

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนจากจังหวัดชุมพร
โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์

DNA FINGERPRINT ANALYSIS OF DURIAN FROM CHUMPHON
PROVINCE USING SRAP AND SSR MARKERS



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-013

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนจากจังหวัดชุมพร
โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์

DNA FINGERPRINT ANALYSIS OF DURIAN FROM CHUMPHON
PROVINCE USING SRAP AND SSR MARKERS



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA FINGERPRINT ANALYSIS OF DURIAN FROM CHUMPHON
PROVINCE USING SRAP AND SSR MARKERS



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2017
KMITL-2017-SC-M-020-013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

“การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนจากจังหวัดชุมพร
โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์”
(DNA FINGERPRINT ANALYSIS OF DURIAN FROM
CHUMPHON PROVINCE USING SRAP AND SSR MARKERS)

ชื่อนักศึกษา

นางสาวณัฐกุล ถิ่นหัวเตย

รหัสประจำตัว

58605047

ปริญญา

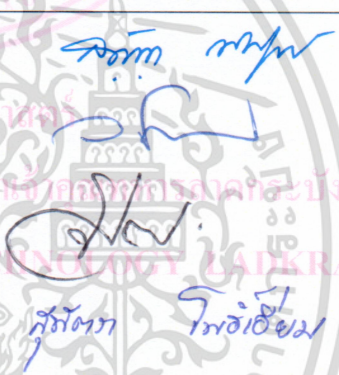
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกักษ์ ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 13 พฤศจิกายน พ.ศ. 2560 เวลา 13.00 - 16.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ตึกจุฬารัตน 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.อิทธิพล แจ่มชัด)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 18 เดือน 11 พ.ศ. 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนจากจังหวัดชุมพร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐกุล ถิ่นหัวเตย
รหัสประจำตัว	58605047
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

ทุเรียน (*Durio zibethinus*) เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยแบ่งเป็นทุเรียนพันธุ์และทุเรียนบ้าน ซึ่งทุเรียนบ้านบางต้นสามารถพัฒนาเป็นทุเรียนเศรษฐกิจหรือใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ เพื่อนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียน พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเก็บตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรจำนวน 30 ตัวอย่าง และตัวอย่างทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นสถานที่รวบรวมพันธุ์ทุเรียนจำนวน 15 ตัวอย่าง นำมาศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 13 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความต่าง 138 แถบ คิดเป็น 65.62 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์พบว่า 14 คู่ไพรเมอร์ แสดงความต่างของแถบดีเอ็นเอ 36 แถบ คิดเป็น 71.19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลร่วมกันของ 2 เครื่องหมายโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนได้ 5 กลุ่ม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.72 ถึง 0.96 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE สามารถแบ่งโครงสร้างทางพันธุกรรมได้ 2 รูปแบบ และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN ได้ค่า G_{ST} เท่ากับ 0.1668 แสดงถึงการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับที่สูง โดยเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรมาก ในการศึกษาข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพบว่า ทุเรียนที่นำมาศึกษามีลักษณะรูปร่างทรงผลเป็นทรงรี รูปร่างหนามเว้าปลายแหลม สีเนื้อเป็นสีเหลือง และรูปร่างเมล็ดเป็นรูปกลมรีเหมือนไข่ ซึ่งลักษณะที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มทุเรียนได้ คือรูปร่างหนาม และพบว่ากลุ่มตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรส่วนใหญ่จะมีรูปร่างหนามเป็นทรงเว้าปลายแหลม และตัวอย่าง CH16 ที่นำมาวิเคราะห์คุณภาพผลพบว่า มีความหวานพอเหมาะ มีปริมาณแป้งน้อย และกลิ่นอ่อนซึ่งเป็นลักษณะพันธุ์ดี จากงานวิจัยนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ทุเรียนบ้านเพื่อปรับปรุงพันธุ์และพัฒนาให้เป็นทุเรียนเศรษฐกิจในอนาคต

คำสำคัญ : เครื่องหมายเอสอาร์เอพี เครื่องหมายเอสเอสอาร์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ทุเรียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	DNA fingerprint analysis of durian from Chumphon province using SRAP and SSR markers
Student Name	Nattakul Thinhuatoey
Student ID	58605047
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2017
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

Durian (*Durio zibethinus*) is a fruit that important to the economy of the country. Durian was divided famous durian and indigenous durian. However, some indigenous durian can be developed to economic and used to improve breeding. The aims of this research to study the genetic diversity by SRAP and SSR markers to create a DNA fingerprint of durian and study relationship between genetic and data importance attribute of economic. The 30 samples were collected from Chumphon province and 15 samples were collected from Chanthaburi Horticultural Research Center that is the place of durian varieties collection. The studies on 13 primers combination of SRAP marker showed that 138 fragments (65.62%) were polymorphic bands and 36 fragments (71.19%) were polymorphic bands from 14 primers combination of SSR marker. Analysis of genetic relationship used two markers with UPGMA by NTSYSpc program showed similarity coefficient ranged from 0.72 to 0.96, divided into five groups. When analyzed by STRUCTURE program, divides genetic into two groups and found high genetic diversity ($G_{ST} = 0.1668$) from ARLEQUIN analysis, mostly had genetic variation within the population. Studies on important characteristic economy found that sample of durian had fruit shape is oval, fruit spine shape is pointed-concave, flesh color is yellow and seed shape is ellipsoid which mostly durian from Chumphon province found fruit spine shape is pointed-concave and CH16 was good of characteristics such as sweet taste fit, less starch content and no strong smell. This research can be used data to select indigenous durian cultivars for improve breeding and developed as economic durian in the future.

Keywords : SRAP marker, SSR marker, Genetic diversity, Durian, Indigenous durian

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ในหัวข้อเรื่องการวิเคราะห์หลายพิมพ์ตีเอ็นเอของทุเรียนจากจังหวัดชุมพรโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลที่มีพระคุณดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิด เสนอแนวทางการแก้ปัญหา อีกทั้งให้กำลังใจ ทูมเทร่างกายและกำลังใจทรัพย์ รวมถึงตรวจวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำสาขา และ ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ที่ร่วมพิจารณาในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณ ทนุอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังประจำปี พ.ศ. 2558 ถึง พ.ศ. 2559 และทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2559 ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

ขอขอบพระคุณ อาจารย์พรณิภา ย้วยล อาจารย์ประจำสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ และศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี กรมวิชาการ เกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณ การอำนวยความสะดวกจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและพี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆ ห้องเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1 ที่ให้ความช่วยเหลือ จึงสามารถทำงานวิจัยนี้ได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี หากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวณัฐกุล ถิ่นหัวเตย
พฤศจิกายน 2560

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการจัดจำแนกสายพันธุ์ทุเรียน	4
2.1.1 ประวัติและการแพร่กระจายของทุเรียน	4
2.1.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	7
2.1.3 สายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองหรือทุเรียนบ้าน	9
2.2 เครื่องหมายโมเลกุลในทุเรียน	11
2.2.1 เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Sequence-Related Amplified Polymorphism; SRAP).....	11
2.2.2 เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat; SSR).....	14
2.2.3 เครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	19
3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา	19
3.2 อุปกรณ์	22
3.3 สารเคมีและสารละลาย	23
3.4 วิธีการทดลอง.....	26
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ	26
3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณดีเอ็นเอ.....	27
3.4.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี	28
3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์.....	29
3.4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรม	31
3.4.7 การเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของทุเรียน.....	31
3.4.8 การวิเคราะห์คุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ	32
3.4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพผล ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยใช้โปรแกรม R studio	34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	35
4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี	35
4.1.1 ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม	35
4.1.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เอสอาร์เอพี	37
4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์.....	44
4.3 ผลการเปรียบเทียบการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ด้วย เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์.....	52
4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี ร่วมกับเอสเอสอาร์.....	56
4.5 ผลการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม.....	59
4.6 ผลการศึกษาข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพผลที่มีความสำคัญทาง เศรษฐกิจ.....	63
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	71
5.1 สรุปผลการวิจัย	71
5.2 ข้อเสนอแนะ	72
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก.....	81
ประวัติผู้เขียน.....	84

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกทุเรียน 6 กลุ่ม.....	8
3.1 รหัสตัวอย่าง ชื่อเจ้าของและสถานที่ ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์ และอายุของ ทุเรียนที่ใช้ในการศึกษาจากจังหวัดชุมพร	19
3.2 รหัสตัวอย่าง และสายพันธุ์ทุเรียนที่ใช้ในการศึกษาจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี.....	22
3.3 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี	24
3.4 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์	25
3.5 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี ..	28
3.6 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย โมเลกุลเอสอาร์เอพี	29
3.7 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์...	30
3.8 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย โมเลกุลเอสเอสอาร์.....	30
4.1 ชนิดของไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี.....	38
4.2 ชนิดของไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์	45
4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ความต่างของแถบดีเอ็นเอ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม การแบ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์	53
4.4 การจัดกลุ่มตัวอย่างทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างตามชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล	54
4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (AMOVA) ของกลุ่มประชากรทุเรียนด้วย เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เอสเอสอาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกัน	62

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 (ก) การขยายพันธุ์ทุเรียนด้วยเมล็ดและกิ่งตอน และ (ข) ลักษณะของสายพันธุ์ทุเรียน อืบาท ทองสุก และการะเกด	5
2.2 ใบ ช่อดอก และผลของทุเรียน.....	5
2.3 แหล่งเพาะปลูกทุเรียนในประเทศไทย.....	6
2.4 สายพันธุ์ทุเรียนที่นิยมปลูก บริโภคภายในประเทศ และส่งออก ได้แก่ (ก) สายพันธุ์ หมอนทอง (ข) สายพันธุ์ชะนี (ค) สายพันธุ์ก้านยาว และ (ง) สายพันธุ์กระดุมทอง	9
2.5 (ก) ลักษณะต้น (ข) ทรงผล (ค) สีเนื้อ และ (ง) เมล็ดของทุเรียนบ้าน	10
2.6 ตัวอย่างสายพันธุ์ทุเรียนบ้านที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น (ก) สายพันธุ์สาลิกา (ข) สายพันธุ์กมลา (ค) สายพันธุ์หลงลับแลและหลินลับแล	11
2.7 องค์ประกอบของ Forward และ Reverse primer ของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี..	12
2.8 (ก) การเข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมายของคูไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะ และ (ข) แบบจำเพาะ ของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี.....	13
2.9 (ก) แสดงการจัดเรียงลำดับเบสแบบซ้ำๆ และการเข้าจับของชนิดไพรเมอร์ และ (ข) แสดง ผลผลิตของขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แตกต่างกันของเครื่องหมาย โมเลกุลเอสเอสอาร์	15
3.1 แบบฟอร์มการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	32
4.1 แถบดีเอ็นเอของทุเรียนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี จำนวน 30 คูไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (จากซ้ายไปขวา: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และตัวอย่างทุเรียน 3 สายพันธุ์ คือ DZ01, DZ02 และ DZ03) โดย (ก) คูไพรเมอร์ ME1/EM6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (ข) คูไพรเมอร์ ME3/EM4 แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และ (ค) คูไพรเมอร์ ME4/EM3 แสดง ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน	36
4.2 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี ด้วยคูไพรเมอร์ ME4/EM5 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ในทุเรียน จำนวน 30 ตัวอย่าง.....	39
4.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 13 คูไพรเมอร์ โดยการจัดกลุ่มแบบวิธี UPGMA	42
4.4 แผนภาพแสดงการกระจายตัวของกลุ่มประชากร (PCoA) ทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี.....	43
4.5 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ด้วยคูไพรเมอร์ MS1CT5 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ในทุเรียน จำนวน 30 ตัวอย่าง.....	47

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ 14 คู่ไพเรเมอร์ โดยการจัดกลุ่มแบบวิธี UPGMA	50
4.7 แผนภาพแสดงการกระจายตัวของกลุ่มประชากร (PCoA) ทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์.....	51
4.8 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ร่วมกันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ โดยการจัดกลุ่มแบบวิธี UPGMA.....	58
4.9 แผนภูมิแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย (ก) เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพี (ข) เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ และ (ค) 2 เครื่องหมายร่วมกัน.....	61
4.10 ลักษณะรูปทรงผลทุเรียน (ก) ผลรูปไข่ (ovold) (ข) ผลรูปไข่กลับ (obovold) (ค) ผลรูปรี (eliptic) (ง) ผลทรงรี (oval) (จ) ผลกลมแบน (oblate) (ฉ) ผลกลม (globose) และ (ช) ผลขอบขนาน (oblong).....	64
4.11 ลักษณะรูปร่างหนามทุเรียน (ก) พีระมิต (pyramidal) (ข) ทรงกรวย (conical) (ค) นูน (convex) (ง) นูนปลายแหลม (pointed-convex) (จ) เว้า (concave) และ (ฉ) เว้าปลายแหลม (pointed-concave).....	65
4.12 ลักษณะสีเนื้อทุเรียน (ก) เนื้อสีเหลืองเข้ม (dark yellow) (ข) เนื้อสีเหลือง (yellow) (ค) เนื้อสีเหลืองอ่อน (light yellow) และ (ง) เนื้อสีซีด (pale yellow).....	65
4.13 ลักษณะรูปร่างเมล็ดทุเรียน (ก) รูปกลมรี (spheroid) (ข) รูปขอบขนาน (oblong) และ (ค) รูปกลมรีเหมือนไข่ (ellipsoid)	66
4.14 แผนภาพต้นไม้ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลความหนาแน่นของหนามทุเรียนจำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม R studio	67
4.15 แผนภาพต้นไม้ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลความหนาแน่นของเปลือกทุเรียนจำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม R studio	68
4.16 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ร่วมกันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์จำนวน 45 ตัวอย่าง โดยการจัดกลุ่มแบบวิธี UPGMA กับข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาในส่วนของผล.....	69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ทุเรียนเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ได้ชื่อว่าเป็นราชาแห่งผลไม้ (King of fruit) ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั้งในและต่างประเทศ (Somsri, 2007) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Durio zibethinus* Murray จัดอยู่ในวงศ์ (family) Bombacaceae พบอยู่ในทวีปอเมริกาใต้และเอเชีย พืชในสกุล *Durio* มีทั้งหมด 27 สปีชีส์ โดยพบในเกาะเบอร์เนียว 19 สปีชีส์ คาบสมุทรมลายู 11 สปีชีส์ และเกาะสุมาตรา 7 สปีชีส์ ส่วนในประเทศไทย พม่า ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ พบประเทศละ 1 สปีชีส์ (หิรัญ, 2551) ซึ่งมีเพียง 6 สปีชีส์ที่สามารถรับประทานผลได้ ได้แก่ ทุเรียนขนยาว (*Durio oxleyanus* Griff.) ทุเรียนข้าวติด (*D. graveolens* Becc.) ทุเรียนป่า (*D. dulcis* Becc.) ทุเรียนเต่า (*D. kutigensis* Becc.) ทุเรียนรากขา (*D. kutejensis* (Massk.) Becc.) และทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus* Murray) (เกศิณี, 2528) แต่หลักฐานของกรมป่าไม้รายงานว่า ประเทศไทยพบทุเรียน 4 สปีชีส์ คือทุเรียนดอน (*D. malaccensis* Planch. Ex. Mast.) ทุเรียนนก (*D. griffithii* (Mast.) Bakh.) ทุเรียนป่า (*D. pinanginan* Ridley) และทุเรียนบ้าน (*D. zibethinus* Murray) ในประเทศไทยทุเรียนที่มีการเพาะปลูกแพร่หลายเป็นการค้า คือทุเรียนบ้าน (หิรัญ และคณะ, 2546) โดยพบความหลากหลายของสายพันธุ์ทุเรียนมากกว่า 200 สายพันธุ์ (variety) สายพันธุ์ที่มีคุณภาพดีและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีไม่กี่สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์หมอนทอง ชะนี ก้านยาว และกระดุมทอง (กรมวิชาการเกษตร, 2553) จากการสำรวจในปี 2558 ประเทศไทยมีการเพาะปลูกทุเรียนกระจายเกือบทุกภาค มีพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศ 686,582 ไร่ พบว่าจังหวัดที่มีการเพาะปลูกมากที่สุด คือจันทบุรีมีจำนวน 197,143 ไร่ รองลงมา คือชุมพรมีจำนวน 139,663 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) โดยภาคใต้เป็นแหล่งรวบรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนพื้นเมืองหรือทุเรียนบ้าน ซึ่งเป็นทุเรียนที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมักปลูกตามบ้าน (สุตา และคณะ, 2557) ทุเรียนบ้านบางต้นมีลักษณะพันธุ์ดีและรสชาติอร่อยที่สามารถพัฒนาเป็นทุเรียนเศรษฐกิจหรือใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ได้ โดยสายพันธุ์ทุเรียนบ้านที่นิยม เช่น สายพันธุ์สาลิกาพบที่จังหวัดพังงา สายพันธุ์กมลลาพบที่จังหวัดภูเก็ต สายพันธุ์หลงลับแลและหลินลับแลพบที่จังหวัดอุตรดิตถ์ เป็นต้น ในการจัดจำแนกกลุ่มสามารถอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทรงผล หนาม รูปร่างใบ หรือรสชาติได้ (หิรัญ, 2551) แต่ไม่สามารถระบุหรือแยกสายพันธุ์ทุเรียนบ้านกับทุเรียนเศรษฐกิจได้ เนื่องจากส่วนมากชาวบ้านขยายพันธุ์ทุเรียนด้วยการเพาะเมล็ดเป็นหลัก ทำให้ทุเรียนเกิดการกลายพันธุ์จนมีทุเรียนหลากหลายสายพันธุ์จำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องอาศัยเครื่องหมายทางโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ ศึกษาความหลากหลาย และตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม ดังรายงานการศึกษาความหลากหลายในทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) (ฐิตาภรณ์ และคณะ, 2553) เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random Amplification of Polymorphic DNA; RAPD) (Vanijajiva, 2011) เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Inter-Simple Sequence Repeat; ISSR) (Vanijajiva, 2012) และเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

(Simple Sequence Repeat; SSR) (ปิยรัชฎ์ และคณะ, 2552) ซึ่งการศึกษาทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้จำเป็นต้องมีการศึกษากับหลายเครื่องหมายเพื่อเป็นการยืนยันผลและตรวจสอบความสอดคล้องหรือขัดแย้งของผลการทดลอง

เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (Powell *et al.*, 1996) เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) คือพันธุ์แท้ และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) คือพันธุ์ผสมได้ (ขวัญใจ และคณะ, 2552) ในการทดลองให้ผลเหมือนเดิม ง่ายต่อการทดลอง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย (10 ถึง 50 ng/ μ l) และตรวจพบระดับพอลิมอร์ฟิซึมค่อนข้างสูง (Oliveira *et al.*, 2006) เป็นเครื่องหมายที่นำมาศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น วอลนัต (*Juglans regia*) (Topcu *et al.*, 2015) สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria ananassa*) (Meng *et al.*, 2015) และดอกกลีลี (*Lilium spp.*) (Du *et al.*, 2015) รวมทั้งทุเรียน โดยฮูตา และคณะ (2557) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ศึกษาทุเรียนบ้านในจังหวัดนครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา สงขลา และยะลา เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Sequence-Related Amplified Polymorphism; SRAP) (Li and Quiros, 2001) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานในทุเรียน สามารถทำซ้ำแล้วให้ผลคงเดิม ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสก่อน และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันด้วยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็นเครื่องหมายที่มีความใกล้เคียงกับเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี แต่ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่า (Gulsen *et al.*, 2010) มีการนำไปใช้ศึกษาในพืชหลายชนิดเช่นกัน เช่น ฟักทอง (*Cucurbita moschata*) (ปณาลี และคณะ, 2551) เชอร์รี่ (*Prunus mahaleb* L.) (Abedian *et al.*, 2012) กระเทียม (*Allium sativum* L.) (Chen *et al.*, 2013) และชบา (*Hibiscus sp.*) (Chaoguang *et al.*, 2016) เป็นต้น รวมทั้งมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้งเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์เพื่อเปรียบเทียบผลและยืนยันผลการทดลอง เช่น คื่นฉ่าย (*Apium graveolens*) (Wang *et al.*, 2011) บัว (*Nymphaea lotus* Linn.) (Yang *et al.*, 2012) และฝรั่ง (*Psidium guajava*) (Padmakar *et al.*, 2015) เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้งเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์
- 1.2.2 ศึกษาเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลระหว่างเอสอาร์เอพีกับเอสเอสอาร์ในทุเรียน
- 1.2.3 หาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยได้ศึกษาตัวอย่างทุเรียนในอำเภอท่าชะและอำเภอปะทิวจังหวัดชุมพรจำนวน 30 ตัวอย่างที่เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2559 นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ และศึกษาลักษณะรูปร่างทรงผล รูปร่าง

หนาม สีนื้อ และรูปร่างเมล็ด รวมทั้งวิเคราะห์คุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้แก่ ปริมาณ Total soluble solids (ปริมาณความหวาน) ปริมาณแป้ง ปริมาณเส้นใย ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ รวมทั้งนำตัวอย่างทุเรียนที่เก็บรวบรวมสายพันธุ์ไว้ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ศูนย์วิจัยพืชสวน จังหวัดจันทบุรีจำนวน 15 ตัวอย่าง ใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบสายพันธุ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของทุเรียนบ้าน
- 1.4.2 ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดใหม่ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ทุเรียน
- 1.4.3 ได้ตัวอย่างทุเรียนที่มีคุณภาพโดดเด่น สามารถที่จะพัฒนาในเรื่องวิธีการปลูก และการเก็บเกี่ยวผลทุเรียนให้ง่ายขึ้นเพื่อส่งเสริมเป็นสายพันธุ์เศรษฐกิจต่อไปได้ในอนาคต



