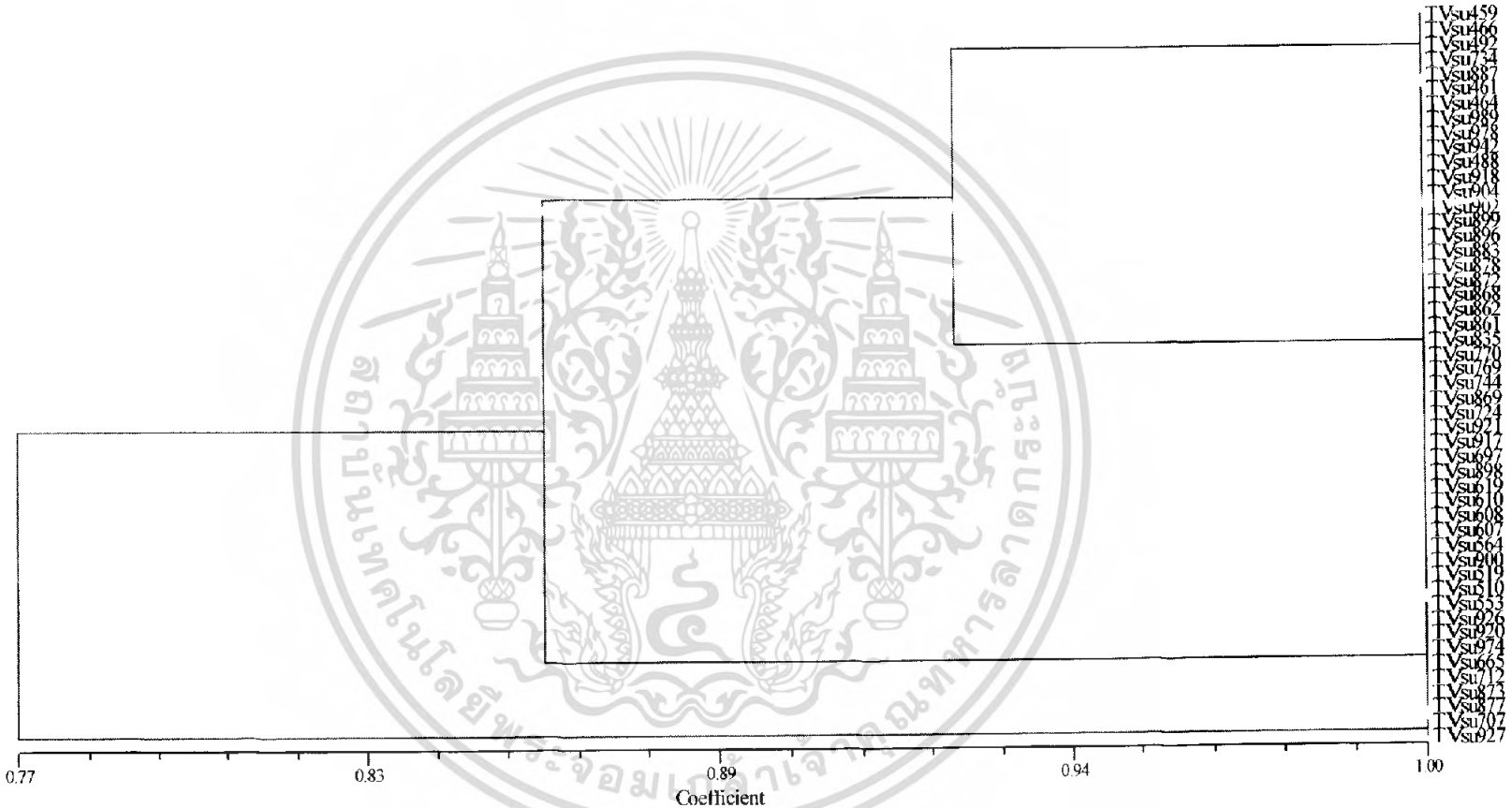
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AL-08 กับถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์ (M =แถบ DNA มาตรฐาน, 1= TVsu868, 2= TVsu869, 3= TVsu872, 4= TVsu873, 5= TVsu877, 6= TVsu878, 7= TVsu883, 8= TVsu887, 9= TVsu896, 10= TVsu898, 11= TVsu899, 12= TVsu900, 13= TVsu902, 14= TVsu904, 15= TVsu917, 16= TVsu918, 17= TVsu920)

จากจำนวนแถบ DNA ทั้ง 684 markers ที่แสดงความแตกต่างในถั่วหรั่งทั้ง 50 สายพันธุ์ซึ่งบันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" เมื่อเกิดแถบ DNA และ "0" ในกรณีที่ไม่เกิดแถบ DNA (ตารางผนวกที่ 2) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.02i โดยคำนวนค่า genetic similarity ของถั่วหรั่งทีละคู่ จากนั้นเขียนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดย UPGMA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มถั่วหรั่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ TVsu459, TVsu466, TVsu492, TVsu734 และ TVsu887 กลุ่มที่ 2 จำนวน 35 สายพันธุ์ ได้แก่ TVsu461, TVsu464, TVsu488, TVsu510, TVsu519, TVsu564, TVsu607, TVsu608, TVsu610, TVsu619, TVsu697, TVsu724, TVsu744, TVsu769, TVsu770, TVsu835, TVsu861, TVsu862, TVsu868, TVsu869, TVsu872, TVsu878, TVsu883, TVsu896, TVsu898, TVsu899, TVsu900, TVsu902, TVsu904, TVsu917, TVsu918, TVsu921, TVsu942, TVsu978 และTVsu989 กลุ่มที่ 3 จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ TVsu553, TVsu926, TVsu920, TVsu974, TVsu665, TVsu712, TVsu873 และ TVsu877 และกลุ่มที่ 4 จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ TVsu707 และ TVsu927 โดยค่า genetic similarity ของทั้ง 4 กลุ่มที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.77-1.0 (ภาพที่ 15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของถั่วหรั่ง 50 สายพันธุ์

วิจารณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

1. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์

สารแมกเนียมเซียมไอออน เมื่อมาทำในปฏิกิริยา PCR จะอยู่ในรูปแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Dieffenbach and Gabriela, 2003) ถ้ามีความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยามากเกินไป จะทำให้มีการเพิ่มขยายผลิตผลที่ไม่จำเพาะ (nonspecific product) สะสมมาก แต่ถ้ามีความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์น้อยเกินไป จะลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการ (Saiki, 1998) ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 2 ระดับ คือ 0.1 ไมโครลิตร และ 0.15 ไมโครลิตร พบว่า ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน DNA ของถั่วหรั่งคือ 3.125 มิลลิโมลาร์ สอดคล้องกับการทดลองของ Parent and Page (1998) ในการจำแนกพันธุ์ rasberry 15 ตัวอย่าง พบว่าการใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์เท่า 3 มิลลิโมลาร์ สามารถสร้างแถบ DNA ที่ปรากฏได้ชัดเจน

2. ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ถ้าใช้ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase สูงเกินไปจะเป็นผลให้เกิดการสะสมของผลิตผลที่เป็น nonspecific background เกิดขึ้นมาก แต่หากใช้ในปริมาณที่ต่ำเกินไปจะทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่ำเกินไป ทำให้แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไม่ชัดเจน (Saiki and Gelfand, 1989) จากการทดลองใช้ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase 0.5, 0.75 และ 1 ยูนิต พบว่าความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต มีการสังเคราะห์ DNA ได้มากขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Staub *et al.* (1996) ซึ่งรายงานว่า *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต ทำให้เกิดการปรากฏของแถบดีเอ็นเอของแตงกวาที่ชัดเจน