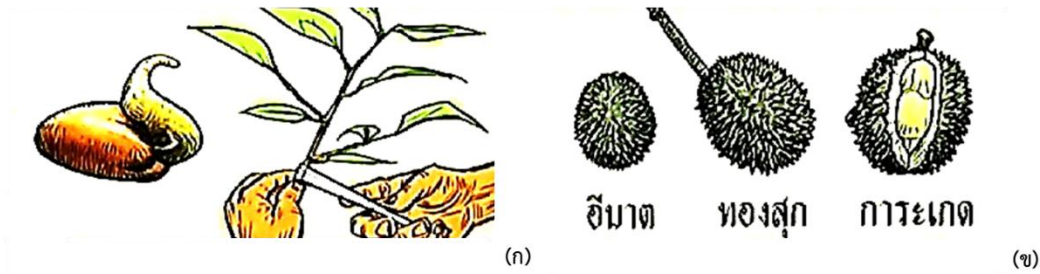
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการจัดจำแนกสายพันธุ์ทุเรียน

2.1.1 ประวัติและการแพร่กระจายของทุเรียน

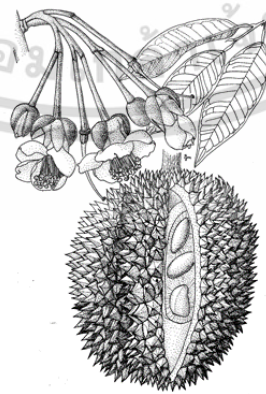
ทุเรียนเป็นไม้ผลเมืองร้อนประเภทที่ต้องการความชื้นสูง ทั่วโลกรู้จักมาเป็นเวลานาน ในยุคก่อนประวัติศาสตร์ทุเรียนนิยมบริโภคในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถิ่นกำเนิดของทุเรียนอยู่ในประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซีย (ดัดแปลงจาก Macmillan, 1949) โดยประเทศไทยมีการปลูกทุเรียนตั้งแต่สมัยอยุธยาซึ่งเริ่มมีการนำทุเรียนเข้ามาปลูกครั้งแรกทางภาคใต้ (เกตุฉิม, 2528) ในระยะแรกเป็นการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและพัฒนาเป็นการปลูกโดยใช้กิ่งตอน ดังรูปที่ 2.1ก จากสายพันธุ์ดี 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ बातทองคำหรืออืบาทอยู่ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด จัดเป็นทุเรียนสายพันธุ์เบาที่ปลูกแล้วให้ผลผลิตครั้งแรกเมื่อต้นมีอายุ 4 ถึง 6 ปี ระยะดอกบานจนถึงผลแก่ใช้เวลา 95 ถึง 105 วัน สามารถเก็บเกี่ยวได้ในกลางเดือนพฤษภาคม โดยลักษณะของใบเป็นทรงรูปไข่ขอบขนาน ผลเป็นทรงกลมแป้น ผลมีขนาดใหญ่ มีหลายพู หนามสั้นและห่าง หนามสีออกเหลือง ตามร่องหนามเป็นสีแดง ปลายหนามแห้ง เมล็ดมีขนาดใหญ่ เนื้อมีสีเข้ม และมีเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ทองสุขอยู่ในกลุ่มก้านยาว จัดเป็นทุเรียนสายพันธุ์กลางที่ปลูกแล้วให้ผลผลิตครั้งแรกเมื่อต้นทุเรียนมีอายุ 6 ถึง 8 ปี ระยะดอกบานจนถึงผลแก่ใช้เวลา 105 ถึง 120 วัน สามารถเก็บเกี่ยวได้ในช่วงต้นเดือนมิถุนายน โดยลักษณะของใบเป็นทรงรูปไข่ขอบขนาน ผลเป็นทรงรี ผลขนาดกลาง เนื้อเยื่อ เนื้อเนียน กลิ่นอ่อน และมีความหวานปานกลาง และสายพันธุ์การะเกดอยู่ในกลุ่มกบ จัดเป็นทุเรียนสายพันธุ์หนักที่ปลูกแล้วให้ผลผลิตเมื่อต้นทุเรียนมีอายุ 8 ปีขึ้นไป ระยะเวลาดอกบานจนถึงผลแก่จัดตั้งแต่ 120 วันขึ้นไป สามารถเก็บเกี่ยวได้ในต้นเดือนกรกฎาคม โดยลักษณะของใบเป็นทรงป้อมกลาง ใบ ผลเป็นทรงกลม ผลมีขนาดใหญ่ มีสีน้ำตาลแดง หนามใหญ่ เนื้อมีสีขาวออกทางเหลือง มีเนื้อมาก มีความเนียนค่อนข้างแฉะ กลิ่นอ่อน รสชาติหวาน มีความมันมาก และเมล็ดลีบ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) แสดงดังรูปที่ 2.1ข ในช่วงแรกกิ่งตอนจากสายพันธุ์ดีหาได้ยาก เกษตรจึงนิยมใช้เมล็ดจากทั้ง 3 สายพันธุ์ปลูกแทน เกิดเป็นทุเรียนลูกผสมขึ้นมากมายทำให้มีชื่อทุเรียนมากกว่า 200 สายพันธุ์ เนื่องจากการนำเมล็ดทุเรียนมาปลูกจะมีลักษณะที่ผิดแปลกไปจากต้นเดิม กลายเป็นทุเรียนพันธุ์ใหม่ อาจตั้งชื่อตามเดิมแต่เดิมชื่อผู้เพาะลงไป เช่น สายพันธุ์กบตาขำ เป็นทุเรียนที่เพาะจากเมล็ดทุเรียนสายพันธุ์กบ โดยมีผู้เพาะชื่อ ขำ หรือตั้งชื่อตามลักษณะผลภายใน เช่น สายพันธุ์จำปา เพราะสีของเนื้อผลคล้ายสีของดอกจำปา เป็นต้น (พิจิตร, 2542)



รูปที่ 2.1 (ก) การขยายพันธุ์ทุเรียนด้วยเมล็ดและกิ่งตอน และ (ข) ลักษณะของสายพันธุ์ทุเรียน อีบาต ทองสุก และการะเกด

(ที่มา: <http://www.duriannon.com/images/editor/l12.jpg>)

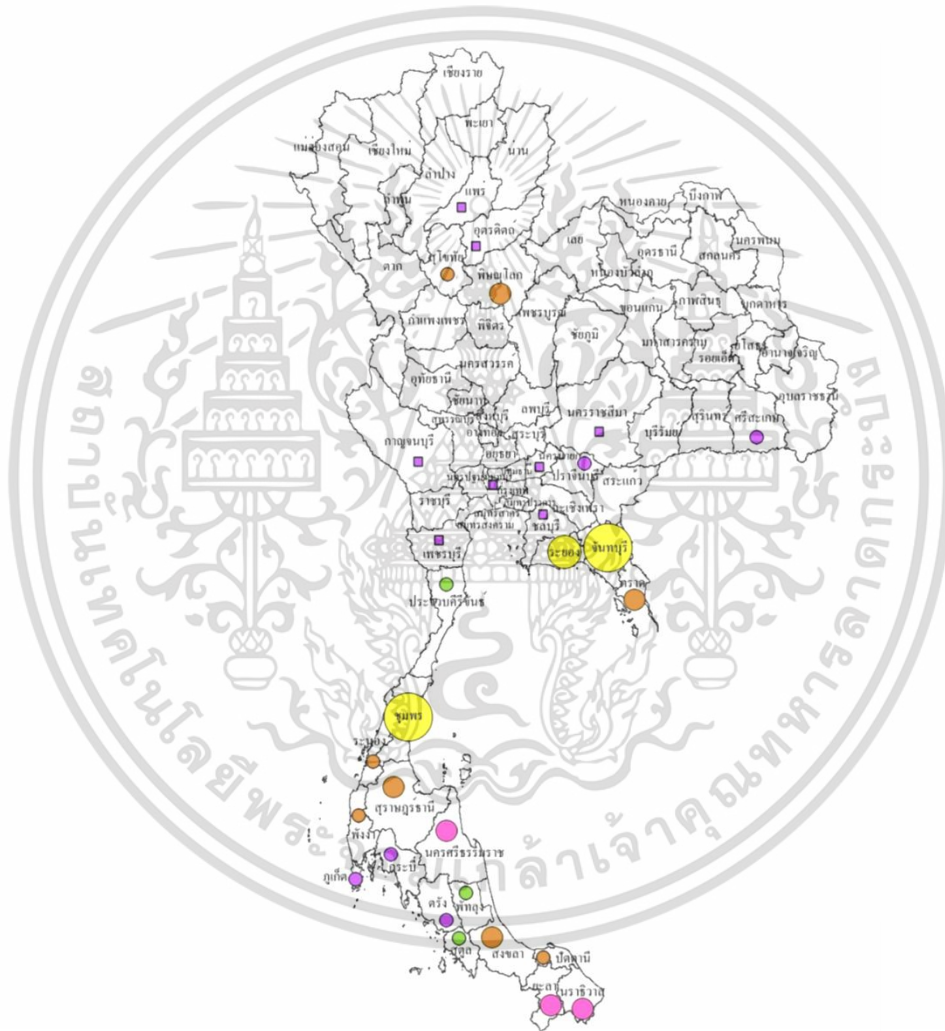
จากรายงานของเกศิณี (2546) ทรงพล (2551) และ Phengklai (1978) ได้สรุปลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทุเรียน (*Durio zibethinus* Murray) ไว้ดังนี้ ทุเรียนเป็นไม้ยืนต้น มีความสูงได้ถึง 20 ถึง 40 เมตร แต่ถ้าปลูกจากกิ่งตอนลักษณะต้นจะเตี้ยสูงประมาณ 8 ถึง 12 เมตร ทุเรียนออกดอกเป็นกลุ่มมีลักษณะครึ่งวงกลม เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบเลี้ยง (sepal) กลีบรอง (epicalyx) กลีบดอก (petal) ผลทุเรียนเป็นผลเดี่ยว (simple) มีเปลือก (rind) หนาและแข็งสีน้ำตาลอ่อน มีหนาม (spine) แหลรอบผล ทรงผลมีหลายแบบ เช่น กลม (rounded) กลมรี (oval) กลมแป้น (oblate) ทรงกระบอก (cylindroidal) ทรงรี (elliptic) รูปไข่ (ovate) รูปไข่กลับ (obovate) และทรงขอบขนาน (oblong) ผลเจริญมาจาก 1 รังไข่ แต่แบ่งเป็น 3 ถึง 5 ช่อง ซึ่งผนังภายในช่องจะเป็นมันเรียบ แต่ละช่องจะมี 1 ถึง 6 เมล็ด เนื้อ (aril) มีหลากหลายสีขึ้นอยู่กับลักษณะประจำพันธุ์ เช่น สีขาวซีด สีเหลืองอ่อน สีเหลืองเข้ม และสีแดง เป็นต้น ส่วนกลิ่นแตกต่างกันไปตามชนิดสายพันธุ์ซึ่งส่วนใหญ่มีกลิ่นแรง โดยงานวิจัยของ Teh *et al.* (2017) พบว่ากลิ่นของทุเรียนเกิดมาจากสารประกอบสองกลุ่ม คือสารประกอบซัลเฟอร์ระเหยง่ายหรือกำมะถันทำให้เกิดกลิ่นฉุน เช่น thiols, disulfides และ trisulfides เป็นต้น และสารกลุ่มเอสเทอร์ที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมหวานเหมือนผลไม้ทั่วไป เช่น ethyl, acetate และ amyl acetate เป็นต้น การพัฒนาของผลใช้เวลาประมาณ 90 ถึง 150 วันหลังดอกบาน โดยลักษณะใบ ช่อดอก และผลของทุเรียน แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ใบ ช่อดอก และผลของทุเรียน
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Nakasone and Paull, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับทุเรียนมีการปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อนชื้นโดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย พม่า อินเดีย และศรีลังกา เป็นต้น ในประเทศไทยมีการปลูกเกือบทุกภาค ภาคเหนือ เช่น อุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น นครพนม ภาคกลาง เช่น นนทบุรี อโยธยา ลพบุรี และสระบุรี ส่วนภาคตะวันออกและภาคใต้มีการปลูกทุเรียนมากที่สุด จังหวัดที่สำคัญของภาคตะวันออก ได้แก่ จันทบุรี ระยอง ปราจีนบุรี และตราด ภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง และนราธิวาส แสดงดังรูปที่ 2.3 จากสถิติการปลูกทุเรียนในประเทศไทยพบว่า ภาคตะวันออกเป็นแหล่งผลิตทุเรียนที่สำคัญ ผลผลิตจะออกในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน ส่วนภาคใต้ผลผลิตจะออกในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคมของทุกปี (พิจิตร, 2542)



รูปที่ 2.3 แหล่งเพาะปลูกทุเรียนในประเทศไทย
(ที่มา: <http://www.durianmap.pdf>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทุเรียนแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันในด้านรูปทรงของต้น ขนาด ใบ ปลายใบ ฐานใบ ทรงผล และหนาม (ทรงพล, 2551) จากการศึกษาของหิรัญ และคณะ (2546) ได้จัดจำแนกและรวบรวมสายพันธุ์ทุเรียนในประเทศไทยจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกบ กลุ่มลวง กลุ่มก้านยาว กลุ่มกำป็น กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด ต่อมาสำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ (2544) ของกรมวิชาการเกษตรได้มีการศึกษาเพิ่มเติมและกำหนดแนวทางในการจัดจำแนกพันธุ์ทุเรียนอย่างเป็นระบบ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบ ปลายใบ ฐานใบ ทรงผล และหนาม ซึ่งเป็นลักษณะที่ค่อนข้างคงที่ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ทุเรียน สามารถแบ่งทุเรียนจำนวน 172 สายพันธุ์ได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

2.1.2.1 กลุ่มกบ จำนวน 46 สายพันธุ์ ได้แก่ กบแม่เต่า กบเล็บเหยี่ยว กบตาขำ กบพิกุล กบวัดกล้วย กบชายน้ำ กบสาวน้อย (กบก้านสั้น) กบสุวรรณ กบเจ้าคุณ กบตาท่อม (กบดำ) กบตาปูน กบหน้าศาล กบจำปา (กบแข่งสิงห์) กบเบา กบรัศมี กบตาให้ กบตาแจ่ม กบทองคำ กบสีนาค กบทองก้อน กบไว กบงู กบตาเต่า กบชมพู กบพลเทพ กบพวง กบวัดเพลง กบก้านเหลือง กบตานวล กบตามาก กบทองเพ็ง กบราช-เนตร กบแก้ว กบตานุช กบตามิตร กลีบสมุทร กบตาแมน การะเกด กบช่อนกลิ้ง กบตาเป็น กบทองดี กบธีระ กบมังกร กบลำเจียก กบหลังวิหาร และกบหัวล้าน

2.1.2.2 กลุ่มลวง จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ ลวงทอง ลวงมะรุ้ม ชะนี ชะนีกิ่งม่วง ชมพูศรี ย่ามะหวาด สายหยุด ชะนีก้านยาว ชะนีน้ำตาลทราย มดแดง และสีเทา

2.1.2.3 กลุ่มก้านยาว จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ ก้านยาว ก้านยาววัดสัก (เหลืองประเสริฐ) ก้านยาวสีนาค ก้านยาวพวง ก้านยาวใบด่าง ทองสุก ชมพูบาน และต้นใหญ่

2.1.2.4 กลุ่มกำป็น จำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ กำป็นเดิม (กำป็นขาว) กำป็นเหลือง (เจ้ากรม) กำป็นแดง กำป็นตาแพ กำป็นพวง ชายมะไฟ ปิ่นทอง เม็ดในกำป็น เหรา หมอนเดิม หมอนทอง กำป็นบางสีทอง และลุงเกตุ

2.1.2.5 กลุ่มทองย้อย จำนวน 14 สายพันธุ์ ได้แก่ ทองย้อยเดิม ทองย้อยฉัตร ฉัตร ฉัตรสีนาค ฉัตรสีทอง พวงฉัตร ทองใหม่ นมสวรรค์ ทับทิม ธรณีไหว นกหยิบ แดงรัศมี อีอึ้ง และอีทุย

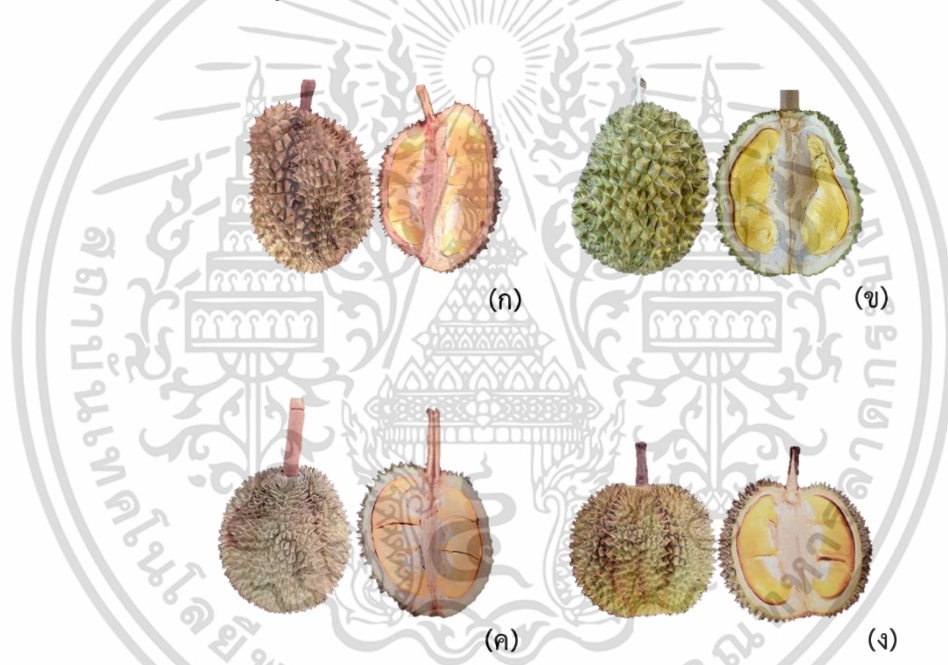
2.1.2.6 กลุ่มเบ็ดเตล็ด จำนวน 80 สายพันธุ์ ได้แก่ กะเทยเนื้อขาว กระจุดทอง กระจุกทอง (กระจุกทองดี) ขุนทอง แดงข้างเขียน แดงสาวน้อย ตะโก (ทองแดง) ทองคำตาพรวด นกกระจิบ เป็ดถอบ พวงมณี ยินดี สีไพร หางสิงห์ อินทรชิต อัยักษ์ ทองนพคุณ นมสด พักข้าว เม็ดในกระจุด เมล็ดผสม เมล็ดสม ลวงเพาะเมล็ด สาเก หมอนละอองฟ้า เหมราช ไร่เม่น กะเทยเนื้อแดง กระจุดสีนาค ก้อนทอง จอกลอย แดงตาน้อยดาวกระจาย ตุ่มทอง ทองม่วง บาททองคำ (อีบาท) ฝอยทอง เม็ดในยายปราง ไร่ใหม่ สาวชมเห็ด เหยี่ยวทอง อีลา อีหนัก ทองหยอด เนื้อหนา พื้นเมืองเกาะช้าง เม็ดในก้านยาว เมล็ดฝอย เมล็ดอารีย์ ลุงไหล สาวใหญ่ หลงลับแล เหลืองทอง กะเทยข้าวสั้น กะเทยเนื้อเหลือง กระจุดทอง เขียวตำลึง ชายม้งคุด แดงตาเผื่อน ตะพานน้ำ ทศพิณ ทองคำ บางขุนนนท์ พวงมาลัย เม็ดในบางขุนนนท์ สีทอง สาวชมพักทอง (พักทอง) ไร่ไข่ อีลืบ ตอสามเส้า ทองหยิบ โบราณ มะนาว เม็ดในลวง เมล็ดลับแล ย่อมแม่หวาด ลูกหนัก หมอนข้าง หัวลูกไม่ถึงผิว และอีงอน ซึ่งสามารถสรุปลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ทุเรียนออกเป็น 6 กลุ่มได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกทุเรียน 6 กลุ่ม (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544)