3. ความเข้มข้นของ dNTPs

เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับแมกนีเซียมไอออนได้ ปริมาณ dNTPs จึงเป็นตัวกำหนดปริมาณ free Mg^{2+} ฉะนั้น ถ้าเปลี่ยนความเข้มข้นของ dNTPs มาก ๆ ควรจะต้องปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนให้พอเหมาะด้วย ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ dNTPs ที่มีผลต่อการเกิดแถบ DNA คือ 1.25 ไมโครลิตร สอดคล้องกับการจำแนกพันธุ์มะม่วงของ Valenzuela *et al.* (1997) ที่ใช้ dNTPs เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าสามารถคัดเลือกไพรเมอร์จาก 40 ไพรเมอร์ ได้ 13 ไพรเมอร์ ให้ 109 แถบของ DNA สามารถจำแนกพันธุ์มะม่วงได้เป็น 4 กลุ่ม (Saiki, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ความเข้มข้นของ DNA แม่แบบ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยา โดยทั่วไปดีเอ็นเอที่ใช้จะมีความเข้มข้นระหว่าง 5-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในกรณีที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงมากเกินไปจะทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาด ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาไม่ชัดเจน เนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่สามารถเกิดได้ดีในสภาพดีเอ็นเอมีความเข้มข้นสูงเกินไป (Saiki, 1989) จากการทดลองใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบ 10 และ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่แบบที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของถั่วหรั่งคือ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ Debener *et al.* (1996) ที่ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเข้มข้น 20 นาโนกรัม ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากใบกุหลาบ พบว่า จากไพรเมอร์ที่คัดเลือก 13 ไพรเมอร์ ให้ 104 polymorphism ซึ่งสามารถนำมาใช้จำแนกพันธุ์กุหลาบได้ และการทดลองของ Huang *et.al* (1997) พบว่าดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้น 20 นาโนกรัมมีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา RAPD เพื่อจำแนกพันธุ์ข้าว

การจำแนกพันธุ์ถั่วหรั่ง 50 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD

ในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งทั้ง 50 สายพนธุ์เพียง 2 ไพรเมอร์เท่านั้น ทำให้การแยกกลุ่มของสายพันธุ์ไม่เพียงพอมีผลทำให้แต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมสูงมาก สังเกตุได้จากค่า similarity coefficient ที่มีค่า 0.77-1 แตกต่างจากการทดลองของ amadou et al.(2001) ซึ่งจำแนกความหลากหลายของพันธุกรรมของถั่วหรังจำนวน 25 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 17 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธุ์ของถั่วหรั่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ และแต่ละกลุ่มก็สามารถจำแนกได้เป็นกลุ่มย่อยตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ละเอียดมากขึ้น ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรใช้จำนวนไพรเมอร์เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในปฏิกริยา PCR เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุกรรมของถั่วหรั่งโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าการใช้ แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3.125 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต dNTPs เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ DNA แม่แบบเข้มข้น 20 นาโนกรัม สามารถสังเคราะห์แถบ DNA ที่ชัดเจนและเมื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างของสายพันธุ์ถั่วหรั่ง 95 ไพรเมอร์ พบว่ามี 19 ไพรเมอร์ ให้ polymorphic band นำค่าความแตกต่างที่ได้ไปคำนวนค่าเหมือนทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มสายพันธุ์ถั่วหรั่งทั้ง 50 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจำแนกถั่วหรั่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วงระหว่าง 0.77-1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2533. ถั่วหรั่งคุณรู้จักหรือยัง...กสิกร.อ้างโดย: เยาวลักษณ์ กุลโท. 2548. การพัฒนาของเมล็ดถั่วหรั่ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2549. พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วหรั่ง. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 80 หน้า.

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, เพลินพิศ สงสังข์, นลินี ศิวากรณ์, จิระ สุวรรณประเสริฐ และปรีชา สุรินทร์. 2537. โรคของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean*).ว.วิทย.กษ.27:189-201.

เทอด สุวรรณศีรี.2529.ถั่วหรั่ง, *ใน* สุทธิวงศ์ พงไพบูลย์, บรรณาธิการ.สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้เล่มที่4. สถาบันทักษิณคดีศึกษา มหาวิทยลัยศรีนครินทรวิโรฒสงขลา, สงขลา. หน้า 1407-1408.

ธนวัฒน์ ชูช่อ. 2546. การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 93 หน้า.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. อภิชาติการพิมพ์, มหาสารคาม.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. ถั่วหรั่ง. [http://www.kasetcity.com/Sanha/view.asp?id=292] December 24, 2007.

ภาณี ทองพำนัก, อาสาฬหะ พัฒนธารา, บังอร ยิ้มแย้ม และสุดใจ ล้อเจริญ. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมว่านชักมดลูก (พืชวงศ์ขิง) ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. [http://www.dongdib.com/e_book/volume_2/pdf/doc_47.pdf] December 24, 2007.

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

วิสุทธิ์ ใบไม้ พงพันธ์ กองทอง พวงเพ็ย ศิริรักษ์ พเยาว์ บุญประกอบ พานี เชี่ยววานิช พุฒิพงศ์ วรวุฒิ มาลียา เครือตราชู วัชโรบล ชีวคุปต์ ศรีสุมนต์ สีตะธนี สมศักดิ์ กลิ่นสุข สุมณฑา พรหมบุญ, สุนนันท์ สุภัทรพันธุ์ และอรรถ บุญนิธิ. 2530. ชีววิทยา. โครงการปรับปรุงหลักสูตรวิทยาศาสตร์ระดับมหาวิทยาลัย, ทบวงมหาวิทยาลัย, กรุงเทพ. 819 หน้า.

วิสุทธ์ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ประโยชน์ถั่วหรั่งในภาคใต้. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 564 หน้า.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2538. สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ. 564 หน้า.

สมิต บุญเสริมสุข รุ่งนภา พัฒนวิบูลย์ และวลัยพร สถิตวิบูรณ์. การประยุกต์ใช้ RAPD ในการจำแนกพันธุ์ไผ่บางชนิดในประเทศไทย. [http://www.forest.go.th/silvic/WP_Publications/Paper_SVG Pub_PDF/SilvicSemina7/t24SS.pdf] December 24, 2007.

สุพัตรา คงสมมาตย์. 2549. การใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ในการจัดจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ศิริกุล ศรีแสงจันทร์ และนันทวรรณ สโรบล. 2545. รายงานการศึกษาตลาดละการใช้ประโยชน์ถั่วหรั่งในภาคใต้. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. ม.ป.ป. คู่มือการสอนวิชา 003579 ชีวโมเลกุลการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์วิทยาเขต กำแพงแสน, นครปฐม.

Amadou, H.I., Bebeli P.J. and P.J. Kaltsikes. 2001. Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranean L.*) germplasm revealed by RAPD markers. Genonome 44: 995-999.

Carvalho, L.J., Thro A.M. and Vilarinhos. 2000a. Mophological descriptors and random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker used to assess the gennetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), In Cassava Biotechnology. Embrapa. Brazil. pp. 51-64.

Carvalho, L.J., Thro A.M. and Vilarinhos. 2000b. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in a germplasm collection assessed by RAPD assay, In Cssava Biotechnology. Embrapa. Brazil. pp. 80-92.

Chomchaiow, N.1993. Bambara Groundnut, In N.Chomchaiow, C.L.L. Gowda, and P.Laosuwan, eds. Proceeding of the FAO/UNDP Project RAS/89/040 Workshop on Underexploited and Potential Food Legumes in Asia and the Pacific. Bangkok, Thailand. pp. 30-34. อ้างโดย: จิระ สุวรรณประเสริฐ, 2549. พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วหรั่ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Duke, J.A., Okigbo B.N., Reed C.F. and J.K.P. Weder. 1977. *Voandzlea subterranean* (L.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thouars. Trop. Grain Legume Bull. 10:8-11.

Frahm-Leliveld, J.A. 1953. Some chromosome numbers in tropical leguminous plants. Euphytica. 2:46-48.

Henry, R.J. 1997. Practical Applications of Plant Molecular Biology. Chapman&Hall. London. pp. 8-10.

INCO-DC. 2001. First Annual Report, October 2001-September 2002. Documents. Available Source [http://www.edv.agrar.tu.-muenchen.de/pbpz/bambara/html/documents.htm], December 5, 2002. อ้างโดย จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2549. พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วหรั่ง. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 80 หน้า.