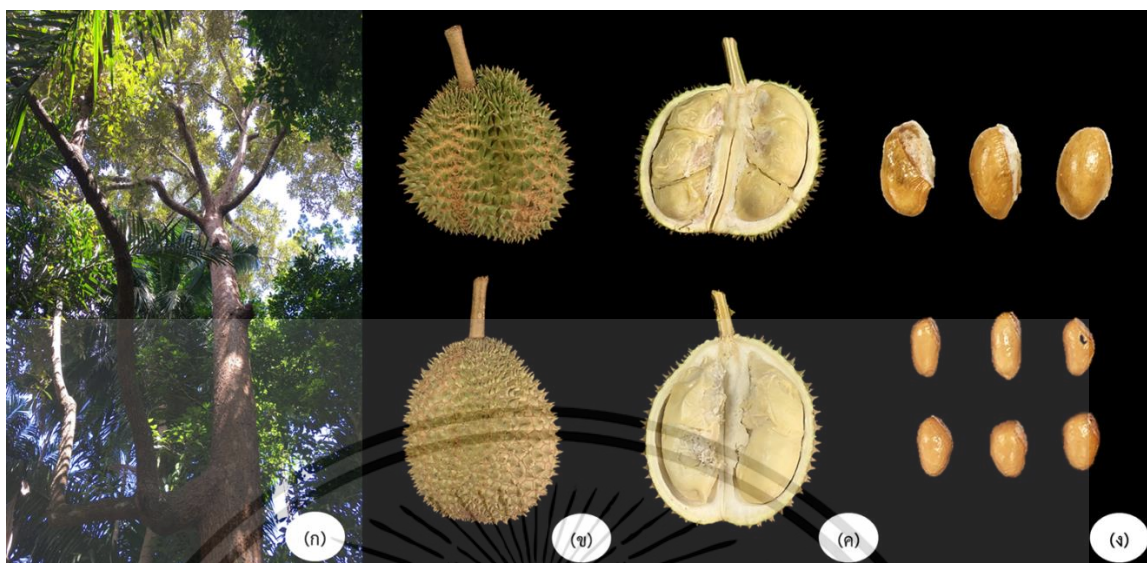
ลักษณะที่ใช้จัดจำแนก	กลุ่มกบ	กลุ่มลวง	กลุ่มก้านยาว	กลุ่มกำป็น	กลุ่มทองย้อย	กลุ่มเบ็ดเตล็ด
รูปร่างใบ (leaf shape)	รูปไข่ขอบขนาน (oval-oblong)	รูปไข่ขอบขนาน (oval-oblong)	ป้อมปลายใบ (obovate-lanceolate)	ยาวเรียว (linear-oblong)	ป้อมปลายใบ (obovate-lanceolate)	ป้อมกลางใบ (elliptical) รูปไข่ขอบขนาน (oval-oblong)
ปลายใบ (leaf apex)	เรียวโค้งแหลม (acuminate-curve)	แหลมเรียว (acuminate-acute)	เรียวแหลม (acuminate)	ยาวปลายแหลม (caudate-acuminate)	เรียวแหลม (acuminate)	แหลมเรียว (acuminate-acute) ยาวปลายแหลม (caudate-acuminate)
ฐานใบ (leaf base)	กลมมน (rounded-obtuse)	แหลม (acute) มน (obtuse)	เรียว (cuneate-acute)	แหลม (acute)	มน (obtuse)	มน (obtuse) แหลม (acute)
ทรงผล (fruit shape)	กลมรี (oval) กลม (rounded) กลมแบน (oblate)	ทรงกระบอก (cylindroidal) รูปรี (elliptic)	กลม (rounded) รูปไข่กลับ (obovate)	ขอบขนาน (oblong)	รูปไข่ (ovate)	กลมแบน (oblate) กลมรี (oval) ทรงกระบอก (cylindroidal)
หนามผล (fruit spine shape)	โค้งงอ (hooked)	เว้า (concave)	นูน (convex)	แหลม (pointed)	นูนปลายแหลม (pointed-convex)	เว้าปลายแหลม (pointed-concave) นูนปลายแหลม (pointed-convex)
จำนวนสายพันธุ์	46	11	8	13	14	80

2.1.3 สายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองหรือทุเรียนบ้าน

ทุเรียนในประเทศไทยทั่วไปมีอยู่ 2 ประเภท คือทุเรียนพันธุ์เป็นที่รู้จักกันดี เช่น สายพันธุ์หมอนทอง สายพันธุ์ชะนี สายพันธุ์ก้านยาว และสายพันธุ์กระดุมทอง เป็นต้น จัดเป็นทุเรียนสายพันธุ์เศรษฐกิจ เพราะนิยมปลูกเป็นการค้าเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออก (ทิริญ และคณะ, 2546) แสดงดังรูปที่ 2.4ก-ง ส่วนอีกประเภทหนึ่ง คือทุเรียนพื้นเมืองหรือที่เรียกกันว่าทุเรียนบ้าน (เรียนบ้าน) เป็นทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิมที่มีการปลูกมาเป็นระยะเวลาตามบ้าน (ฮูตา และคณะ, 2557) โดยส่วนใหญ่มีลักษณะที่โดดเด่น คือต้นมีขนาดสูง ลำต้นมีขนาดใหญ่ (รูปที่ 2.5ก) ผลทุเรียนบ้านมีขนาดเล็กกว่าทุเรียนพันธุ์ ลักษณะผิวและผลทุเรียนจะไม่เหมือนกัน (รูปที่ 2.5ข) เนื้อทุเรียนบ้านแต่ละต้นมีสีต่างกัน (รูปที่ 2.5ค) เมื่อเปรียบเทียบกับทุเรียนพันธุ์จะเห็นได้ชัดว่าทุเรียนบ้านมีเนื้อน้อยและบาง ส่วนรสชาติบางต้นออกขม บางต้นกลมกล่อม หวานละมุน รสชาติเนื้อทุเรียนบ้านจะมีความมันและมึกลื่นแรงกว่าทุเรียนพันธุ์ และเมล็ดมีขนาดใหญ่ (รูปที่ 2.5ง) (นารี, 2554)



รูปที่ 2.4 สายพันธุ์ทุเรียนที่นิยมปลูก บริโภคภายในประเทศ และส่งออก ได้แก่ (ก) สายพันธุ์หมอนทอง (ข) สายพันธุ์ชะนี (ค) สายพันธุ์ก้านยาว และ (ง) สายพันธุ์กระดุมทอง (ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, 2547)



รูปที่ 2.5 (ก) ลักษณะต้น (ข) ทรงผล (ค) สีเนื้อ และ (ง) เมล็ดของทุเรียนบ้าน
(ที่มา: รูปถ่ายโดย สุภานัน สุขศิริ, 2559)

ในการศึกษาความหลากหลายและการรวบรวมพันธุ์ของทุเรียนบ้านมีความสำคัญในการนำข้อมูลมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากทุเรียนบ้านบางต้นมีคุณภาพและลักษณะพันธุ์ดี รสชาติอร่อย แต่ไม่เป็นที่รู้จักของผู้บริโภค การส่งเสริมทุเรียนบ้านจะทำให้เกษตรกรเห็นถึงคุณค่าการอนุรักษ์ทุเรียนบ้านให้เป็นเอกลักษณ์ประจำถิ่นที่สามารถสร้างมูลค่าและยกระดับให้เป็นทุเรียนเศรษฐกิจได้ในอนาคต ปัจจุบันทุเรียนบ้านเริ่มเป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคกันมากขึ้น เช่น สายพันธุ์สาทิคาพบในจังหวัดพังงา (รูปที่ 2.6ก-ข) สายพันธุ์กมลพบในจังหวัดภูเก็ต (รูปที่ 2.6ค-ง) สายพันธุ์หลงลับแลและหลินลับแลพบในจังหวัดอุตรดิตถ์ (รูปที่ 2.6จ-ฉ) ซึ่งเป็นทุเรียนบ้านที่มีลักษณะพันธุ์ดี และมีความโดดเด่นในรสชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ตัวอย่างสายพันธุ์ทุเรียนบ้านที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น (ก) สายพันธุ์สลิกา (ข) สายพันธุ์กมลา (ค) สายพันธุ์หลงลับแลและหลินลับแล (ที่มา: <http://www.manager.co.th>, www.nationtv.tv/main/content/social/378505468/, www.oknation.nationtv.tv/blog/sonorwut/2013/08/31/entry-1)

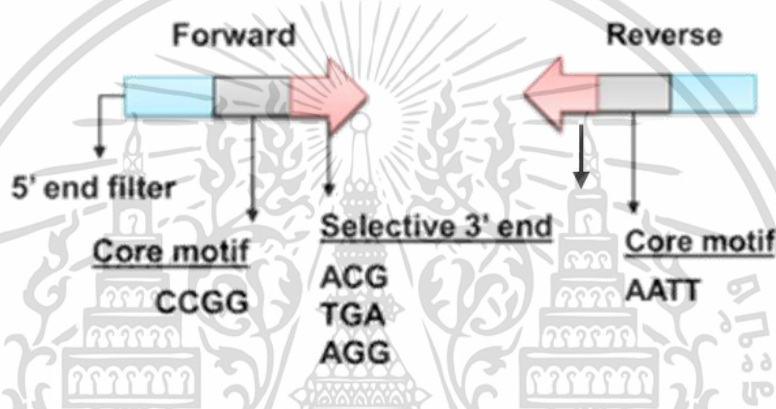
2.2 เครื่องหมายโมเลกุลในทุเรียน

2.2.1 เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Sequence-Related Amplified Polymorphism; SRAP)

เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลในการจัดจำแนก ศึกษา ลักษณะพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เครื่องหมายนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเครื่องหมายโมเลกุลจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วน open reading frame (ORF) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ Forward primer ที่มีขนาด 17 เบส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนแรกเป็นลำดับเบสหลัก (core motif) ขนาด 13 ถึง 14 เบส โดย 10 ถึง 11 เบสแรกทางด้านปลาย 5' เป็นลำดับเบสที่ไม่มีความจำเพาะ

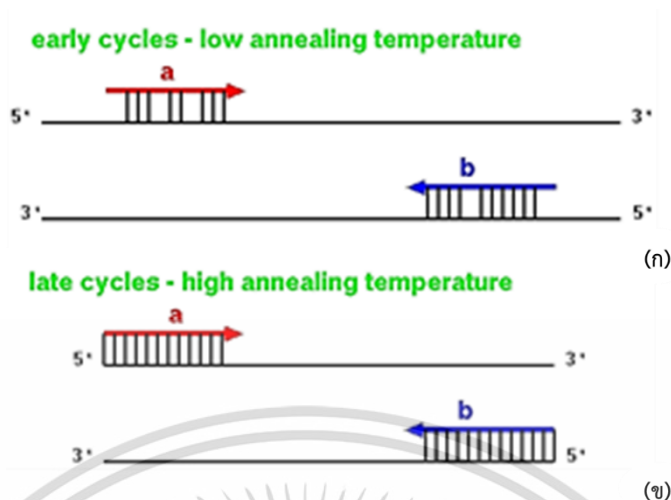
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียกว่า ลำดับเบสส่วนเติม (filter sequence) ตามด้วยลำดับเบสจำเพาะ คือ CCGG ของลำดับเบส Forward primer เพื่อให้จับได้กับส่วนเอ็กซอน (exon) หรือ ORF ซึ่งเป็นบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบส GC สูง (GC rich) ส่วนที่สอง คือลำดับเบสแบบคัดเลือก (selective sequence) จำนวน 3 เบสที่เปลี่ยนแปลงได้ทางด้านปลาย 3' และ Reverse primer มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยลำดับเบสหลักขนาด 15 เบส ซึ่ง 11 เบสแรกทางด้านปลาย 5' เป็นลำดับเบสที่ไม่มีความจำเพาะเรียกว่า ลำดับเบสส่วนเติม (filter sequence) ตามด้วยลำดับเบสจำเพาะ คือ AATT ของลำดับเบส Reverse primer เพื่อให้จับได้กับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณ AT rich ซึ่งพบมากในส่วนอินทอน (intron) และโปรโมเตอร์ของยีนตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือก (selective sequence) ที่เปลี่ยนแปลงได้อีก 3 เบส (Li and Quiros, 2001; Ferriol *et al.*, 2003) แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 องค์ประกอบของ Forward และ Reverse primer ของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (ที่มา: <http://www.plantmethods.com/content/figures/1746-4811-9-6-11.jpg>.)

สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้วิธี step up PCR คือใช้อุณหภูมิ annealing 2 รอบ โดยรอบแรกใช้อุณหภูมิต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส จำนวน 5 รอบ เรียกว่า early cycles ซึ่งไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายแบบไม่จำเพาะ หลังจากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้น หรือเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะ เรียกว่า late cycles ซึ่งทั้งอุณหภูมิและจำนวนรอบนั้นแตกต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Abedian *et al.*, 2012) แสดงดังรูปที่ 2.8 โดยเทคนิคนี้สามารถทำซ้ำแล้วให้ผลคงเดิม ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบส และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันด้วยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีที่มีความใกล้เคียงกับเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี แต่เทคนิคนี้ทำได้ง่าย และรวดเร็ว (Gulsen *et al.*, 2010)



รูปที่ 2.8 (ก) การเข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมายของคูไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะ และ (ข) แบบจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

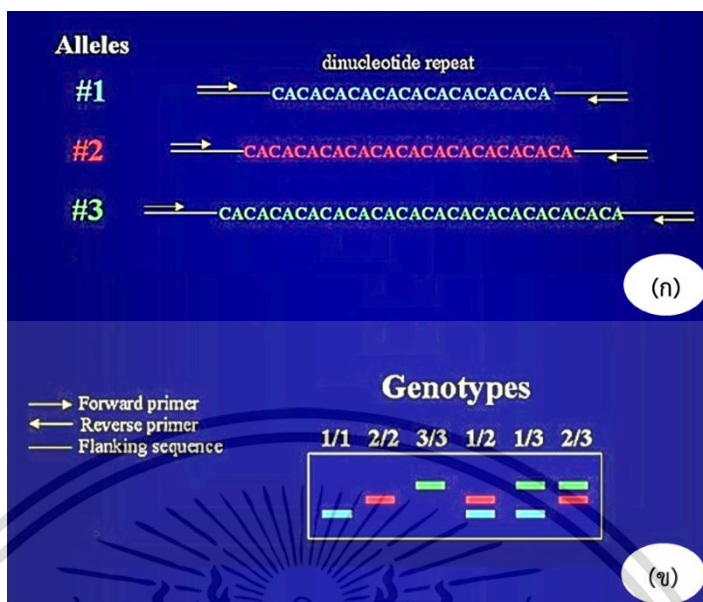
(ที่มา: <http://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT7690/lec08/lec08.2.html>.)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีศึกษาในทุเรียน แต่มีการศึกษาพันธุกรรมในพืชหลายชนิด ดังงานวิจัยของวาริน (2545) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางกราด (*Dipterocarpus intricatus*) ยางพลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.) และลูกผสมด้วยไพรเมอร์ 64 คูไพรเมอร์ พบว่ามี 25 คูไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.619 ถึง 0.893 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลาง พบว่าแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มตามชนิดของยาง ซึ่งยางลูกผสมถูกแยกกลุ่มและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับปณาลี และคณะ (2551) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ฟักทอง (*Cucurbita moschata*) จำนวน 13 สายพันธุ์ เป็นพันธุ์การค้า 11 สายพันธุ์และพันธุ์พื้นเมือง 2 สายพันธุ์ โดยมี 8 คูไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.425 ถึง 0.925 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง พบว่าสามารถจัดกลุ่มฟักทองได้ 3 กลุ่ม โดยฟักทองลูกผสมถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและแยกฟักทองพันธุ์พื้นเมืองออกจากกลุ่มอื่นๆ ได้ นอกจากนี้มีงานวิจัยของ Chaoguang *et al.* (2016) ที่วิเคราะห์พันธุกรรมของชบา (*Hibiscus dasycalyx*) และลูกผสมจำนวน 36 ตัวอย่าง มี 25 คูไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (% polymorphism) เท่ากับ 62.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.112 ถึง 0.783 พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งชบาลูกผสมถูกแยกออกจากกลุ่มอื่นๆ อย่างชัดเจนเช่นกัน โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนและบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี ดังนั้นเครื่องหมาย

โมเลกุลเอสอาร์เอพีจึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม และจัดจำแนกสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะเป็นลูกผสมได้

2.2.2 เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat; SSR)

เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์หรือไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) เป็นลำดับเบสที่มีการจัดเรียงลักษณะซ้ำๆ (repetitive DNA) ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบจำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอครั้งละ 1 ตำแหน่ง การเรียงลำดับเบสแบบซ้ำๆ แต่ละชุดประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 1 ถึง 6 เบส โดยซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A) n ซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA) n ซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA) n และซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA) n เป็นต้น ซึ่ง n คือจำนวนครั้งของเบสซ้ำ (Powell *et al.*, 1996) แสดงดังรูปที่ 2.9ก ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง มีการกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมแต่การกระจายตัวนั้นไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณพบมากบางบริเวณพบน้อยแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลท์อยู่บริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือที่เรียกว่า non-coding region ซึ่งจะมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่ขนานข้างกับเบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะของลำดับเบสสามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลได้โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบมาสามารถใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียวของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ (Ince *et al.*, 2010; Karaca *et al.*, 2005) ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในแต่ละสิ่งมีชีวิต (สมวงษ์, 2540) แสดงดังรูปที่ 2.9ข เครื่องหมายนี้มีคุณสมบัติแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) คือพันธุ์แท้ และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) คือพันธุ์ทางได้ ทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิมง่ายต่อการทดลอง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย (10 ถึง 50 ng/ μ l) และตรวจพบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ค่อนข้างสูง (Oliveira *et al.*, 2006) ถ้าพืชชนิดใดชนิดหนึ่งไม่เคยมีการศึกษามาก่อนจะต้องมีการศึกษาเบื้องต้น เพื่อให้ได้ไพรเมอร์มาใช้ในการศึกษาจึงมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน เสียเวลา และค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง นอกจากนี้หากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกัน การใช้เครื่องหมายนี้จะให้ข้อมูลที่ดีกว่าเครื่องหมายอื่นๆ (Zhang *et al.*, 2002)



รูปที่ 2.9 (ก) แสดงการจัดเรียงลำดับเบสแบบซ้ำๆ และการเข้าจับของชนิดไพรเมอร์ และ (ข) แสดงผลผลิตของขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แตกต่างกันของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

(ที่มา: http://www.cdfd.org.in/SILKSAT/img/ssr_diagram.png.)

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์มาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมกับพืชหลายชนิด ดังงานวิจัยของเบญจวรรณ และคณะ (2554) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยมี 17 คู่ไพรเมอร์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.54 ถึง 0.83 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม พบว่าสายพันธุ์ที่มาจากกรรมผสมข้ามพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเครื่องหมายนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างพืชที่เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์การค้าได้ และอรพินธุ์ (2559) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะม่วง (*Mangifera indica* L.) ในพื้นที่เดียวกันจำนวน 20 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ 20 คู่ พบว่ามีเพียง 3 คู่ไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.6 ถึง 1.0 ปรากฏความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแบ่งมะม่วงได้ 3 กลุ่ม พบว่าตัวอย่างสายพันธุ์ผสมแยกจากกลุ่มอื่นชัดเจน และผลการแบ่งกลุ่มสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมายนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการประเมินลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะม่วงเพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ได้นอกจากนี้ Meng *et al.* (2015) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสตรอว์เบอร์รี่ (*Fragaria ananassa* Duch.) ในแต่ละพื้นที่จำนวน 70 ตัวอย่าง จากประเทศทิเบต โดยใช้ไพรเมอร์ 19 คู่ พบว่ามี 10 คู่ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแตกต่าง และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.81 ถึง 0.98 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 6 กลุ่ม โดยพบว่าแต่ละกลุ่มที่แบ่งได้มีความสัมพันธ์กับแหล่งพื้นที่ เนื่องจาก การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของสตรอว์เบอร์รี่จึงทำให้ปรากฏความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำและ แต่ละพื้นที่มีพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน

สำหรับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจัดจำแนก ศึกษาความหลากหลาย รวมทั้งใช้ ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ทุเรียน มีรายงานในต่างประเทศในงานวิจัยของ Sales (2015) ที่พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายของทุเรียน (*Durio zibethinus*) จำนวน 187 ตัวอย่าง พบว่าสามารถพัฒนาได้ทั้งหมด 29 คู่ไพรเมอร์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.38 ถึง 0.86 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ที่ค่า 0.41 สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ จากงานวิจัยนี้สามารถนำคู่ไพรเมอร์ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความ แตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูงๆ มาใช้ในการประเมินความหลากหลาย คัดเลือกและจัดจำแนก สายพันธุ์ทุเรียนได้ต่อไป เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Satoso *et al.* (2017) ที่ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล เอสเอสอาร์ในทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr. cultv. Matahari) จำนวน 17 สายพันธุ์ พบว่าคัดเลือก ได้ 11 คู่ไพรเมอร์ และเมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (coefficient of gene differentiation; G_{ST} หรือ F_{ST}) เป็นค่าที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยค่า 0.00 ถึง 0.05 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ค่า 0.05 ถึง 0.15 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมปาน กลาง ค่า 0.15 ถึง 0.25 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก และค่า 0.25 ขึ้นไป แสดงถึงความ แตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด (Wright, 1978) จากงานวิจัยนี้ได้ค่า G_{ST} เท่ากับ 0.08 มีความแตกต่าง ทางพันธุกรรมที่ระดับปานกลาง แสดงให้เห็นว่าทุเรียนที่ใช้ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรม ค่อนข้างน้อย สำหรับประเทศไทยมีรายงานของปิยรัชฎ์ และคณะ (2552) ศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมของสายพันธุ์ทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีและสายพันธุ์ทุเรียนภาคใต้ที่ได้รวบรวม ไว้ที่ห้วยตะพานหินจังหวัดจันทบุรี ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์จำนวน 135 ตัวอย่าง โดยใช้ 6 คู่ ไพรเมอร์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.76 ถึง 1.00 มีความหลากหลายทาง พันธุกรรมสูง ที่ค่า 0.89 สามารถแบ่งทุเรียนได้ 7 กลุ่ม และ 1 ตัวอย่าง และพบว่าตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของตัวอย่าง สอดคล้องกับงานวิจัยของฮูตา และคณะ (2557) ที่ได้ วิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนบ้านทางภาคใต้จำนวน 67 ตัวอย่าง จากจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา และยะลา โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ด้วย 6 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความ แตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 85.71 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ค่า สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.52 ถึง 0.95 มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ค่อนข้างสูง โดยสามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนได้ 6 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

2.2.3 เครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรม การจัดจำแนกสายพันธุ์ และการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของทุเรียน เช่น เครื่องหมาย โมเลกุลอาร์เอฟดี เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี เป็นต้น