INCO-DC. 2002. Second Annual Report, October 2001-September 2002. Documents. Available Source. [http://www.edv.agrar.tu.\muenchen. de/pbpz/bambara/html/ documents.htm], December 5, 2002. อ้างโดย จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2549. พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วหรั่ง. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 80 หน้า.

Lennemann, A.R. 1987. Bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) - a review. Abstr. Trop. Agri. 12: 9-25.

Liu, B.H. 1998. Statistical Gennomice. CRC Press, New York.

Massawe,F.J., Azam-Ali S.N. and Roberts J.A. 2000. Use of molecular markers to explore phenotypic variation between and within landraces of bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.). Abstract J. Exp. Bot. 51:17.

Massawe,F.J., Azam-Ali S.N. and Roberts J.A. 2005. Breed in bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.). strategic considerations. Afr.J.Biotechnol. 4: 463-471.

Pasquet, R.S., S. Schwedes and P. Gepts. 1999. Isozyme diversity in bambara groundnut Crop Sci. 39:1228-1236.

Sellschop, J.P.F. 1962. Cowpeas, *Vigna subterranean* (L.) Walp. Field Crop Abst. 15: 259-266.

Singrun, C. and W. Schenkel. 2003. Fingerprinting of Bambara groundnut germplasm with molecular markers, In Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium. 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.

Weeden, N.F.*et al.* 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers". In Applications of RAPD Technology To Plant Breeding. Joint Plant Breeding Syposia series 1 November 1992. Crop Sci. Socity of Amer. pp.12-17.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

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

ผลการสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธีการ RAPDโดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กับการเกิดแถบ DNA และ "0" กับการไม่เกิดแถบ DNA หรือ "9" กรณีไม่มีการสังเคราะห์ DNA

ตารางผนวกที่ 2 ผลการสังเคราะห์ DNA ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ D-20 และ AL-08

ชื่อสายพันธุ์	แถบDNAที่เกิดจาก ไพรเมอร์ D-20				ชื่อสายพันธุ์	แถบDNAที่เกิดจาก ไพรเมอร์ AL-08			
TVsu459	1	0	1	1	TVsu459	1	1	1	1
TVsu461	1	1	1	1	TVsu461	1	1	1	1
TVsu464	1	1	1	1	TVsu464	1	1	1	1
TVsu466	9	9	9	9	TVsu466	1	1	1	1
TVsu488	1	1	1	1	TVsu488	1	1	1	1
TVsu492	1	1	0	1	TVsu492	1	1	1	1
TVsu510	1	1	1	1	TVsu510	1	1	1	1
TVsu519	1	1	1	1	TVsu519	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 **(ต่อ)** ผลการสังเคราะห์ DNA ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ D-20 และ AL-08

ชื่อสายพันธุ์	แถบDNAที่เกิดจากไพรเมอร์ D-20				ชื่อสายพันธุ์	แถบDNAที่เกิดจากไพรเมอร์ AL-08			
TVsu553	1	1	1	1	TVsu553	1	0	1	1
TVsu564	1	1	1	1	TVsu564	1	1	1	1
TVsu607	1	1	1	1	TVsu607	1	1	1	1
TVsu608	1	1	1	1	TVsu608	1	1	1	1
TVsu610	1	1	1	1	TVsu610	1	1	1	1
TVsu619	1	1	1	1	TVsu619	1	1	1	1
TVsu665	1	1	1	1	TVsu665	1	1	1	1
TVsu697	1	1	0	1	TVsu697	1	0	1	1
TVsu707	1	1	1	1	TVsu707	1	0	1	1
TVsu712	1	1	1	1	TVsu712	1	1	1	1
TVsu724	1	1	0	1	TVsu724	1	1	1	1
TVsu734	1	1	1	1	TVsu734	1	1	1	1
TVsu744	1	1	1	1	TVsu744	1	1	1	1
TVsu769	1	1	1	1	TVsu769	1	1	1	1
TVsu770	1	1	1	1	TVsu770	1	0	1	1
TVsu835	1	1	1	1	TVsu835	1	1	1	1
TVsu861	1	1	1	1	TVsu861	1	1	1	1
TVsu862	1	1	1	1	TVsu862	1	1	1	1
TVsu868	1	1	1	1	TVsu868	1	1	1	1
TVsu869	1	1	1	1	TVsu869	1	1	1	1
TVsu872	1	1	1	1	TVsu872	1	1	1	1
TVsu873	1	1	1	1	TVsu873	1	0	1	1
TVsu877	1	1	1	1	TVsu877	1	0	1	1
TVsu878	1	1	1	1	TVsu878	1	1	1	1
TVsu883	1	1	1	1	TVsu883	1	1	1	1
TVsu887	9	9	9	9	TVsu887	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 **(ต่อ)** ผลการสังเคราะห์ DNA ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ D-20 และ AL-08