การศึกษาในต่างประเทศด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีในงานวิจัยของ Ruwaida *et al.* (2009) ได้ศึกษาความแปรปรวนของทุเรียนสายพันธุ์ซูกัน (*Durio zibethinus*) ใน 4 พื้นที่ที่ต่างกัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 81.89 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.46 ถึง 0.71 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แบ่งทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม โดยพบว่าทุเรียนในพื้นที่ที่มีการนำเมล็ดจากอีกแหล่งหนึ่งมาปลูกจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ส่วน Hariyati *et al.* (2013) ได้ศึกษาความหลากหลายของทุเรียน (*Durio zibethinus*) และทุเรียนที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง *D. kutejensis* และ *D. zibethinus* พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.77 ถึง 0.97 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ที่ค่า 0.58 สามารถแบ่งทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งทุเรียนที่มีการผสมข้ามพันธุ์บางตัวอย่างถูกแยกกลุ่มอย่างชัดเจน ในขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการผสมข้ามพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง *D. kutejensis* และ *D. zibethinus* ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Prihatini *et al.* (2016) ที่ศึกษาความหลากหลายในทุเรียน (*D. zibethinus* Murr.) ลูกผสม พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 98.2 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.14 ถึง 0.78 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแบ่งทุเรียนออกเป็น 5 กลุ่ม พบว่ากลุ่มที่ 5 เป็นทุเรียนลูกผสมที่มีความห่างทางพันธุกรรมกับทุเรียนปกติค่อนข้างสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mursyidin and Daryono (2016) ที่ศึกษาความหลากหลายของทุเรียน (*D. zibethinus* Murr.) จำนวน 11 สายพันธุ์ในกาลิมันตัน ประเทศอินโดนีเซีย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 82.17 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.63 ถึง 0.96 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งทุเรียนได้ 6 กลุ่ม โดยพบว่าสายพันธุ์ Enam-Hapat แยกออกจากกลุ่มอื่นและมีความห่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์อื่นๆ ค่อนข้างสูง ซึ่งสายพันธุ์นี้อาจเป็นลูกผสมที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นสายพันธุ์ใหม่ได้ในอนาคต และ Rosmaina *et al.* (2016) ได้ศึกษาความแปรปรวนของทุเรียน (*D. zibethinus* Murr.) จำนวน 7 สายพันธุ์ในเกาะกัมปาร์ ประเทศอินโดนีเซีย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 69.39 เปอร์เซ็นต์ ได้สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.28 ถึง 0.48 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งทุเรียนได้ 4 กลุ่ม พบว่าสายพันธุ์หมอนทองมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ Empu-Kunyit และ Ome-Kampar ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ได้ รวมถึงการศึกษาความหลากหลายของทุเรียนในประเทศไทยมีรายงานของ Vanijajiva (2011) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 14 สายพันธุ์ ในจังหวัดนนทบุรี พบว่าสามารถแบ่งทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มของสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและแยกออกจากกลุ่มสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน

สำหรับการรายงานในเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์มีงานวิจัยของ Riupassa *et al.* (2015) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียน (*D. tanjungpurensis*) ในประเทศอินโดนีเซียจำนวน 60 สายพันธุ์ จาก 6 กลุ่มประชากรในพื้นที่ต่างกัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.31 ถึง 1.0 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแบ่งทุเรียนได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ 3 กลุ่มย่อย ซึ่งแต่ละกลุ่มตัวอย่างค่อนข้างสัมพันธ์กับแหล่งพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง

และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากร มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มสูงกว่าระหว่างกลุ่มประชากรและมีค่า G_{ST} เท่ากับ 0.2308 ซึ่งเป็นค่าที่บอกความแตกต่างของพันธุกรรม พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ระดับสูง ซึ่งตัวอย่างในบางพื้นที่มีพันธุกรรมปะปนอยู่ในอีกพื้นที่หนึ่ง รวมถึงพันธุกรรมของพื้นที่หนึ่งไปเหมือนกับอีกพื้นที่หนึ่ง อาจกล่าวได้ว่าทุเรียนมีการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติจึงมีโอกาสที่ลักษณะพันธุกรรมคล้ายกันได้ และ Riupassa *et al.* (2016) ได้ศึกษาทุเรียน 3 สปีชีส์ (*D. zibethinus*, *D. kutejensis* และ *D. tanjungpurensis*) จำนวน 58 สายพันธุ์ ในประเทศอินโดนีเซีย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 98.0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.0 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแบ่งทุเรียนออกเป็น 3 กลุ่มตามสปีชีส์ ซึ่งกลุ่ม *D. zibethinus* เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายมากที่สุด และพบว่าสปีชีส์ *D. tanjungpurensis* มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *D. zibethinus* มากกว่าสปีชีส์ *D. kutejensis* และงานวิจัยของ Handayani *et al.* (2017) ที่ศึกษาความหลากหลายในทุเรียน (*D. kutejensis*) จำนวน 8 สายพันธุ์ ในประเทศอินโดนีเซีย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 91.30 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.34 ถึง 0.58 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งทุเรียน *D. kutejensis* ก็มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเช่นกัน เนื่องจากเป็นทุเรียนที่เกิดจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติหรือเป็นผลมาจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และมีการแพร่กระจายโดยใช้เมล็ดของทุเรียนนี้อย่างแพร่หลาย ในการศึกษาของประเทศไทย Vanijajiva (2012) ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทุเรียน จังหวัดนนทบุรีจำนวน 14 สายพันธุ์ สามารถแบ่งทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม โดยพบว่ากลุ่มทุเรียนสายพันธุ์กบจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและพบว่าทุเรียนสายพันธุ์ทองย้อยฉัตรและสายพันธุ์กำปันมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกัน

ส่วนการศึกษาในเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีมีรายงานในประเทศไทยของฐิตาภรณ์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาการจัดจำแนกและระบุสายพันธุ์ทุเรียน (*D. zibethinus*) จำนวน 130 สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 83.64 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.18 ถึง 0.89 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยที่ค่า 0.50 สามารถแบ่งทุเรียนได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งกลุ่มใหญ่แยกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มและบางสายพันธุ์ไม่มีการจับกลุ่มกัน ดังนั้นการทดลองในอนาคตอาจมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ เพื่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการคัดเลือกสายพันธุ์และยืนยันผลการศึกษา รวมถึงงานวิจัยของฤทัยชนก และคณพล (2554) ได้ตรวจสอบสายพันธุ์ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีจำนวน 45 สายพันธุ์ด้วย 8 คู่ไพรเมอร์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.22 ถึง 0.90 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยสามารถแบ่งทุเรียนได้ 7 กลุ่ม และพบว่ามีเพียง 3 กลุ่ม ที่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถนำเครื่องหมายเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ ประเมินลักษณะทางพันธุกรรม ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และตรวจสอบสายพันธุ์ทุเรียนที่เป็นลูกผสมอีกทั้งใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ทุเรียนในอนาคตต่อไปได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

เก็บตัวอย่างใบและผลทุเรียนจากบ้านของชาวบ้านในพื้นที่อำเภอปะทิวและอำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพรจำนวน 30 ตัวอย่าง โดยมีรหัสตัวอย่าง ชื่อเจ้าของและสถานที่ ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์ และอายุของทุเรียน ดังตารางที่ 3.1 และเก็บตัวอย่างใบจากแปลงปลูกที่รวบรวมไว้ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ศูนย์วิจัยพืชสวน จังหวัดจันทบุรีจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยมีรหัสตัวอย่างและชื่อสายพันธุ์ ดังตารางที่ 3.2 จากนั้นนำตัวอย่างใบและเนื้อทุเรียนเก็บใส่ถุงซิปล็อคไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำตัวอย่างใบมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและตัวอย่างเนื้อมาวิเคราะห์คุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ตารางที่ 3.1 รหัสตัวอย่าง ชื่อเจ้าของและสถานที่ ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์ และอายุของทุเรียนที่ใช้ในการศึกษาจากจังหวัดชุมพร

รหัสตัวอย่าง	ชื่อเจ้าของและสถานที่	ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์	อายุของทุเรียน
CH01	คุณสมบัติ ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	เนื้อสีส้ม หนามคล้ายชะนี	14 ปี
CH02	คุณสมบัติ ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	เนื้อสีเหลืองคล้ายหมอนทอง มันมากกว่าหวาน	14 ปี
CH03	คุณสมบัติ ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	เนื้อสีซีด หวาน หนามสวย	10 ปี
CH04	ป่าดี บางมาด ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	ใบคล้ายก้านยาว ลูกใหญ่ เนื้อมีความหวานไม่มาก มัน และเหนียว	10 ปี
CH05	คุณลุงสำเนียง ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	อร้อย กลิ่นไม่ฉุน เป็นก้านยาวเพาะเมล็ด	40 ปี
CH06	คุณสมบุรณ์ ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	เนื้อดี มีสีเหลือง	20 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) รหัสตัวอย่าง ชื่อเจ้าของและสถานที่ ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์ และอายุของทุเรียนที่ใช้ในการศึกษาจากจังหวัดชุมพร

รหัสตัวอย่าง	ชื่อเจ้าของและสถานที่	ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์	อายุของทุเรียน
CH08	คุณสมบุรณ์ ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	เส้นใยมาก สีเนื้อซีด มีกลิ่นแรง	-
CH09	คุณสมบุรณ์ ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	ผลขนาดเล็ก เนื้อเหลืองอ่อน อร่อย หวานและมัน	-
CH10	คุณวินัย ยินดี ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	สีเนื้อเหลืองคล้ายหมอนทอง เมล็ดใหญ่ อร่อย เนื้อหนา	-
CH11	คุณวินัย ยินดี ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	ลูกเล็ก เนื้อซีด	-
CH12	คุณวินัย ยินดี ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	กลิ่นน้อย เมล็ดใหญ่ เนื้อเนียน มัน อร่อย สีเหลืองนวลคล้าย น้ำนม	-
CH13	คุณประยูร เพชรศรี 1288 หมู่ 12 ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	ต้นสูงใหญ่ เนื้อสีเหลือง รสชาติอร่อย	30 ปี
CH14	คุณสุภา พรหมจันทร์ หมู่ 12 หมู่บ้านเขาวง ถ.ราษฎร์รังใจ ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ	ยืนต้นดี เส้นใยมาก ไม่ละ หวานมัน เมล็ดใหญ่	20 ปี
CH15	ป้าสวัสดิ์ ธรรมเสนา 55 ม.14 ต.ท่าข้าม หนองเรือ อ.ท่าแซะ	ลูกไม่ใหญ่ประมาณ 2 กิโลกรัม เนื้อสีเหลืองซีด แห้ง ไม่ละ รส หวาน กลิ่นไม่แรง	62 ปี
CH16	สวนคุณลุงพรสุข ม.5 ต.นากระตาม อ.ท่าแซะ	ต้นสูงใหญ่ ผลเล็ก เนื้อเหลืองซีด เนื้อน้อย และรสหวาน	40 ปี
CH17	ต้นทุเรียนบ้านข้างสถาบัน ต.ชุมโค อ.ปะทิว	ลูกเขียว ทรงกลม หนามแหลม รสมันออกขม กลิ่นดี สีเนื้อซีด เมล็ดใหญ่ เส้นใยมาก	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) รหัสตัวอย่าง ชื่อเจ้าของและสถานที่ ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์ และอายุของทุเรียนที่ใช้ในการศึกษาจากจังหวัดชุมพร

รหัสตัวอย่าง	ชื่อเจ้าของและสถานที่	ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์	อายุของทุเรียน
CH18	สวนบริเวณค่างแว่น ต.ชุมโค อ.ปะทิว	เนื้อเหลืองเข้ม	30 ปี
CH19	พี่อ้วน ต.ทะเลทรัพย์ อ.ปะทิว	เนื้อทุเรียนบ้านไม่เหลือง เมล็ดใหญ่	30 ปี
CH20	คุณสุนทร ทิพย์ภักดี ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	เนื้อเหลืองอ่อน	-
CH21	คุณสุนทร ทิพย์ภักดี ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	เนื้อเหลืองเข้ม	-
CH24	คุณโรจน์ พมหมขุนทอง 436 ม.9 ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ	เนื้อเหลืองเข้ม หวาน	-
CH26	คุณโรจน์ พมหมขุนทอง 436 ม.9 ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ	-	30 ปี
CH27	คุณโรจน์ พมหมขุนทอง 436 ม.9 ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ	เนื้อเหลือง หวานน้อย ชม	-
CH28	คุณโรจน์ พมหมขุนทอง 436 ม.9 ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ	ลักษณะเนื้อทุเรียนบ้าน เหลืองอ่อน หวานมัน เนื้อสัมผัสดี เมล็ดสมบูรณ์	-
CH30	คุณโรจน์ พมหมขุนทอง 436 ม.9 ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ	เนื้อเหลือง	-
CH37	ต้นทางเข้าบ้านป่าไผ่ ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ	ทุเรียนบ้านแท้ หวาน มัน อร่อย	20 ปี
CH38	คุณพีระภา ใจมาก ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ	เนื้อเหลือง เนื้อหนา หวาน รสดี	25 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) รหัสตัวอย่าง ชื่อเจ้าของและสถานที่ ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์ และอายุของทุเรียนที่ใช้ในการศึกษาจากจังหวัดชุมพร

รหัสตัวอย่าง	ชื่อเจ้าของและสถานที่	ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะสายพันธุ์	อายุของทุเรียน
CH39	บ้านยายหลบ 108 ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ	เนื้อมีสีเหลือง หวานมัน เป็นลูกเร็ว	20 ปี
CH40	คุณลุงสุทิน หมู่ 10 ต.สะพลี อ.ปะทิว	เนื้อสีเหลือง เนื้อน้อย รสหวานมาก	20 ปี
CH41	สวนพีเสนท์ หมู่ 6 ต.ชุมโค อ.ปะทิว	ต้นสูง รสหวาน เนื้อน้อย กลิ่นหอมแรง	25 ปี

ตารางที่ 3.2 รหัสตัวอย่าง และสายพันธุ์ทุเรียนที่ใช้ในการศึกษาจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี

รหัสตัวอย่าง	ชื่อสายพันธุ์	รหัสตัวอย่าง	ชื่อสายพันธุ์
DZ06	นมสวรรค์	DZ33	กบหน้าศาล
DZ07	กระปุกทองดี	DZ37	กบชายน้ำ
DZ18	กบวัดกล้วย	DZ39	นกหยิบ
DZ21	กบหลังวิหาร	DZ40	ต้นใหญ่กลางสวน (ไม่ทราบสายพันธุ์)
DZ24	ชಾಯมะไฟ	DZ42	ยินดี
DZ28	ทองย้อยเดิม	DZ44	ไอ้ใหม่
DZ29	ก้านยาวสีนาค	DZ45	ทูลถวาย
DZ30	ปิ่นทอง		

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 Autoclave
- 3.2.2 Centrifuge
- 3.2.3 Cooling box
- 3.2.4 Electrophoresis system (รุ่น Mupid-EXU)
- 3.2.5 Flask
- 3.2.6 Forceps
- 3.2.7 Gel documentation (รุ่น InGenius)
- 3.2.8 Heat block

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.9 Incubator
- 3.2.10 Micro centrifuge tube 0.2 and 1.5 ml
- 3.2.11 Micropipette
- 3.2.12 Micropipette tip
- 3.2.13 Microwave
- 3.2.14 Mortar and Pestle
- 3.2.15 Scissors
- 3.2.16 Spatula
- 3.2.17 Spin down
- 3.2.18 Thermal cycler (รุ่น Eppendorf Mastercycler® ep. Gradient S)
- 3.2.19 Vortex
- 3.2.20 Water bath

3.3 สารเคมีและสารละลาย

- 3.3.1 10X Standard *Taq* reaction buffer
- 3.3.2 10% CTAB
- 3.3.3 2X CTAB
- 3.3.4 50 bp DNA ladder, 100 bp DNA ladder and 1 bp DNA ladder (Vivantis, Malaysia)
- 3.3.5 6X gel loading dye blue
- 3.3.6 Agarose
- 3.3.7 Anthrone reagent
- 3.3.8 Boric acid
- 3.3.9 Chloroform
- 3.3.10 Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs)
- 3.3.11 Diethyl ether
- 3.3.12 Ethanol 70%, ethanol 95% และ absolute ethanol
- 3.3.13 Ethyl alcohol 95%
- 3.3.14 Ethidium bromide (EtBr)
- 3.3.15 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 3.3.16 Hydrochloric acid
- 3.3.17 Isoamyl alcohol
- 3.3.18 Isopropanol
- 3.3.19 liquid nitrogen
- 3.3.20 Magnesium chloride (MgCl₂)

- 3.3.21 β -mercaptoethanol
- 3.3.22 Petroleum ether
- 3.3.23 Perchloric acid
- 3.3.24 RNase A
- 3.3.25 Sodium hydroxide (NaOH)
- 3.3.26 SRAP primer (Li and Quiros, 2001) แสดงดังตารางที่ 3.3
- 3.3.27 SSR primer (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี; ปิยรัชฎ์ และคณะ, 2552) แสดงดังตารางที่ 3.4
- 3.3.28 Sulfuric acid
- 3.3.29 *Taq* DNA polymerase (BioLabs, England)
- 3.3.30 Tris-HCl

ตารางที่ 3.3 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

ชนิดไพรเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Forward primer	ME1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'
	ME2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
	ME3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'
	ME4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'
	ME5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'
Reverse primer	EM1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
	EM2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
	EM3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
	EM4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
	EM5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
	EM6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

ตารางที่ 3.4 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

ชื่อไพรเมอร์	ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
MS1CT-5	Forward primer	5'-CCT GCA AAA CCA AAC CAA AT-3'
	Reverse primer	5'-CAA AGG GAG TAT CCT TCC AG-3'
MS1CT-6	Forward primer	5'-TAA ACT GGC AAT GAA ACA GC-3'
	Reverse primer	5'-CCA AAC AGC TAA ACC CAT GA-3'
MS1CT-7	Forward primer	5'-CAT GGA CAA GAA AGC GAT GA-3'
	Reverse primer	5'-TGG ATC AGA TGA ATC AGG TTG-3'
MS1CT-9	Forward primer	5'-CCC TAC GTT ACA TGA TGA TCC A-3'
	Reverse primer	5'-CCA TTT TGC TCC CTT ACT CTT C-3'
MS1CT-11	Forward primer	5'-GCA CTT CCC TCT GTT TTT CG-3'
	Reverse primer	5'-ACT GGT GAT CTT TCG GCA AC-3'
MS1CT-12	Forward primer	5'-GAC GAC ACC AGC GAT CAA C-3'
	Reverse primer	5'-ATG GCG TCA TTT TGC TTT TC-3'
MS1CT-16	Forward primer	5'-TCC CCA GTT TTC GAC AGT CC-3'
	Reverse primer	5'-GAC GTC GTT TTG GAA GGG TA-3'
MS1GT-15	Forward primer	5'-CCA AAC AGC TAA ACC CAT G-3'
	Reverse primer	5'-TGC AAG AGA AGT TGT GTA TCT GG-3'
MS1GT-19	Forward primer	5'-TGA GTG GCG CAC TAA AAC AC-3'
	Reverse primer	5'-AGG TGT CTC AGC TGG TTT GC-3'
MS1GT-22	Forward primer	5'-ACC ATC AAC GGT CAA AGG TT-3
	Reverse primer	5'-TGT ACA GAA GCC AAA AGA AAA AC-3'
MS1GT-27	Forward primer	5'-CAA TGC TTC CAG GTT TCC AT-3'
	Reverse primer	5'-CCT GGC AGG GGG TTA TTT AT-3'
MS1GT-34	Forward primer	5'-CCC AAC CCT TCA CAC TCA TC-3'
	Reverse primer	5'-AAG GGT ACG AGC ACT GAT GG-3'
MS1AAC-2	Forward primer	5'-GAA AAA CTA AGC CCC CAA CC-3'
	Reverse primer	5'-ATG AAC ACC ACC ACC TCC A-3'

ตารางที่ 3.4 (ต่อ) ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

ชื่อไพรเมอร์	ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
MS1AAC-5	Forward primer	5'-AAT CCT TCA ACC CAC ACC AA-3'
	Reverse primer	5'-TTC TTT TCG CCA GAA ACA GC-3'
MS1AAC-19	Forward primer	5'-AGC CCA TTT GGT GCT GTA AT-3'
	Reverse primer	5'-AGC AAC CTC AGC CAT TGT TT-3'
MS1GAA-17	Forward primer	5'-AAC GAC ATC ATT TTG AGA GGG TA-3'
	Reverse primer	5'-CTG TCC AGT TTT CGG TGA GG-3'
MS1GAA-203	Forward primer	5'-GTG GAG GTT TGG TGA GGA AA-3'
	Reverse primer	5'-AAT GGA AGG CAT CGA TGA AG-3'
MS1CT-27	Forward primer	5'-CAA TGC TTC CAG GTT TCC AT-3'
	Reverse primer	5'-CCT GGC AGG TTA TTT AT-3'

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) โดยล้างทำความสะอาดใบให้เรียบร้อย นำมาลดขนาดด้วยการใช้กรรไกรตัดใบให้มีขนาดเล็ก แล้วบดต่อกับไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาผสมกับ 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโถงโดยการบดจนมีลักษณะเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน พันพาราฟิล์มที่ปากหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4 ถึง 5 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุกๆ 15 นาที เมื่อบ่มครบเวลาแล้วนำมาเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร โดยทำในตู้ดูดควันแล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 500 ถึง 600 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบเวลาแล้วนำมาเติม 10% CTAB ใน 0.7 M NaCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 400 ถึง 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่เย็นจัด โดยปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร (v/v) ของสารละลายส่วนใส กลับหลอดไปมา แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยแช่ข้ามคืน จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองลงบนกระดาษทิชชูเพื่อซึบสารละลายส่วนใสที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง กลับหลอดไปมา แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง กลับหลอดไปมา แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู เพื่อซึบสารละลายส่วนใสที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด เมื่อซึบสารละลายส่วนใสออกหมดแล้ว ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ที่บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด โดยบ่มไม่เกิน 1 คืน แล้วทำการเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อได้ดีเอ็นเอนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ คุณภาพ และวัดปริมาณของดีเอ็นเอ แสดงวิธีการในข้อ 3.4.2

3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ในการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ เทคนิค ออแกโรเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยซึ่ง ผงออแกโรสตามปริมาณที่คำนวณ เติมสารละลาย 1XTBE buffer ลงไปตามปริมาณที่ต้องการ เช่น ต้องการเจลออแกโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผงออแกโรส 0.4 กรัม เติม 1XTBE buffer 40 มิลลิลิตร แล้วทำการละลายโดยใช้ไมโครเวฟจนเห็นเป็นสารละลายเหลวใส ออแกโรสที่ได้จะมีความเข้มข้นตามต้องการ รอจนกว่าอุณหภูมิจะลดลง แล้วจึงทำการเทลงถาดเจล (gel tray) ที่มีหวี (combs) เพื่อทำให้เกิดหลุม สำหรับการหยอดดีเอ็นเอ เมื่อเจลแข็งตัวเรียบร้อยแล้ว นำไปใส่ลงใน chamber ที่ภายในมีสารละลาย TBE buffer และต่อเข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้าผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับสีย้อม (loading dye) ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดลงในหลุมเมื่อหยอด ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครบทุกหลุมแล้วทำการปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ เวลาประมาณ 30 ถึง 35 นาที เมื่อครบเวลาให้นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ระยะเวลาประมาณ 5 ถึง 10 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 ถึง 10 นาที เพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออก จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพโดยชุดถ่ายภาพเจล SYNGENE InGenius Bio Imaging ส่วนการ วัดปริมาณของดีเอ็นเอใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ ต้องการตรวจวัดปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 495 ไมโครลิตร (dilution factor เท่ากับ 100) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Eppendorf BioPhotometer™ วัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ μ l) หรือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μ g/ml) ซ้ำอีกครั้ง เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากสูตร ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

3.4.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในเบื้องต้นเพื่อหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด Forward มี 5 แบบ และ Reverse มี 6 แบบ (Li and Quiros, 2001) ดังตารางที่ 3.3 นำมาจับคู่กันเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่น Forward primer “ME1” จับคู่กับ Reverse primer “EM1” (ME1/EM1) หรือ Forward primer “ME2” จับคู่กับ Reverse primer “EM3” (ME2/EM3) เป็นต้น รวมทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ มาศึกษากับตัวอย่างดีเอ็นเอทุเรียน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์หมอนทอง สายพันธุ์ชะนี และสายพันธุ์กบสุวรรณ เพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและปรากฏความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ เมื่อได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างดีเอ็นเอทุเรียนทั้งหมด โดยการเจือจางดีเอ็นเอทุกตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เติมนสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบแสดงดังตารางที่ 3.5 ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Eppendorf Mastercycler® ep. Gradient S มีขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.6 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงดังวิธีการในข้อที่ 3.4.2 ใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ขนาด 100 คู่เบส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แสดงวิธีการในข้อ 3.4.5

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (ดัดแปลงจาก Zhang *et al.*, 2013)

สารเคมี	ความเข้มข้น		ปริมาตร (μ l)
	เริ่มต้น	สุดท้าย	
Standard <i>Taq</i> reaction buffer	10x	1X	2
dNTPs	1.25 mM	200 μ M	3.3
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	1
Forward primer	20 μ M	1 μ M	1
Reverse primer	20 μ M	1 μ M	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	5000 U/ml	1 U	0.2
DNA template	50 ng/ μ l	200 ng/ μ l	4
DI water	-	-	7.5
ปริมาตรรวม	-	-	20

ตารางที่ 3.6 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี (Abedian *et al.*, 2012)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวน (รอบ)
Initiation denaturation	94	3	1
Denaturation	94	1	
Annealing	35	1	5
Extension	72	1	
Denaturation	94	1	
Annealing	50	1	35
Extension	72	1	
Final extension	72	10	1

3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

สำหรับการศึกษาในเครื่องหมายโมเลกุลนี้ได้ใช้ชนิดไพรเมอร์ Forward และ Reverse จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี; ปิยรัชฎ์ และคณะ, 2552) นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างดีเอ็นเอทุเรียนทั้งหมด โดยทำการเจือจางดีเอ็นเอทุเรียนตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบ แสดงดังตารางที่ 3.7 ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Eppendorf Mastercycler® ep. Gradient S โดยมีขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.8 ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงดังวิธีการในข้อที่ 3.4.2 ใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ขนาด 100 คู่เบส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงวิธีการในข้อ 3.4.5

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (ปิรัชฎ์ และคณะ, 2552)

สารเคมี	ความเข้มข้น เริ่มต้น	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตร (μ l)
Standard <i>Taq</i> reaction buffer	10x	1X	1
dNTPs	1 mM	200 μ M	2
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.3
Forward primer	10 μ M	0.3 μ M	0.3
Reverse primer	10 μ M	0.3 μ M	0.3
<i>Taq</i> DNA polymerase	5000 U/ml	0.5 U	0.1
DNA template	10 ng/ μ l	20 ng/ μ l	2
DI water	-	-	4
ปริมาตรรวม	-	-	10

ตารางที่ 3.8 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (ปิรัชฎ์ และคณะ, 2552)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวน (รอบ)
Initiation denaturation	95	3	1
Denaturation	94	1	30
Annealing	55	1	
Extension	72	1.5	
Final extension	72	7	1

เมื่อได้ลักษณะแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ นำไฟล์ภาพมาเปิดด้วยโปรแกรม Microsoft PowerPoint 2013 โดยทำการปรับแต่งปริมาณแสงและความคมชัดของภาพ จากนั้นสร้างเป็นลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละตัวอย่าง เพื่อให้ได้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนที่ใช้ศึกษา

3.4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์

เมื่อได้แถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ทำการแปลผลโดยการให้คะแนนแบบ binary data matrix คือ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเท่ากับ 1 และหากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้คะแนนเท่ากับ 0 จากนั้นนำคะแนนที่ได้จากการนับมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี simple

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

matching (Sneath and Sokal, 1973) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11 (Rohlf, 2000) โดยใช้วิธี Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) แสดงผลในรูปของแผนภาพความสัมพันธ์ (dendrogram) และวิเคราะห์การกระจายตัวของกลุ่มประชากรด้วยโปรแกรม SPSSInc (Statistical Package for the Social Science for windows) version 17 (Nie *et al.*, 1970) แสดงผลในรูปการกระจายตัวของกลุ่มประชากร (Principle Coordinate Analysis; PCoA)

3.4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรม

นำข้อมูลที่ได้จากการให้คะแนนแบบ binary data matrix ในแต่ละเครื่องหมายโมเลกุล มาวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม เป็นการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากร (ค่า K) โดยใช้รูปแบบการจัดกลุ่มแบบเบย์ (bayesian) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE version 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007) คำนวณค่า K ตั้งแต่ 1 ถึง 10 จากนั้นวิเคราะห์ค่า K ต่อใน Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012) แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLUMPP (CLUster Matching and Permutation Program) version 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg, 2007) เพื่อหาค่า K ที่เหมาะสมของกลุ่มประชากร จากนั้นนำมาสร้างเป็นแผนภูมิแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (coefficient of gene differentiation; G_{ST} หรือ F_{ST}) เป็นค่าที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรของตัวอย่าง แสดงผลในรูปของ AMOVA (Analysis of Molecular Variance) โดย Wright (1978) ได้ให้ความหมายของค่า G_{ST} ไว้ว่า ค่าระหว่าง 0.00 ถึง 0.05 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ค่าระหว่าง 0.05 ถึง 0.15 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง ค่าระหว่าง 0.15 ถึง 0.25 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก และค่า 0.25 ขึ้นไป แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด

3.4.7 การเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของทุเรียน

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำการศึกษาในส่วนของผลทุเรียนที่เก็บจากอำเภอปะทิวและอำเภอท่าแซะจังหวัดชุมพร ลักษณะที่ทำการเก็บข้อมูล ได้แก่ รูปร่างทรงผล รูปร่างลักษณะปลายผล รูปร่างฐานผล รูปร่างหนาม สีเปลือกผล น้ำหนักผล ความยาวผล ความกว้างผล ความยาวก้านผล (ขั้ว) ความยาวหนาม ความหนาแน่นของหนาม ความหนาของเปลือกผล จำนวนพูที่มีลักษณะสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ น้ำหนักเปลือกผล สีเนื้อผล ลักษณะสัมผัสเนื้อผล ความฉ่ำในเนื้อผล เส้นใยในเนื้อผล ความมันเป็นครีม รสชาติความหวาน รสชาติความขม กลิ่นของเนื้อผล จำนวนเมล็ด น้ำหนักเมล็ด จำนวนเมล็ดที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ ความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด ความหนาของเมล็ด สีของเปลือกเมล็ด และรูปร่างเมล็ด (คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยลักษณะของแบบฟอร์มแสดงดังรูปที่ 3.1

Accession no. _____	วันที่ _____	ชื่อพันธุ์พืช/ผลไม้ _____
ประวัติที่สำรวจ _____	GPS coord. _____	
ผล (Fruit)		
รูปร่าง (Fruit shape)		
	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7	อื่นๆ <input type="checkbox"/>
รูปร่างของรอยบาก (Shape of fruit apex)		
	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	อื่นๆ <input type="checkbox"/>
รูปร่างฐาน (Shape of fruit base)		
	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7	อื่นๆ <input type="checkbox"/>
รูปร่างขน (Fruit spine shape)		
	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7	อื่นๆ <input type="checkbox"/>
สีเปลือก (Skin/peel color) 164 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D 152 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D	อื่นๆ _____	
น้ำหนักผล (Fruit weight) _____ g	ความยาวผล (Fruit length) _____ cm	ความกว้างผล (Fruit width) _____ cm
ความยาวก้าน (Stalk length) _____ cm	ความหนาของก้าน (Spine thickness) 1 _____ 2 _____ 3 _____ cm	ความหนาของรอยบาก (Fruit end thickness) 1 _____ 2 _____ 3 _____ cm
จำนวนขนที่ผิวผล (Spine density) _____ จำนวนขนที่ผิวผล (Spine density) _____		
เนื้อ (Flesh)		
น้ำหนักเนื้อ (Fruit and flesh weight) _____ g	สีเนื้อ (Flesh color) 8 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D 9 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D 14 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D	อื่นๆ _____
ลักษณะพื้นผิวเนื้อ (Flesh texture) ฟู (Soft) _____ 1 2 3 4 5 หนา (Hard)	ความฉ่ำในเนื้อ (Flesh juiciness) ไม้ฉ่ำ (non-juicy) _____ 1 2 3 4 5 ฉ่ำ (Juicy)	
มีใยในเนื้อ (Presence of fiber) ไม้มี (Absent) _____ 1 2 3 4 5 มี (High)	ความมันในเนื้อ (Flesh creaminess) ค่ำ (Poor) _____ 1 2 3 4 5 มาก (Strong)	
รสชาติของเนื้อ (Flesh taste) - ความหวาน (Sweetness) น้อย (Low) _____ 1 2 3 4 5 มาก (High)	- ความขม (Bitterness) น้อย (Low) _____ 1 2 3 4 5 มาก (High)	
กลิ่นของเนื้อ (Flesh aroma) เย็น (Mild) _____ 1 2 3 4 5 เข้ม (Strong)		
เมล็ด (Seed)		
จำนวนเมล็ดทั้งหมด (Total seeds) _____ เมล็ด	น้ำหนักเมล็ด (Seed weight) _____ g	
จำนวนเมล็ดที่งอก (Viable seeds) _____ เมล็ด	จำนวนเมล็ดที่ไม่สามารถงอก (Non-viable seeds) _____ เมล็ด	
ความยาวของเมล็ด (Seed length) 3-5 เมล็ด _____ cm	ความกว้างของเมล็ด (Seed width) 3-5 เมล็ด _____ cm	ความหนาของเมล็ด (Seed thickness) 3-5 เมล็ด _____ cm
สีของเปลือกเมล็ด (Seed coat color) 164 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D 165 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D 166 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D 167 <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D	อื่นๆ _____	
รูปร่างเมล็ด (Seed shape)		
	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5	อื่นๆ <input type="checkbox"/>

รูปที่ 3.1 แบบฟอร์มการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ที่มา: คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.4.8 การวิเคราะห์คุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ในการศึกษาคุณภาพผลทำการนำเนื้อทุเรียนในแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณ Total soluble solids ปริมาณแป้ง ปริมาณเส้นใย ปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophyll; Chl) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid)

การวิเคราะห์หาปริมาณ Total soluble solids โดยผสมเนื้อทุเรียนกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณ total soluble solids ด้วยเครื่อง pocket refractometer (Atago PAL-1, Japan) สามารถคำนวณได้จากสมการ Total soluble solids = (%Brix) x 4

การวิเคราะห์หาปริมาณแป้ง โดยผสม 80% เอทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับตัวอย่างทุเรียน 1 กรัมในหลอดทดลอง แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส รอจนเอทานอลระเหยหมด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร และกรด perchloric ปริมาตร 5.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ anthrone reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงหลอดทดลอง (anthrone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reagent = ละลาย anthrone 200 มิลลิกรัม ใน 95% sulphuric acid เย็น 100 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วทำให้เย็นด้วยการนำหลอดทดลองที่มีสารละลายใส่ในอ่างน้ำแข็ง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เตรียม stock glucose ด้วยการผสมกลูโคส 100 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียม working standard ด้วยการนำ stock glucose 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำ standard curve ด้วยการเตรียม working standard ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ทำกราฟ standard curve โดยกำหนดให้แกน x คือ ความเข้มข้นของ working standard และแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสง คำนวณหาปริมาณแป้งได้จากสมการ ปริมาณแป้ง = ปริมาณกลูโคส x dilution factor x 0.9

การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย นำเนื้อทุเรียนไปอบจนแห้ง หลังจากนั้นบดตัวอย่างแห้งให้ได้ปริมาณ 1 กรัม เติม 95% ethyl alcohol และ 1% hydrochloric acid อย่างละ 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษให้เหลือแต่ตัวอย่าง เติม 95% ethyl alcohol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร diethyl ether และ petroleum ether อย่างละ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและกรองให้เหลือแต่ตัวอย่างอีกครั้ง เติม 1.25% sulfuric acid ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และนำไปต้มน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกรวยบุชเนอร์จนกว่าน้ำที่ผ่านการกรองจะเป็นกลาง (กรองด้วยน้ำประมาณ 300 มิลลิลิตร) เติม 1.25% NaOH ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และนำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกรวยบุชเนอร์จนกว่าน้ำที่ผ่านการกรองจะเป็นกลาง (กรองด้วยน้ำประมาณ 300 มิลลิลิตร) ล้างตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วย 1% hydrochloric acid โดยการหยดกรดปริมาณเล็กน้อยลงบนตัวอย่าง กรองด้วยกรวยบุชเนอร์จนกว่าน้ำที่ผ่านการกรองจะเป็นกลาง (กรองด้วยน้ำประมาณ 300 มิลลิลิตร) ล้างด้วย 95% เอทานอล 2 รอบ โดยการหยดเอทานอลลงบนตัวอย่างให้ทั่ว และรอจนเอทานอลระเหย นำตัวอย่างไปอบเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างหลังจากอบ และคำนวณปริมาณเส้นใยจากสมการ ปริมาณเส้นใย (%) = (น้ำหนักแห้งของกาก/น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นปราศจากน้ำ) x 100

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ (chlorophyll; Chl) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) โดยนำไนโตรเจนเหลวใส่ในเนื้อทุเรียน 5 กรัม หลังจากเนื้อทุเรียนแข็งจึงนำไปบดให้ละเอียดและเก็บไว้ในหลอดแก้ว เติม 95.5% acetone ปริมาตร 15 มิลลิลิตรลงหลอดแก้วและผสมให้เข้ากันปิดหลอดแก้วด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหย จากนั้นจึงนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากเก็บไว้ในที่มืดแล้วจึงดูดส่วนใสในหลอดทดลองเพื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 645 และ 662 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV visible spectrophotometer คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Cx+c), คลอโรฟิลล์ เอ (Chl a) และคลอโรฟิลล์ บี (Chl b) จากสมการ $[Chl\ a] = 9.784D_{662} - 0.99D_{645}$, $[Chl\ b] = 21.42D_{645} - 4.65D_{662}$ และ $[Cx+c] = 1000D_{470} - 1.90[Chl\ a] - 63.14[Chl\ b]/214$

3.4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยใช้โปรแกรม R studio

นำข้อมูลที่ได้จากการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนของผล เช่น ความหนาแน่นของหนาม ความยาวหนาม และความหนาของเปลือก และข้อมูลคุณภาพผล เช่น ปริมาณ Total soluble solids ปริมาณแป้ง และปริมาณเส้นใย เป็นต้น มาใช้ในการจัดกลุ่มโดยการนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R studio (Pruiim, 2011) เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับประมวลผลทางสถิติและกราฟิก ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกคุณลักษณะที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการได้ต่อไป



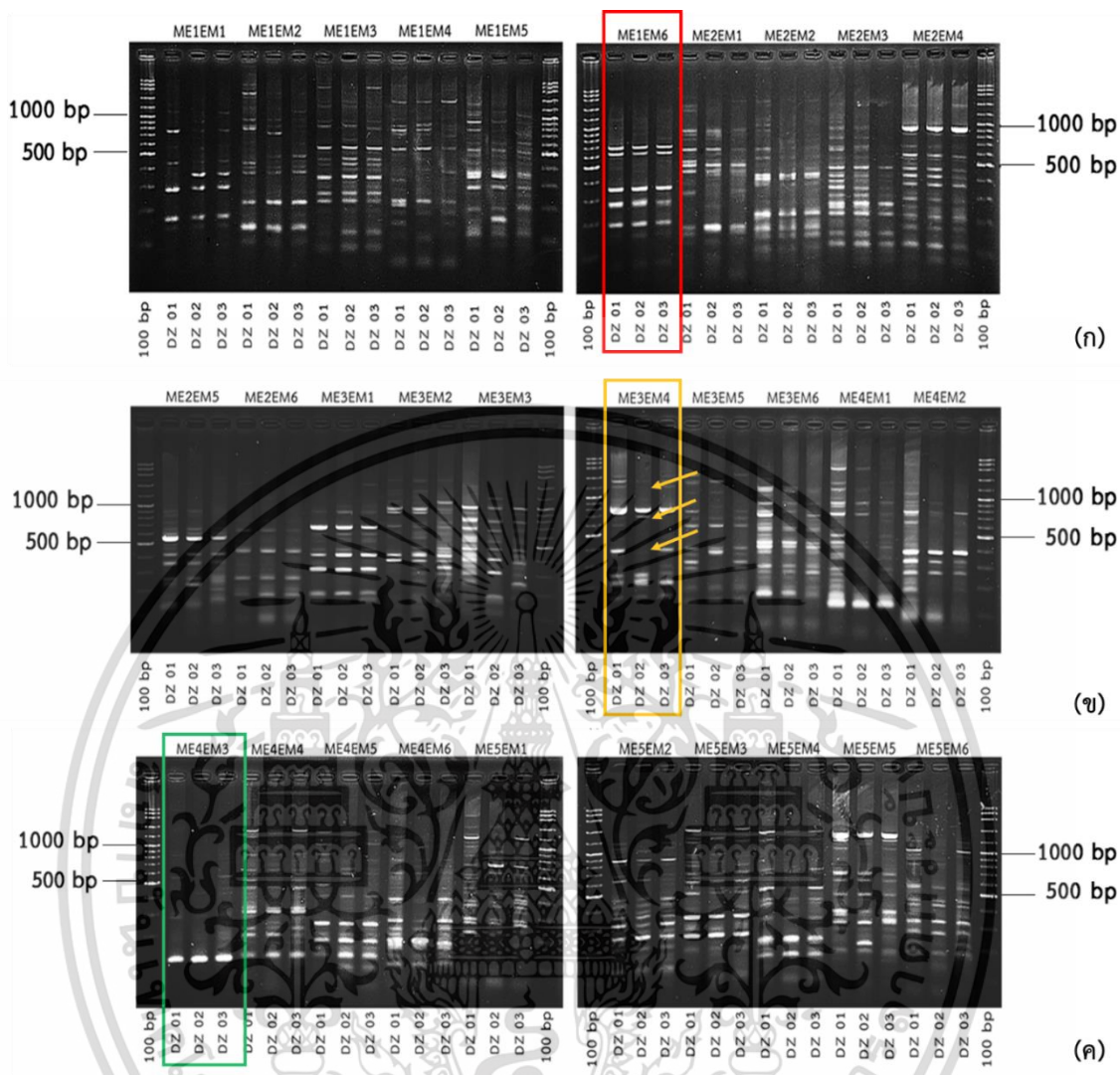
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟ

4.1.1 ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาและคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟสำหรับการจัดจำแนกกลุ่มทุเรียน โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในทุเรียน 3 สายพันธุ์ คือหมอนทอง (DZ01) ชะนี (DZ02) และกบสุวรรณ (DZ03) เนื่องจากทั้ง 3 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจน โดยสายพันธุ์หมอนทองจัดอยู่ในกลุ่มกำป็น สายพันธุ์ชะนีจัดอยู่ในกลุ่มลวง และสายพันธุ์กบสุวรรณจัดอยู่ในกลุ่มกบ (หิรัญ และคณะ, 2546) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายลักษณะ เช่น คู่ไพรเมอร์ ME1/EM6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) ในทุกตัวอย่าง (รูปที่ 4.1ก) ซึ่งจะไม่นำไปใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มทุเรียน คู่ไพรเมอร์ ME3/EM4 แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งขนาดขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส โดย DZ02 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในขณะที่ตำแหน่งขนาดขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบส มีเพียง DZ02 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และตำแหน่งขนาดขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 1200 คู่เบส DZ01 และ DZ03 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (รูปที่ 4.1ข) รวมทั้งคู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน (รูปที่ 4.1ค) ดังนั้นจึงมี 13 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ME1/EM1, ME1/EM4, ME2/EM1, ME3/EM3, ME3/EM4, ME3/EM5, ME3/EM6, ME4/EM2, ME4/EM5, ME5/EM1, ME5/EM2, ME5/EM3 และ ME5/EM5 ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน มีจำนวนแถบดีเอ็นเอไม่น้อยหรือมากเกินไป มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความเข้ม สามารถแยกและนับจำนวนแถบดีเอ็นเอได้ รวมทั้งให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) ในแต่ละตำแหน่ง โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 149 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 61 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (% polymorphism) เท่ากับ 40.94 เปอร์เซ็นต์ (ณัฐกุล และคณะ, 2559) จะเห็นได้ว่าการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ในครั้งนี้ได้ศึกษากับทุเรียน 3 ตัวอย่าง ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าน้อยกว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการนำ 13 คู่ไพรเมอร์จากการคัดเลือกมาศึกษากับตัวอย่างทุเรียนจากชุมพรและจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี จำนวน 45 ตัวอย่าง ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่าง รวมทั้งการคัดเลือกความแตกต่างของตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นสิ่งสำคัญเช่นกัน