ชื่อสายพันธุ์	แถบDNAที่เกิดจากไพรเมอร์ D-20				ชื่อสายพันธุ์	แถบDNAที่เกิดจากไพรเมอร์ AL-08			
TVsu896	1	1	1	1	TVsu896	1	1	1	1
TVsu898	1	1	1	1	TVsu898	1	1	1	1
TVsu899	1	1	1	1	TVsu899	1	1	1	1
TVsu900	1	1	1	1	TVsu900	1	1	1	1
TVsu902	1	1	1	1	TVsu902	1	1	1	1
TVsu904	1	1	1	1	TVsu904	1	1	1	1
TVsu917	1	1	1	1	TVsu917	1	1	1	1
TVsu918	1	1	1	1	TVsu918	1	1	1	1
TVsu920	1	1	1	1	TVsu920	1	0	1	1
TVsu921	1	1	1	1	TVsu921	1	1	1	1
TVsu926	1	1	1	1	TVsu926	1	0	1	1
TVsu927	1	1	0	1	TVsu927	1	0	1	1
TVsu942	1	1	1	1	TVsu942	1	1	1	1
TVsu974	1	1	1	1	TVsu974	1	1	1	1
TVsu978	1	1	1	1	TVsu978	1	1	1	1
TVsu989	1	1	1	1	TVsu989	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล : นางสาวธัญยธรณ์ ศรีเกษวุฒิวงศ์

วันเดือนปีเกิด : 31 ธันวาคม พ.ศ. 2528

ที่อยู่ในสำเนาทะเบียนบ้าน : 68/1 ถ.หลวงพรต แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพมหานคร

โทรศัพท์ : 087-7979547

ที่อยู่ปัจจุบัน : 68/1 ถ.หลวงพรต แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพมหานคร

โทรศัพท์ : 087-7979547

การศึกษา : พ.ศ. 2535-2540 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนเชิดเจิมศิลป์
จังหวัดกรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2541-2543 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพรตพิทยพยัต
จังหวัดกรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2544-2546 ระดับ มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพรตพิทยพยัต
จังหวัดกรุงเทพมหานคร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล : นางสาวณัฐกานต์ ปรารถนา

วันเดือนปีเกิด : 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529

ที่อยู่ในสำเนาทะเบียนบ้าน : 7 ถ.ข้าง น.ป.พ. ต.เชียงเนิน อ.เมือง จ.ระยอง

โทรศัพท์ : 086-3918393

ที่อยู่ปัจจุบัน : จิรธรแมนชัน ซอยรามคำแหง152 ถ.สุขวภิบาล3 แขวงบึงกุ่ม เขตบึงกุ่ม จ.กรุงเทพมหานคร

โทรศัพท์ : 086-3918393

การศึกษา : พ.ศ. 2535-2540 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนเซนต์โยเซฟระยอง จังหวัดระยอง

พ.ศ. 2541-2543 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเซนต์โยเซฟระยอง จังหวัดระยอง

พ.ศ. 2544 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเซนปอลคอนแวนต์ จังหวัดชลบุรี

พ.ศ. 2545-2546 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนระยองวิทยาคม จังหวัดระยอง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้