รูปที่ 4.1 แถบดีเอ็นเอของทุเรียนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี จำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (จากซ้ายไปขวา: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และตัวอย่างทุเรียน 3 สายพันธุ์ คือ DZ01, DZ02 และ DZ03) โดย (ก) คู่ไพรเมอร์ ME1/EM6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (ข) คู่ไพรเมอร์ ME3/EM4 แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ และ (ค) คู่ไพรเมอร์ ME4/EM3 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน

4.1.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

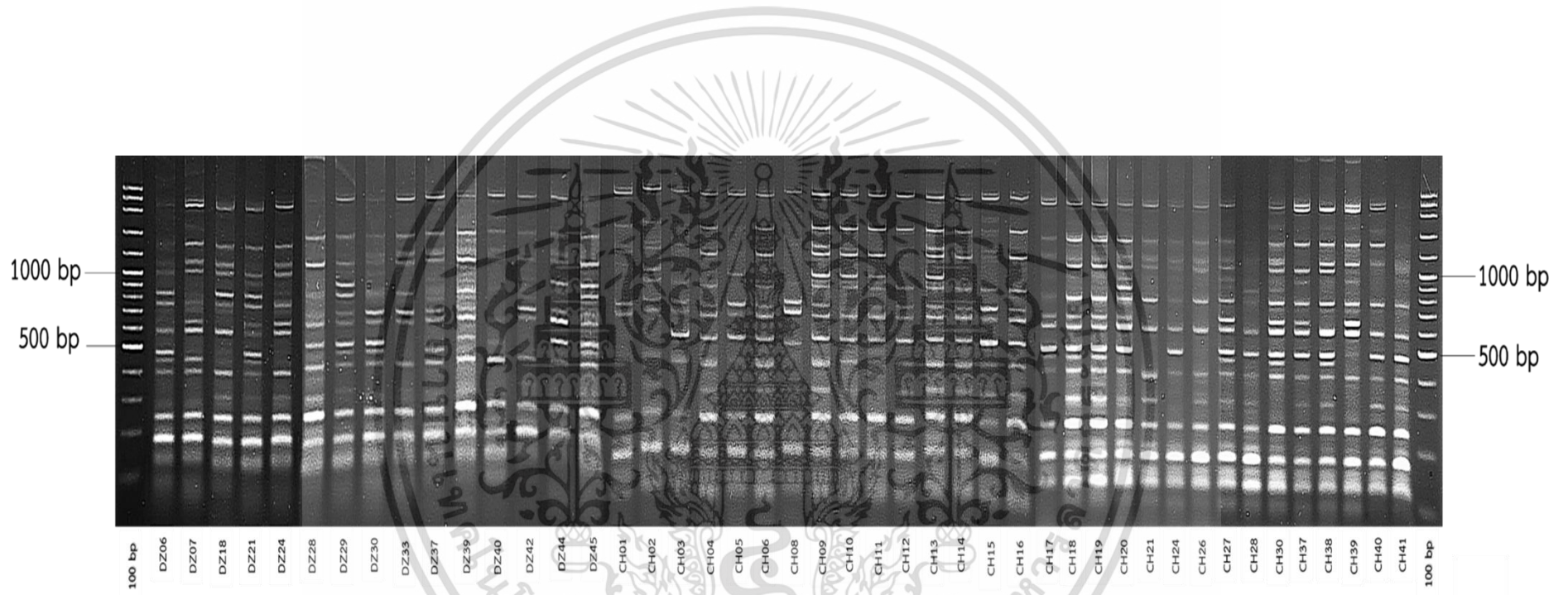
จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีในทุเรียน 45 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพร (CH) จำนวน 30 ตัวอย่าง และจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี (DZ) จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ โดยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่นำมาศึกษาถูกจัดอยู่ใน 5 กลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (หิรัญ และคณะ, 2546) ได้แก่ กลุ่มกบ (DZ18, DZ21, DZ33 และ DZ37) กลุ่มก้านยาว (DZ29) กลุ่มกำป็น (DZ24 และ DZ30) กลุ่มทองย้อย (DZ06, DZ28 และ DZ39) กลุ่มเบ็ดเตล็ด (DZ06, DZ42, DZ44 และ DZ45) และมี 1 ตัวอย่างที่ไม่ทราบสายพันธุ์ (DZ40) โดยนำมาศึกษาด้วย 13 คู่ไพรเมอร์ที่ได้จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงตัวอย่างในคู่ไพรเมอร์ ME4/EM5 ดังรูปที่ 4.2 พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน ปรากฏขนาดแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 125 ถึง 2500 คู่เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 209 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 16.10 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 138 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 65.62 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ไพรเมอร์ ME4/EM5 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 20 แถบ ส่วนคู่ไพรเมอร์ ME4/EM2 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 10 แถบ และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันมากที่สุด คือ ME4/EM5 มีจำนวน 16 แถบ คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันน้อยที่สุด คือ ME4/EM2 มีจำนวน 5 แถบ คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.1 โดยคู่ไพรเมอร์ที่แสดงเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนและบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี (Chaoguang *et al.*, 2016) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 13 คู่ไพรเมอร์นี้มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนได้เช่นกัน

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี มีรายงานของ Thinhuatoy *et al.* (2016) ที่ได้ศึกษาตัวอย่างทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีจำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 234 แถบ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 182 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 77.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าสูงกว่างานวิจัยครั้งนี้ คือ 65.62 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีเป็นแหล่งที่มีการรวบรวมสายพันธุ์ทุเรียนทั่วประเทศ จึงทำให้เกิดความหลากหลายหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง รวมทั้งงานวิจัยครั้งนี้ได้นำตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีมาศึกษาเพียง 15 ตัวอย่าง จึงทำให้ค่าที่ได้มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.1 ชนิดของไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

ชนิดของ ไพรเมอร์	ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	เปอร์เซ็นต์ polymorphism
ME1/EM1	175-1400	15	10	66.67
ME1/EM4	125-1300	18	14	77.78
ME2/EM1	200-1800	14	9	64.28
ME3/EM3	250-1200	16	11	68.75
ME3/EM4	200-1500	15	9	60.00
ME3/EM5	200-1600	18	11	61.11
ME3/EM6	175-1200	18	10	55.56
ME4/EM2	250-775	10	5	50.00
ME4/EM5	150-2500	20	16	80.00
ME5/EM1	200-1500	19	10	52.63
ME5/EM2	275-1150	13	10	76.92
ME5/EM3	250-1500	17	12	70.58
ME5/EM5	200-1300	16	11	68.75
รวม	-	209	138	853.03
จำนวนเฉลี่ย	-	16.10	10.62	65.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีด้วยคูไพรเมอร์ ME4/EM5 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ในทุเรียนจำนวน 30 ตัวอย่าง

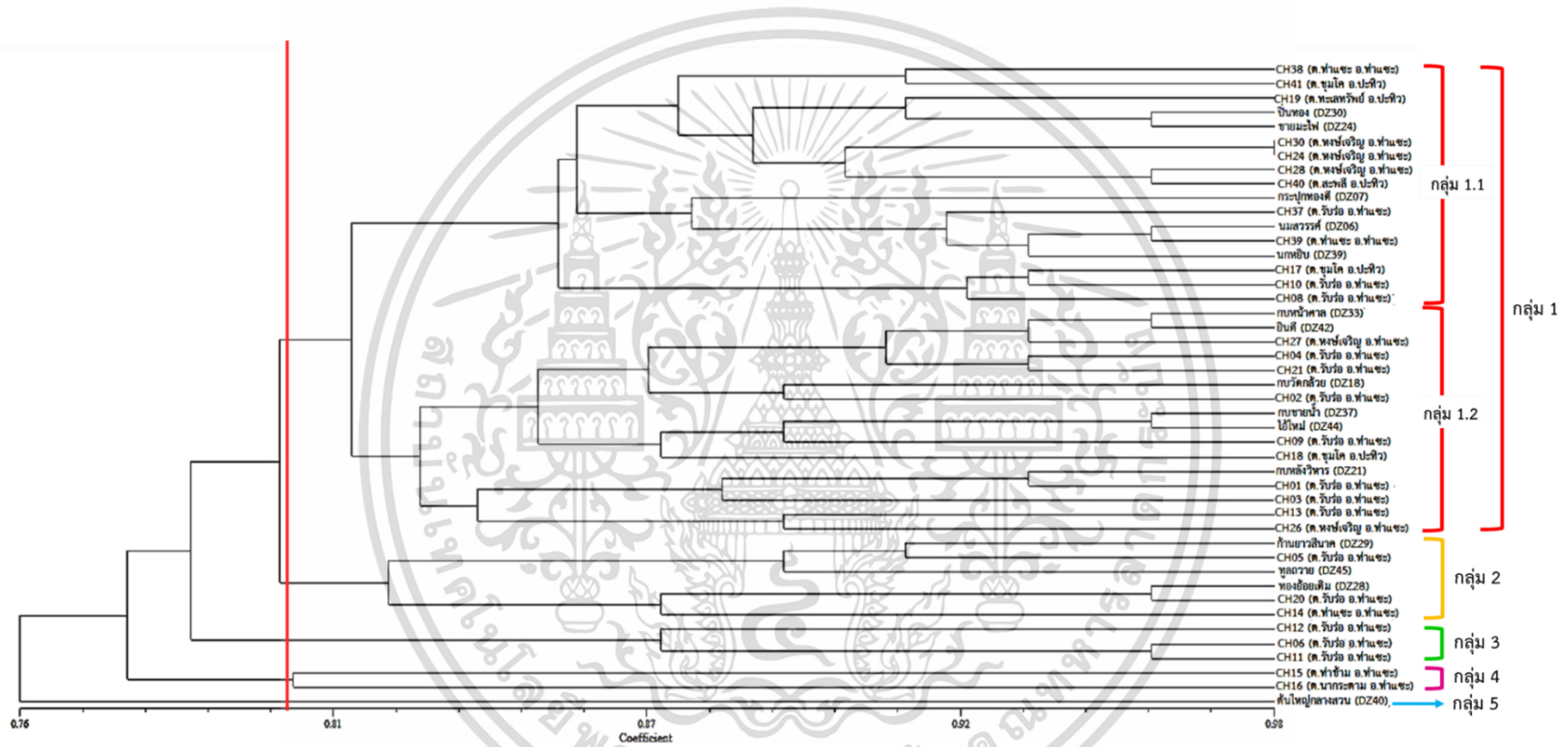
เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11 (Rohlf, 2000) โดยใช้วิธี Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) ซึ่งแสดงผลในรูปของแผนภาพแสดงความสัมพันธ์พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.76 ถึง 0.98 โดยที่ค่า 0.80 แบ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ยังสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อยที่ 1.1 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มก่าป็น ได้แก่ ขายมะไฟ (DZ24) ปิ่นทอง (DZ30) กลุ่มทองย้อย ได้แก่ นมสวรรค์ (DZ06) นกหยิบ (DZ39) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ กระปุกทองดี (DZ07) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH08 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH10 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH17 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) CH19 (ต.ทะเลทรัพย์ อ.ปะทิว) CH24 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH28 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH30 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH37 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH38 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) CH39 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) CH40 (ต.สะพลี อ.ปะทิว) และ CH41 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) กลุ่มย่อยที่ 1.2 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มกบ ได้แก่ กบวัดกล้วย (DZ18) กบหลังวิหาร (DZ21) กบหน้าศาล (DZ33) กบขายน้ำ (DZ37) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ ยินดี (DZ42) ไอ้ใหม่ (DZ44) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH01 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH02 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH03 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH04 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH09 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH13 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH18 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) CH21 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH26 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) และ CH27 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ)

ในกลุ่มย่อยที่ 1.1 พบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มก่าป็นและกลุ่มทองย้อยมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกัน โดย CH19, CH24, CH28, CH30, CH38, CH40 และ CH41 ซึ่งมาจากจังหวัดชุมพรมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มก่าป็น คือ ขายมะไฟ (DZ24) และปิ่นทอง (DZ30) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างกลุ่มนี้อาจจะเกิดการเคลื่อนย้ายเมล็ดพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มก่าป็น สำหรับตัวอย่าง CH37 และ CH39 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มทองย้อย คือ นมสวรรค์ (DZ06) และนกหยิบ (DZ39) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างในกลุ่มนี้อาจเกิดการเคลื่อนย้ายเมล็ดพันธุ์ทุเรียนกลุ่มทองย้อย และตัวอย่าง CH08, CH10 และ CH17 พบว่ามีการแตกกิ่งออกมาจากกลุ่มย่อยที่ 1.1 จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจเป็นทุเรียนที่เกิดการเคลื่อนย้ายเมล็ดพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มก่าป็นหรือกลุ่มทองย้อยหรือเป็นลูกผสมระหว่าง 2 กลุ่มนี้ ในกลุ่มย่อยที่ 1.2 พบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบถูกจัดอยู่ด้วยกันและมีสายพันธุ์ในกลุ่มเบ็ดเตล็ด คือ ยินดี (DZ42) และไอ้ใหม่ (DZ44) รวมถึงมีตัวอย่าง CH01, CH02, CH03, CH04, CH09, CH13, CH18, CH21, CH26 และ CH27 ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vanijajiva (2011) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของทุเรียนจำนวน 14 สายพันธุ์ในจังหวัดนันทบุรีด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอฟพีดี สามารถแบ่งสายพันธุ์ทุเรียนกลุ่มกบออกจากสายพันธุ์ทุเรียนกลุ่มก่าป็นและกลุ่มทองย้อยได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับงานวิจัยของฐิตาภรณ์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี พบว่าแต่ละตัวอย่างมีการกระจายไม่สัมพันธ์กับการแบ่งกลุ่มตามสัณฐานวิทยา แต่มีบางตัวอย่าง คือสายพันธุ์ ขายมะไฟ (จัดอยู่ในกลุ่มก่าป็น) พบว่ามีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ทองย้อยฉัตรและฉัตรสีทอง (จัดอยู่ในกลุ่มทองย้อย)

ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มทองย้อย ได้แก่ ทองย้อยเดิม (DZ28) กลุ่มก้านยาว ได้แก่ ก้านยาวสีนาค (DZ29) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ ทูลถวาย (DZ45) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH05 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH14 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) และ CH20 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) โดย CH05 เป็นตัวอย่างที่เกิดจากการเพาะเมล็ดจากสายพันธุ์ก้านยาวและทำการต่อกิ่งไม้ทั้น ซึ่งแสดงผลชัดเจนว่าตัวอย่างนี้ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ก้านยาวสีนาค เนื่องจากสายพันธุ์ก้านยาวสีนาคเกิดจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ก้านยาว (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) ส่วน CH14 และ CH20 มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับทองย้อยเดิม (DZ28) ที่ได้ระบุไว้ว่าเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมมีการปลูกมาเป็นระยะเวลาอันตั้งแต่อดีต (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) จึงคาดว่า 2 ตัวอย่างนี้จะเกิดจากเมล็ดสายพันธุ์ทองย้อยเดิมที่เป็นสายพันธุ์เก่าแก่

ในกลุ่มที่ 3 ได้แก่ CH06 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH11 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) และ CH12 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) กลุ่มที่ 4 ได้แก่ CH15 (ต.ท่าข้าม อ.ท่าแซะ) และ CH16 (ต.นากระตาม อ.ท่าแซะ) พบว่าเป็นตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเหล่านี้มีพันธุกรรมแตกต่างจากสายพันธุ์ทุเรียนที่รวบรวมในศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี โดยตัวอย่าง CH15 และ CH16 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นทุเรียนดั้งเดิมซึ่งสอดคล้องกับลักษณะต้นทุเรียนที่พบ คือต้นสูงใหญ่มีอายุประมาณ 62 ปี ผลมีขนาดเล็ก เนื้อน้อยและแห้ง มีสีเหลืองซีด รสหวาน และกลิ่นไม่แรง จึงถือว่าเป็นต้นทุเรียนเก่าแก่ที่ปลูกมาตั้งแต่บรรพบุรุษ และกลุ่มที่ 5 คือต้นใหญ่กลางสวน (DZ40) เป็นตัวอย่างไม่ทราบสายพันธุ์เป็นไปได้ว่าจะเป็นทุเรียนคนละสปีชีส์จึงแยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจน แสดงดังรูปที่ 4.3

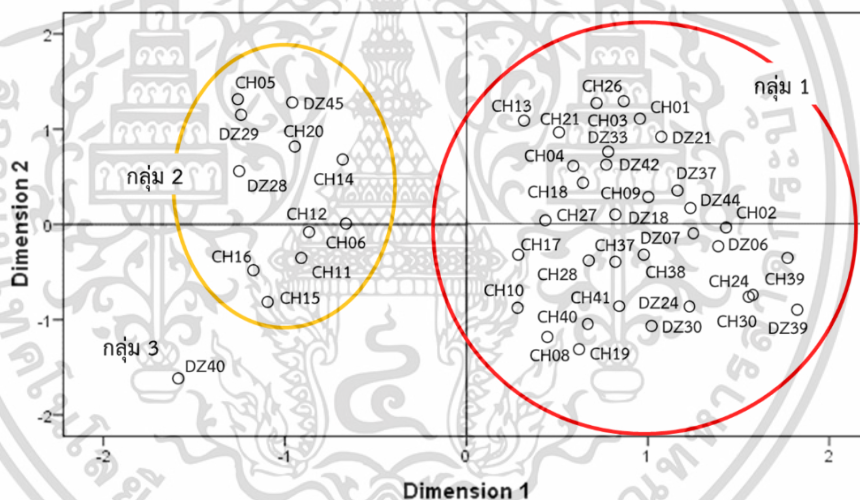
เมื่อดูความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่าบางตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับตัวอย่างทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีในกลุ่มก้าน ย้อย กลุ่มกบ และกลุ่มก้านยาว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการเคลื่อนย้ายเมล็ดทุเรียนจากแหล่งหนึ่งมาปลูกในอีกพื้นที่หนึ่ง เช่น นมสวรรค์ (DZ06) มีประวัติที่เกิดมาจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ทองย้อย แหล่งที่ค้นพบจังหวัดจันทบุรี (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) ซึ่งมีลักษณะพันธุ์ที่ดี รสชาติหวานมัน อร่อย จึงอาจมีการนำเมล็ดลงไปปลูกที่จังหวัดชุมพรทำให้มีพันธุกรรมใกล้ชิดกัน และมีบางตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบเฉพา เนื่องจากทุเรียนมีการปลูกมาตั้งแต่สมัยอยุธยา ซึ่งเริ่มมีการนำทุเรียนเข้ามาปลูกครั้งแรกทางภาคใต้ (เกศินี, 2528) จึงทำให้มีพันธุกรรมแยกกลุ่มออกมาชัดเจน



รูปที่ 4.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี 13 คู่ไพรเมอร์ โดยการจัดกลุ่มแบบวิธี UPGMA

จากแผนภาพในรูปที่ 4.3 พบว่ากลุ่มที่ 1 มีตัวอย่างทั้ง 2 อำเภอ โดยอำเภอท่าชะแจะ ได้แก่ ตำบลรับร้อ ตำบลหงษ์เจริญ และตำบลท่าชะแจะ และอำเภอปะทิว ได้แก่ ตำบลชุมโค ตำบลทะเลทรัพย์ และตำบลสะพลี ในกลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 พบเฉพาะตัวอย่างในพื้นที่อำเภอท่าชะแจะ ได้แก่ ตำบลรับร้อ ตำบลท่าชะแจะ ตำบลท่าข้าม และตำบลนากระตาม แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมของตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กับภูมิศาสตร์หรือพื้นที่ที่เก็บ เพราะตัวอย่างทั้งในอำเภอท่าชะแจะและอำเภอปะทิวมีการกระจายอยู่ในกลุ่มของตัวอย่างที่เรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี และกลุ่มที่พบเฉพาะตัวอย่างที่เรียนจากจังหวัดชุมพรก็มีการกระจายตัวอย่างภายในตำบลเช่นกัน

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของกลุ่มประชากร (Principle Coordinate Analysis; PCoA) ที่พบการกระจายของตัวอย่างทั้งในอำเภอท่าชะแจะและอำเภอปะทิวเช่นกัน โดยสามารถแบ่งกลุ่มที่เรียนได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีทั้งตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีและตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่เรียนในกลุ่มที่ 1 มีจำนวนมากเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 2 ส่วนกลุ่ม 3 คือต้นใหญ่กลางสวนที่แยกกลุ่มออกมาแสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 แผนภาพแสดงการกระจายตัวของกลุ่มประชากร (PCoA) ที่เรียนจำนวน 45 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ในทุเรียน จำนวน 45 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพร (CH) จำนวน 30 ตัวอย่าง และจาก ศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี (DZ) จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ โดย 15 ตัวอย่าง ที่นำมาศึกษาถูกจัดอยู่ใน 5 กลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (หิรัญ และคณะ, 2546) ได้แก่ กลุ่มกบ (DZ18, DZ21, DZ33 และ DZ37) กลุ่มกำนยาว (DZ29) กลุ่มกำป็น (DZ24 และ DZ30) กลุ่มทองย้อย (DZ06, DZ28 และ DZ39) กลุ่มเบ็ดเตล็ด (DZ06, DZ42, DZ44 และ DZ45) และมี 1 ตัวอย่างที่ไม่ทราบสายพันธุ์ (DZ40) โดยใช้ 18 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.4) พบว่ามี 14 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ สารพันธุกรรมได้ หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ปรากฏขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 100 ถึง 1200 คู่เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 51 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 3.64 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 36 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 71.19 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ไพรเมอร์ MS1CT5, MS1CT6, MS1CT7, MS1CT9 และ MS1GT15 แสดงเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูงที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ไพรเมอร์ MS1GT34 แสดงเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอต่ำที่สุด คือ 25 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 โดยแสดงตัวอย่างแถบของคู่ไพรเมอร์ MS1CT5 ดังรูปที่ 4.5 โดยคู่ไพรเมอร์ที่แสดง เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวน และบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี (Chaouang *et al.*, 2016) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 14 คู่ไพรเมอร์นี้มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนได้เช่นกัน

ตารางที่ 4.2 ชนิดของไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวน polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

ชนิดของ ไพรเมอร์	ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	เปอร์เซ็นต์ polymorphism
MS1CT5	250-300	3	3	100.00
MS1CT6	170-190	3	3	100.00
MS1CT7	100-250	5	5	100.00
MS1CT9	175-250	3	3	100.00
MS1CT12	200-225	2	1	50.00
MS1CT16	250-475	4	3	75.00
MS1GT15	200-250	3	3	100.00
MS1GT19	250-275	2	1	50.00
MS1GT27	200-1200	6	3	50.00
MS1GT34	225-700	4	1	25.00
MS1AAC2	250-1000	6	3	50.00
MS1AAC5	225-275	3	2	66.67
MS1AAC19	225-250	2	1	50.00
MS1GAA203	175-275	5	4	80.00
รวม	-	51	36	996.67
จำนวนเฉลี่ย	-	3.64	2.57	71.19

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์มีคู่ไพรเมอร์ที่เคยรายงานในทุเรียนของประเทศไทย คือ งานวิจัยของสุตา และคณะ (2557) ที่ศึกษาในทุเรียนทางภาคใต้จากจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา และยะลา จำนวน 67 ตัวอย่าง โดยใช้ 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ MS1CT7 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ MS1CT9 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ MS1CT16 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ MS1AAC2 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ MS1AAC19 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ และ MS1CT27 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ โดยงานวิจัยครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ 6 คู่ไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานไว้ พบว่า MS1CT7 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ MS1CT9 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ MS1CT16 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ MS1AAC2 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ MS1AAC19 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ และ MS1CT27 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเท่าเดิม ได้แก่ MS1AAC2 และ MS1AAC19 ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างออกไป ได้แก่ MS1CT7, MS1CT9 และ MS1CT16 เป็นไปได้ว่าแต่ละครั้งที่มีการศึกษาในทุเรียน ทั้งจำนวนแถบดีเอ็นเอมากขึ้นหรือจำนวนแถบดีเอ็นเอลดลงหรือจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่าเดิม ขึ้นอยู่กับการเลือกลักษณะความต่างของ

กลุ่มตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง และแหล่งพื้นที่ที่นำตัวอย่างมาศึกษา ทำให้การแสดงผลจำนวนแถบดีเอ็นเอ ตำแหน่งขนาดชิ้นดีเอ็นเอรวมถึงเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจึงมีความแตกต่างกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ด้วยคู่มือ MS1CT5 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ในทุเรียนจำนวน 30 ตัวอย่าง

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYSpc โดยใช้วิธี UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.97 โดยที่ค่า 0.77 แบ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนเป็น 6 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มทองย้อย ได้แก่ ทองย้อยเดิม (DZ28) กลุ่มก้านยาว ได้แก่ ก้านยาวสีนาค (DZ29) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ ทูลถวย (DZ45) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH04 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) และ CH05 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) พบว่า CH04 และ CH05 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับก้านยาวสีนาคที่เกิดจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ก้านยาว (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากเจ้าของบ้านที่กล่าวไว้ว่าตัวอย่าง CH05 เป็นก้านยาวเพาะเมล็ด และ CH04 มีลักษณะใบคล้ายก้านยาว ส่วนทองย้อยเดิม (DZ28) ได้ระบุไว้ว่าเป็นสายพันธุ์เก่าแก่ที่มีการปลูกมานาน แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ 1 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นทุเรียนสายพันธุ์เก่าแก่ที่คงพันธุกรรมเดิมไว้ ซึ่งสอดคล้องกับแผนภาพความสัมพันธ์ในรูปที่ 4.3

กลุ่มที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มกบ ได้แก่ กบวัดกล้วย (DZ18) กบหลังวิหาร (DZ21) กบหน้าศาล (DZ33) และกบชายน้ำ (DZ37) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ ยินดี (DZ42) และไอ้ใหม่ (DZ44) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH01 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH03 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH18 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) CH19 (ต.ทะเลทรัพย์ อ.ปะทิว) CH21 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH24 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH26 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH27 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) และ CH41 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มกำป็น ได้แก่ ชายมะไฟ (DZ24) และปิ่นทอง (DZ30) กลุ่มทองย้อย ได้แก่ นมสวรรค์ (DZ06) และนกหยิบ (DZ39) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ กระปุกทองดี (DZ07) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH02 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH08 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH10 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH30 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH38 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) และ CH39 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ)

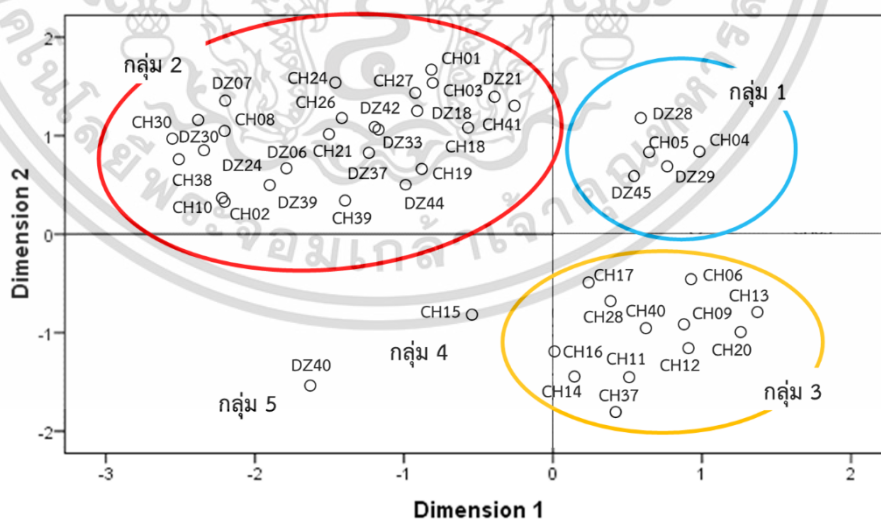
โดยกลุ่มย่อยที่ 2.1 พบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบถูกจัดอยู่ด้วยกันและมีสายพันธุ์ในกลุ่มเบ็ดเตล็ดคือ ยินดี (DZ42) และไอ้ใหม่ (DZ44) รวมถึงมีตัวอย่าง CH01, CH03, CH18, CH19, CH21, CH24, CH26, CH27 และ CH41 ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบ จึงอาจกล่าวได้ว่าตัวอย่างในจังหวัดชุมพรและสายพันธุ์กลุ่มเบ็ดเตล็ดอาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายเมล็ดพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vanijajiva (2011) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของทุเรียนจำนวน 14 สายพันธุ์ในจังหวัดนันทบุรีด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอฟดี สามารถแบ่งสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบออกจากสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ พบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบจัดอยู่กลุ่มเดียวกันเช่นกัน (Vanijajiva, 2012) ในกลุ่มย่อยที่ 2.2 พบว่า CH02, CH10, CH30 และ CH38 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกำป็น คือ ชายมะไฟ (DZ24) และปิ่นทอง (DZ30) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเหล่านี้อาจเกิดมาจากเมล็ดพันธุ์กำป็น เพราะจากการสอบถามข้อมูลจากเจ้าของบ้านในตัวอย่าง CH02 เมื่อมีสีเหลืองคล้ายหมอนทองและเส้นใยสูง CH10 เมื่อมีสีเหลืองคล้ายหมอนทองและเนื้อหนา CH30 เมื่อมีสีเหลือง CH38 เมื่อมีสีเหลืองและเนื้อหนา ซึ่งลักษณะภายนอกเหมือนกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกำป็น (หิรัญ และคณะ, 2546) ส่วน CH08 และ CH39

มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มทองย้อย คือ นมสวรรค์ (DZ06) และนกหีบ (DZ39) แสดงให้เห็นว่า 2 ตัวอย่างนี้อาจเกิดจากเมล็ดพันธุ์ทองย้อย โดยพบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกำปันและกลุ่มทองย้อยมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของฐิตาภรณ์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี พบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกำปันมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับกลุ่มทองย้อย เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ศึกษาในทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Vanijajiva, 2011) และเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ (Vanijajiva, 2012) พบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกำปันมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับกลุ่มทองย้อยเช่นกัน ขณะที่กระปุกทองดี (DZ07) แตกกิ่งออกมาจากสายพันธุ์ในกลุ่มกำปันและกลุ่มทองย้อย จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจเกิดจากเมล็ดพันธุ์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่าง CH17 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) CH28 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) และ CH40 (ต.สะพลี อ.ปะทิว) กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยตัวอย่าง CH06 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH09 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH11 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH12 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH13 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) CH14 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) CH16 (ต.นากระตาม อ.ท่าแซะ) CH20 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) และ CH37 (ต.รับร่อ อ.ท่าแซะ) และกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยตัวอย่าง CH15 (ต.ท่าข้าม อ.ท่าแซะ) พบว่าเป็นตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรทั้งหมด เป็นไปได้ที่จะมีรูปแบบยีนหรือลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากตัวอย่างทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี ส่วนใหญ่ตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้นเป็นต้นทุเรียนที่มาจากการปลูกด้วยเมล็ด เพราะได้สอบถามข้อมูลจากเจ้าของบ้านในตัวอย่าง CH28 เป็นทุเรียนที่นำเมล็ดมาเพาะ ลักษณะเป็นเนื้อทุเรียนบ้านและเนื้อมีสีเหลืองอ่อน ตัวอย่าง CH12 ผลมีขนาดเล็ก เมล็ดมีขนาดใหญ่ และเนื้อมีสีเหลืองนวลคล้ายน้ำมัน ตัวอย่าง CH37 เป็นทุเรียนบ้าน และมีอายุประมาณ 20 ปี ตัวอย่าง CH16 ต้นสูงใหญ่ ผลมีขนาดเล็ก และเนื้อมีสีเหลืองอ่อน และตัวอย่าง CH17 ผลทรงกลม เนื้อมีสีเหลืองอ่อนค่อนข้างซีด และเมล็ดมีขนาดใหญ่ โดยตัวอย่าง CH15 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นทุเรียนดั้งเดิมตั้งแต่อดีต ซึ่งถือได้ว่าเป็นต้นทุเรียนเก่าแก่ที่มีอายุประมาณ 62 ปี ถ้าต้นสูงใหญ่ เป็นตัวอย่างเดียวที่แยกกลุ่มอย่างชัดเจน เหมาะที่จะส่งเสริมให้เป็นสายพันธุ์ใหม่เนื่องจากผลมีขนาดเล็ก ประมาณ 2 กิโลกรัม เนื้อสีเหลืองซีด เนื้อแห้ง รสหวาน และกลิ่นไม่แรง ดังงานวิจัยของ Mursyidin and Daryono (2016) ที่ศึกษาความหลากหลายในทุเรียน (*Durio zibethinus*) จากประเทศอินโดนีเซียด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี พบว่าทุเรียนสายพันธุ์ Enam-Hapat แยกออกจากกลุ่มอื่นและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์อื่นๆ ค่อนข้างสูง ซึ่งสายพันธุ์นี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นสายพันธุ์ใหม่ได้ในอนาคต ส่วนกลุ่มที่ 6 คือ ต้นใหญ่กลางสวน (DZ40) เป็นตัวอย่างไม่ทราบสายพันธุ์เป็นไปได้ว่าจะเป็นทุเรียนคนละสปีชีส์จึงแยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจน แสดงดังรูปที่ 4.6

จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 71.19 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.97 ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยที่ค่า 0.79 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของของ ฮูตา และคณะ (2557) ที่ได้วิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนบ้านทางภาคใต้จำนวน 67 ตัวอย่าง จากจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา และยะลา โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.52 ถึง 0.95 ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ที่ค่า 0.69 สามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนได้ 6 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนจะพบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ระดับสูง และพบว่าตัวอย่างในแต่ละกลุ่มไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของตัวอย่าง อาจเป็นเพราะมีการนำเมล็ดจากหลายแหล่งมาปลูกในพื้นที่ตัวเองทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของกลุ่มประชากร (Principle Coordinate Analysis; PCoA) ในทุเรียน พบว่าสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่พบการกระจายของตัวอย่างทั้งในอำเภอท่าแซะและอำเภอบึงสามพัน สามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนได้เป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีเพียง 5 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรและจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี และกลุ่มที่ 2 มีการกระจายของหลายตัวอย่างพบทั้งตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรและจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี กลุ่มที่ 3 พบเฉพาะตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร กลุ่มที่ 4 คือตัวอย่าง CH15 แยกกลุ่มออกมา เนื่องจากเป็นต้นทุเรียนเก่าแก่ที่มีอายุประมาณ 62 ปี และกลุ่มที่ 5 คือต้นใหญ่กลางสวนที่แยกกลุ่มออกมา แสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แผนภาพแสดงการกระจายตัวของกลุ่มประชากร (PCoA) ทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

4.3 ผลการเปรียบเทียบการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ด้วย เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนในเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและ เอสเอสอาร์มีค่าเปอร์เซ็นต์ความต่างของแถบดีเอ็นเอ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม และการ แบ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนสรุปได้ดังตารางที่ 4.3 โดยพบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ ระดับสูงทั้งในเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีแสดงค่า 65.62 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.76 ถึง 0.98 และเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์แสดงค่า 71.19 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.97 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้หลายเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายของทุเรียน โดยพบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง เช่น เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ในงานวิจัยของ ฮูตา และคณะ (2557) ได้ค่าเท่ากับ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.52 ถึง 0.95 โดย แบ่งกลุ่มทุเรียนได้ 6 กลุ่ม เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีในงานวิจัยของ Ruwaida *et al.* (2009) ได้ค่า เท่ากับ 81.89 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.46 ถึง 0.71 สามารถแบ่งทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม และ Rosmaina *et al.* (2016) ได้ค่าเท่ากับ 69.39 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.28 ถึง 0.48 พบความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถแบ่งทุเรียนได้ 4 กลุ่ม เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ ในงานวิจัยของ Riupassa *et al.* (2016) ได้ค่าเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.0 โดยแบ่งทุเรียนออกเป็น 3 กลุ่ม และ Handayani *et al.* (2017) ได้ค่าเท่ากับ 91.30 เปอร์เซ็นต์ ค่า สัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.34 ถึง 0.58 สามารถแบ่งทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล เอเอฟแอลพีในรายงานของฐิตาภรณ์ และคณะ (2554) ได้ค่าเท่ากับ 83.64 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์อยู่ ระหว่าง 0.18 ถึง 0.89 โดยแบ่งทุเรียนได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ เป็นต้น

แสดงให้เห็นว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนในหลายเครื่องหมายโมเลกุล ส่วนใหญ่พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง เนื่องจากทุเรียนเป็นพืชที่มีการผสมพันธุ์กันตาม ธรรมชาติและการแพร่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดส่งผลให้ทุเรียนมีลักษณะพันธุกรรมที่หลากหลาย โดยการเกิด ความหลากหลายน้อยหรือสูงนั้นขึ้นอยู่กับทางเลือกความแตกต่างและจำนวนของกลุ่มตัวอย่าง รวมถึง ระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่ที่ใช้ศึกษา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเครื่องหมายโมเลกุล เอสเอสอาร์สามารถบอกความแตกต่างและใช้ประเมินลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ทุเรียนได้ (ฮูตา และคณะ, 2557; Sales, 2015) โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะสำหรับเครื่องหมาย โมเลกุลเอสเอสอาร์ จึงสามารถใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างพืชชนิดนั้นๆ ได้ดี (Karaca *et al.*, 2005; Ince *et al.*, 2009; สุรินทร์, 2552)

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ความต่างของแถบดีเอ็นเอ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม การแบ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์

ชนิดของ เครื่องหมายโมเลกุล	เปอร์เซ็นต์ความต่าง ของแถบดีเอ็นเอ (% polymorphism)	ค่าสัมประสิทธิ์ความ เหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient)	การแบ่งกลุ่ม ตัวอย่างทุเรียน
เอสอาร์เอพี	65.62	0.76-0.98	5
เอสเอสอาร์	71.19	0.67-0.97	6

ในการจัดกลุ่มตัวอย่างทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.4 พบว่าเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในบางตัวอย่างที่มีการผันแปรกลุ่ม เช่น ตัวอย่าง CH08, CH10 และ CH17 ที่จัดกลุ่มไม่ชัดเจน (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี) เปลี่ยนไปอยู่ในกลุ่มทองย้อย กลุ่มกำป็น และกลุ่มทุเรียนที่มีเฉพาะตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์) ตามลำดับ ตัวอย่าง CH02, CH04, CH09 และ CH13 อยู่ในกลุ่มกบ (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี) เปลี่ยนไปอยู่ในกลุ่มกำป็น กลุ่มกำนยาว และกลุ่มทุเรียนที่มีเฉพาะตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์) ตามลำดับ ตัวอย่าง CH19, CH24 และ CH41 จากที่จัดอยู่ในกลุ่มกำป็น (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี) เปลี่ยนไปอยู่ในกลุ่มกบ (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์) เป็นต้น สำหรับตัวอย่าง CH15 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์มีการแยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจน เนื่องจากเป็นต้นทุเรียนโบราณมีการปลูกมาระยะเวลานาน จึงพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้จัดจำแนกกลุ่มทุเรียน เพราะเมื่ออ้างอิงลักษณะภายนอกเป็นไปตามข้อมูลจากเจ้าของบ้านที่ได้กล่าวไว้ว่าตัวอย่าง CH04 มีลักษณะใบคล้ายกำนยาว ผลทรงกลม มีขนาดใหญ่ เนื้อมีรสหวานไม่มาก มีความมัน และเหนียว ตัวอย่าง CH05 รสชาติอร่อย กลิ่นไม่ฉุน เป็นกำนยาวเดิมที่ต่อกิ่งไม้ทั้นหรือเป็นกำนยาวเพาะเมล็ด จึงมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับกำนยาวสีนาค ตัวอย่าง CH02 เนื้อมีสีเหลืองคล้ายหมอนทอง รสชาติหวานมัน และเส้นใยสูง ตัวอย่าง CH10 เนื้อมีสีเหลืองคล้ายหมอนทอง เนื้อหนา และรสชาติอร่อย ตัวอย่าง CH30 เนื้อมีสีเหลือง และรสหวาน ตัวอย่าง CH38 ผลมีลักษณะทรงขอบขนาน เนื้อมีสีเหลืองค่อนข้างหนา รสชาติดี และมีรสหวาน ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกำป็นที่มีผลทรงขอบขนาน รสชาติหวานจัด เนื้อสีเหลือง เนื้อหนา มีกลิ่นอ่อน และเมล็ดลีบ (ศิริชัย และคณะ, 2546) จึงมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับชายมะไฟ (DZ24) และปิ่นทอง (DZ30) ที่จัดอยู่กลุ่มกำป็น ส่วนตัวอย่าง CH08 และ CH39 ถูกแยกออกมาอยู่กับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มทองย้อยที่มีขนาดผลปานกลาง ผลมีสีเขียวอมเหลือง เนื้อค่อนข้างมาก มีสีเหลืองนวล กลิ่นไม่ฉุน เนื้อสัมผัสหยาบแห้ง รสหวานปนมัน และมีเส้นใยเล็กน้อย (ศิริชัย และคณะ, 2546) และตัวอย่าง CH13 แยกออกมาอยู่ในกลุ่มทุเรียนที่มีเฉพาะตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร เป็นเพราะต้นสูงใหญ่อายุประมาณ 30 ปี ผลมีขนาดเล็ก ลักษณะเนื้อทุเรียนเป็นสีเหลืองอ่อนค่อนข้างซีด รสชาติมัน และเส้นใยน้อย

ตารางที่ 4.4 การจัดกลุ่มตัวอย่างทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างตามชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล

ชนิดของ เครื่องหมาย โมเลกุล	กลุ่มกำป็น	กลุ่มทองย้อย	กลุ่มกบ	กลุ่มตัวอย่าง จากจังหวัดชุมพร	กลุ่มอื่นๆ	จัดกลุ่ม ไม่แน่ชัด
เอสอาร์เอพี	ชายมะไฟ (DZ24)	นมสวรรค์ (DZ06)	กบวัดกล้วย (DZ18)	CH06	ทองย้อยเดิม (DZ28)	CH08
	ป็นทอง (DZ30)	นกหยิบ (DZ39)	กบหลังวิหาร (DZ21)	CH11	ก้านยาวสีนาค (DZ29)	CH10
	CH19	กระปุกทองดี (DZ07)	กบหน้าศาล (DZ33)	CH12	ทุลถวาย (DZ45)	CH17
	CH24	CH37	กบชายน้ำ (DZ37)	CH14	CH05	
	CH28	CH39	ยินดี (DZ42)	CH15		
	CH30		ไอใหม่ (DZ44)	CH16		
	CH38		CH01	CH20		
	CH40		CH02			
	CH41		CH03			
			CH04			
			CH09			
			CH13			
			CH18			
			CH21			
			CH26			
			CH27			

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การจัดกลุ่มตัวอย่างทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างตามชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล

ชนิดของ เครื่องหมาย โมเลกุล	กลุ่มกำปัน	กลุ่มทองย้อย	กลุ่มกบ	กลุ่มตัวอย่าง จากจังหวัดชุมพร	กลุ่มอื่นๆ	จัดกลุ่ม ไม่แน่ชัด
เอสเอสอาร์	ชายมะไฟ (DZ24)	นมสวรรค์ (DZ06)	กบวัดกล้วย (DZ18)	CH06	ทองย้อยเดิม (DZ28)	-
	ปิ่นทอง (DZ30)	นกเหยียบ (DZ39)	กบหลังวิหาร (DZ21)	CH09	ก้านยาวสีนาค (DZ29)	-
	CH02	กระปุกทองดี (DZ07)	กบหน้าศาล (DZ33)	CH11	ทุลถวาย (DZ45)	-
	CH10	CH08	กบชายน้ำ (DZ37)	CH12	CH04	
	CH30	CH39	ยีนดี (DZ42)	CH13	CH05	
	CH38		ไอ้ใหม่ (DZ44)	CH14		
			CH01	CH15		
			CH03	CH16		
			CH18	CH17		
			CH19	CH20		
			CH21	CH28		
			CH24	CH37		
			CH26	CH40		
			CH27			
			CH41			

ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ให้เปอร์เซ็นต์ความต่างของแถบดีเอ็นเอสูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีจึงมีความละเอียดกว่า เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์แม้จะมีความยุ่งยากในการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับพืชชนิดนั้นๆ แต่หากได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียวของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะโดยเครื่องหมายนี้เป็นแบบ co-dominance ที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ซึ่งให้ข้อมูลได้ดีกว่าเครื่องหมายชนิดอื่นๆ (Zhang *et al.*, 2002) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีมีข้อดี คือมีความใกล้เคียงกับเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีแต่ทำง่ายรวดเร็วกว่า ทำซ้ำแล้วให้ผลคงเดิม ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบส และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันด้วยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (Gulsen *et al.*, 2010) จากงานวิจัยนี้ทั้ง 2 เครื่องหมายโมเลกุลให้ผลการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกัน ซึ่งมีเพียงบางตัวอย่างที่เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมจึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่เหมือนกัน แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์มีความสามารถในการจัดจำแนกกลุ่มทุเรียนได้ดี

4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีร่วมกับเอสเอสอาร์

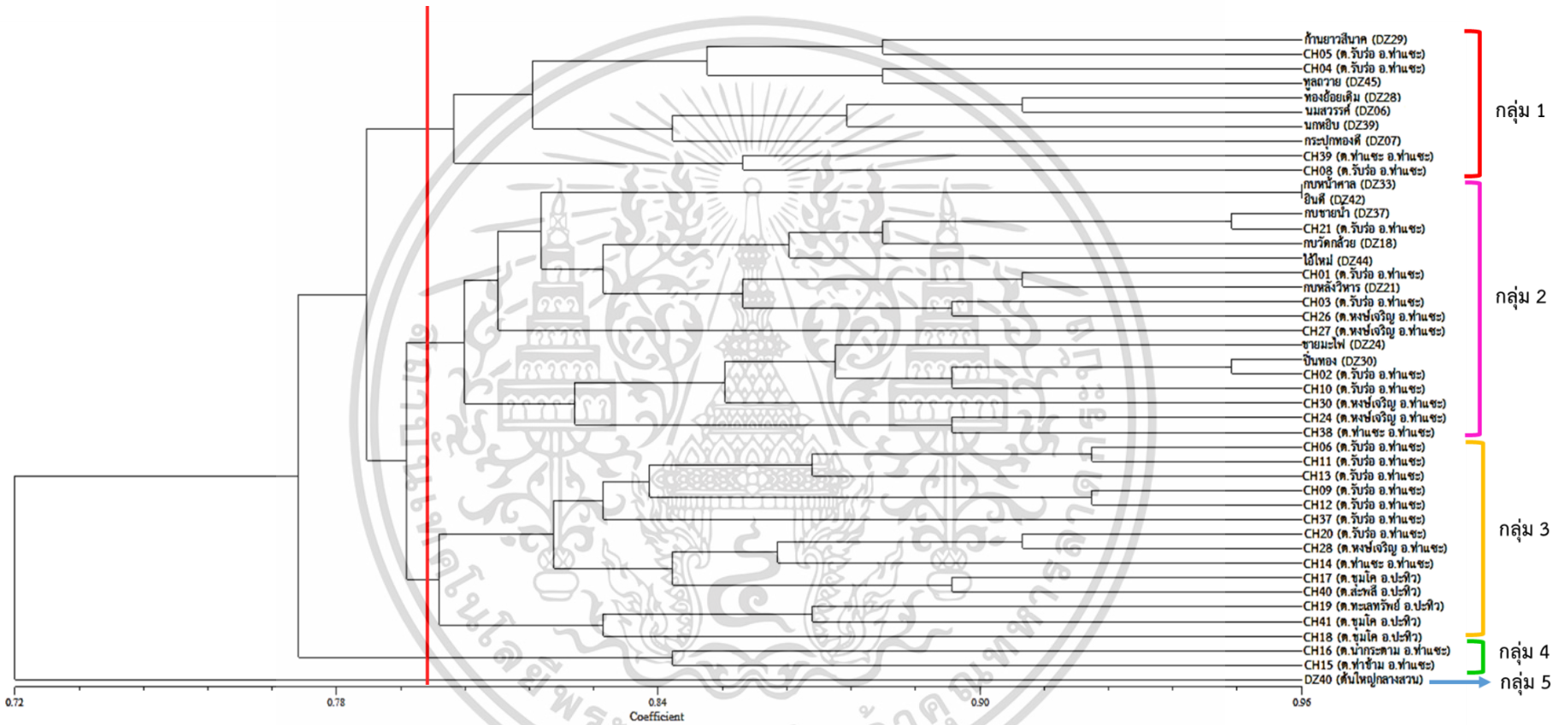
เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างร่วมกันของ 2 เครื่องหมายโมเลกุลด้วยโปรแกรม NTSYSpc โดยใช้วิธี UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.72 ถึง 0.96 โดยที่ค่า 0.80 แบ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มก้านยาว ได้แก่ ก้านยาวสีนาค (DZ29) กลุ่มทองย้อย ได้แก่ นมสวรรค์ (DZ06) ทองย้อยเดิม (DZ28) และนกหยิบ (DZ39) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ กระบุงทองดี (DZ07) และทูลถวาย (DZ45) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH04 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH05 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH08 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) และ CH39 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) โดยตัวอย่าง CH04, CH05 และทูลถวาย (DZ45) มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มก้านยาว คือ ก้านยาวสีนาค (DZ29) จึงอาจเกิดจากเมล็ดพันธุ์ก้านยาวซึ่งเป็นไปตามข้อมูลจากเจ้าของบ้าน ตัวอย่าง CH08, CH39 และกระบุงทองดี (DZ07) มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มทองย้อย คือ นมสวรรค์ (DZ06) ทองย้อยเดิม (DZ28) และนกหยิบ (DZ39) มีความเป็นไปได้ที่เกิดจากเมล็ดพันธุ์ทองย้อยจึงมีพันธุกรรมใกล้ชิดกัน ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มก้านยาวมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับกลุ่มทองย้อยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vanijajiva (2011) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของทุเรียนจำนวน 14 สายพันธุ์ในจังหวัดนนทบุรีด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี สามารถแบ่งสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบออกจากกลุ่มของสายพันธุ์อื่นได้อย่างชัดเจน และพบว่าสายพันธุ์ก้านยาว (จัดอยู่ในกลุ่มก้านยาว) มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ฉัตรสีทอง (จัดอยู่ในกลุ่มทองย้อย)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีที่จัดอยู่ในกลุ่มกบ ได้แก่ กบวัดกล้วย (DZ18) กบหลังวิหาร (DZ21) กบหน้าศาล (DZ33) และกบชายน้ำ (DZ37) กลุ่มกำปัน ได้แก่ ชายมะไฟ (DZ24) และปิ่นทอง (DZ30) กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ ยินดี (DZ42) และไอ้ใหม่ (DZ44) และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร ได้แก่ CH01 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH02 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH03 (ต.รับร้อ

อ.ท่าแซะ) CH10 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH21 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH24 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH26 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH27 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH30 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) และ CH38 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) โดยตัวอย่าง CH01, CH03, CH21, CH26, CH27 ยินดี (DZ42) และไอ้ใหม่ (DZ44) มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบ คือกบวัดกล้วย (DZ18) กบหลังวิหาร (DZ21) กบหน้าศาล (DZ33) และกบชายน้ำ (DZ37) ซึ่งปัจจุบันมีสายพันธุ์กบเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากจึงเป็นไปได้ที่เกิดจากเมล็ดพันธุ์กบ ส่วนตัวอย่าง CH02, CH10, CH24, CH30 และ CH38 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกำป็น คือชายมะไฟ (DZ24) และปิ่นทอง (DZ30) จากข้อมูลจากเจ้าของบ้านในแต่ละตัวอย่างส่วนใหญ่มีทรงผลกลมป้อมจนถึงลักษณะขอบขนาน เนื้อมีลักษณะเหลืองคล้ายหอมทอง เนื้อหนา รสชาติหวานมันอร่อย และเส้นใยสูง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มกำป็นที่มีผลทรงขอบขนาน รสชาติหวาน เนื้อสีเหลือง เนื้อหนา มีกลิ่นอ่อน และเมล็ดลีบ (หิรัญ และคณะ, 2546) และพบว่าสายพันธุ์ในกลุ่มกบมีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ในกลุ่มกำป็น โดยพิจิตร (2542) ได้กล่าวไว้ว่าแต่ก่อนกิ่งตอนหายากและมีราคาแพงชาวสวนจึงเอาเมล็ดทุเรียนมาเพาะปลูกใหม่ ทำให้เกิดทุเรียนพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นมาจำนวนมาก เกิดการตั้งชื่อพันธุ์อีกมากมาย เพราะทุเรียนพันธุ์หนึ่งๆ เมื่อนำเมล็ดมาปลูกแล้วมีลักษณะดี และผิดแปลกไปจากต้นเดิมก็จะตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมา จึงเป็นไปได้ที่กลุ่มกำป็นเกิดจากการนำเมล็ดพันธุ์กบมาปลูกแล้วเกิดรสชาติและลักษณะต่างจากเดิม สอดคล้องกับงานวิจัยของฤทัยชนก และคุณพล (2554) ที่ศึกษาทุเรียนในจังหวัดนนทบุรีจำนวน 45 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี พบว่าสายพันธุ์กบตาขำและกบแม่เต่า (จัดอยู่ในกลุ่มกบ) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ชายมะไฟ (จัดอยู่ในกลุ่มกำป็น) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Vanijajiva (2012) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของทุเรียนจำนวน 14 สายพันธุ์ในจังหวัดนนทบุรีด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์พบว่า สายพันธุ์กบจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและมีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์กำป็น (จัดอยู่ในกลุ่มกำป็น)

กลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรทั้งหมดพบทั้งอำเภอท่าแซะและอำเภอบึงสามพัน ได้แก่ CH06 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH09 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH11 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH12 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH13 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH14 (ต.ท่าแซะ อ.ท่าแซะ) CH17 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) CH18 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) CH19 (ต.ทะเลทรัพย์ อ.ปะทิว) CH20 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH28 (ต.หงษ์เจริญ อ.ท่าแซะ) CH37 (ต.รับร้อ อ.ท่าแซะ) CH40 (ต.สะพลี อ.ปะทิว) และ CH41 (ต.ชุมโค อ.ปะทิว) จึงเป็นไปได้ว่าตัวอย่างเหล่านี้มีพันธุกรรมแตกต่างจากทุเรียนที่เก็บรวบรวมในศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี จากการสอบถามข้อมูลจากเจ้าของบ้านพบว่าในแต่ละตัวอย่างจะมีลักษณะลำต้นสูงใหญ่อายุตั้งแต่ 20 ถึง 30 ปี เกิดจากการนำเมล็ดมาเพาะปลูก ลักษณะผลมีขนาดเล็กถึงปานกลาง ลักษณะเนื้อเป็นเนื้อทุเรียนบ้านคือ เนื้อมีสีเหลืองอ่อนค่อนข้างซีด เนื้อน้อย เนื้อละเอียด เส้นใยน้อย กลิ่นไม่แรง รสชาติหวานมัน และเมล็ดมีขนาดใหญ่

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ CH15 (ต.ท่าข้าม อ.ท่าแซะ) และ CH16 (ต.นากระตาม อ.ท่าแซะ) มีพันธุกรรมที่ต่างจากกลุ่มอื่น เนื่องจากตัวอย่าง CH15 เป็นต้นทุเรียนโบราณที่มีอายุประมาณ 62 ปี ลำต้นสูงใหญ่ ผลมีขนาดเล็ก และเนื้อมีสีเหลืองอ่อน และตัวอย่าง CH16 ต้นสูงใหญ่ ผลมีขนาดเล็ก รสหวาน และเนื้อมีสีเหลืองอ่อน และกลุ่มที่ 5 ต้นใหญ่กลางสวน (DZ40) ที่แยกกลุ่มออกมาชัดเจนซึ่งอาจเป็นทุเรียนคนละสปีชีส์ แสดงดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ร่วมกันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ โดยการจัดกลุ่มแบบวิธี UPGMA

ทั้งนี้จากผลการจัดกลุ่มทุเรียนด้วยการวิเคราะห์ร่วมกันของ 2 เครื่องหมายโมเลกุลพบว่า สายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มทองย้อย คือนมสวรรค์ (DZ06) ทองย้อยเดิม (DZ28) และนกหยิบ (DZ39) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ในกลุ่มที่ 1) และพบว่าในกลุ่มที่ 3 ที่เป็นตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพร ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างในพื้นที่ตำบลรือร้อ อำเภอกาบัง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือตัวอย่าง CH06, CH09, CH11, CH12, CH13, CH20 และ CH37 แสดงให้เห็นว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างทุเรียนได้ชัดเจนขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของฮูตา (2556) ที่วิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนบ้านภาคใต้ 5 จังหวัด จำนวน 67 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีและเอสเอสอาร์พบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ร่วมกันของ 2 เครื่องหมายโมเลกุล สามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนได้ 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างทุเรียนในอำเภอกาบัง จากผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ร่วมกันของทั้ง 2 เครื่องหมายโมเลกุลสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนได้ดี เช่นเดียวกับการศึกษาในพืชกลุ่มบัว (*Nelumbo*) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และเอสอาร์เอพีพบว่า เมื่อวิเคราะห์ร่วมกันของ 2 เครื่องหมายโมเลกุลสามารถแยกกลุ่มตัวอย่างบัวที่เป็นลักษณะพืชผสมได้อย่างชัดเจน (Yang *et al.*, 2012)

เมื่อดูความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพี เอสเอสอาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกันพบว่า บางตัวอย่างในจังหวัดชุมพรมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับตัวอย่างทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีในกลุ่มกำปัน กลุ่มทองย้อย กลุ่มกบ และกลุ่มก้านยาว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการเคลื่อนย้ายเมล็ดทุเรียนจากแหล่งหนึ่งมาปลูกในอีกพื้นที่หนึ่ง เช่น นำเมล็ดกบขายน้ำ (DZ37) มีประวัติที่เกิดมาจากการเพาะเมล็ดพันธุ์กบ แหล่งที่ค้นพบจังหวัดนนทบุรี (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) ซึ่งมีลักษณะพันธุ์ที่ดี รสชาติอร่อย จึงอาจมีการนำเมล็ดลงไปปลูกที่จังหวัดชุมพรทำให้มีพันธุกรรมคล้ายกัน และมีบางตัวอย่างในจังหวัดชุมพรที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบเฉพาะ เนื่องจากทุเรียนมีการปลูกมาตั้งแต่สมัยอยุธยาซึ่งเริ่มมีการนำทุเรียนเข้ามาปลูกครั้งแรกทางภาคใต้ (เกศินี, 2528) ทำให้มีพันธุกรรมแยกกลุ่มออกมาชัดเจน

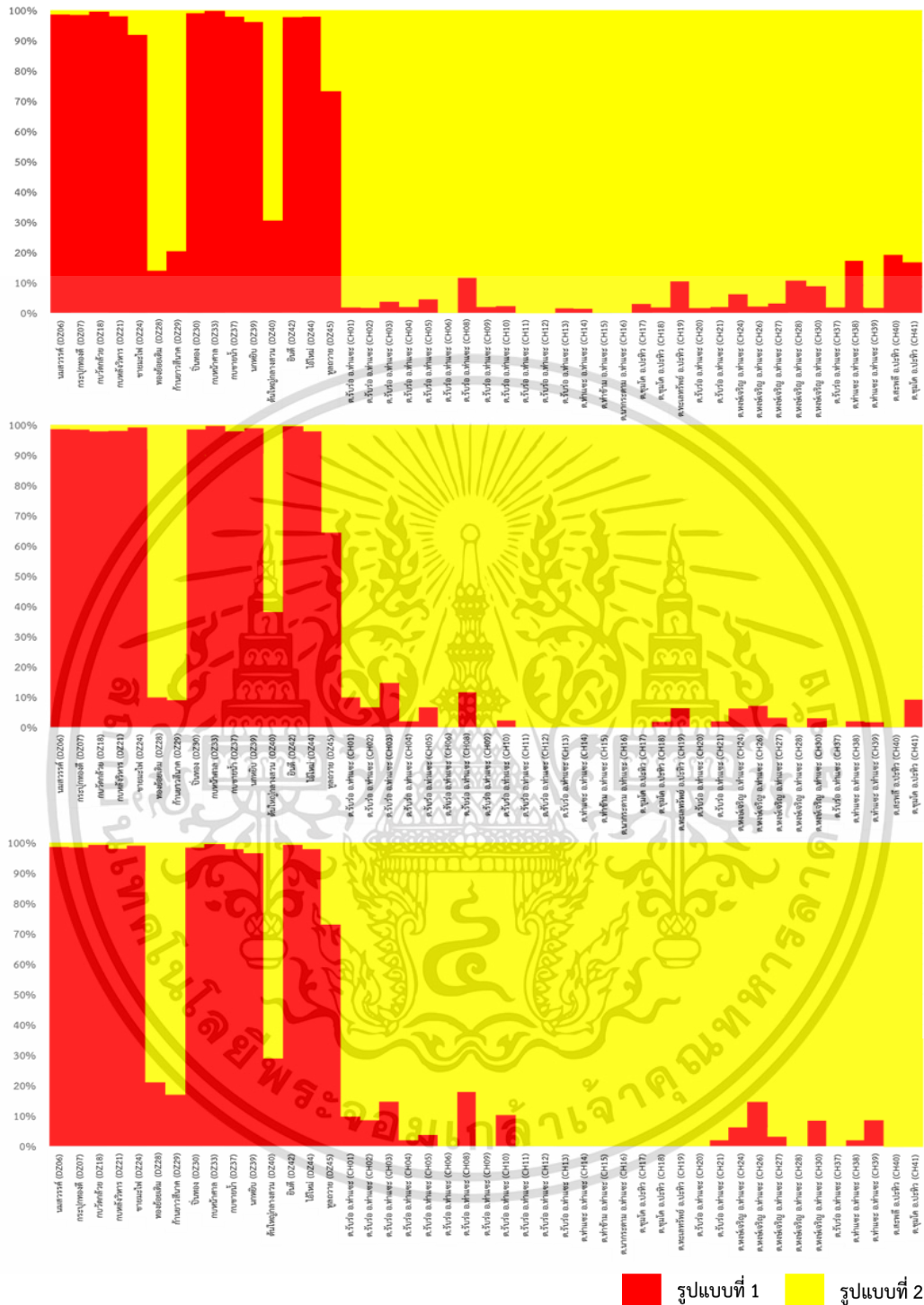
สำหรับตัวอย่างที่ไม่ทราบสายพันธุ์ คือ DZ40 จากการวิเคราะห์แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพี เอสเอสอาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกัน จะเห็นได้ว่า DZ40 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่ทราบสายพันธุ์แยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจนจึงคาดว่าน่าจะเป็นทุเรียนคนละสปีชีส์ แต่เมื่อทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาเปรียบเทียบในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology (NCBI) พบว่า DZ40 มีความเหมือนกับทุเรียนสปีชีส์ *Durio zibethinus* ที่ค่า identity 99 เปอร์เซ็นต์ จึงกล่าวได้ว่าตัวอย่าง DZ40 เป็นทุเรียนสปีชีส์เดียวกับตัวอย่างอื่นๆ ซึ่ง DZ40 ที่แยกกลุ่มออกมาเนื่องจากเป็นต้นทุเรียนที่สูงใหญ่อาจเป็นไปได้ว่าเป็นต้นทุเรียนโบราณเช่นเดียวกันกับตัวอย่าง CH15

4.5 ผลการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เอพี เอสเอสอาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกันด้วยโปรแกรม STRUCTURE version 2.3 ทำการจัดกลุ่มประชากร (population) เป็น 2 กลุ่มประชากร โดยกลุ่มประชากรแรก คือตัวอย่างทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง และกลุ่มประชากรที่สอง คือตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรจำนวน 30 ตัวอย่าง

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่าง แสดงผลออกมาในรูปแบบภูมิโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า มีค่า K เท่ากับ 2 สามารถแบ่งโครงสร้างทางพันธุกรรมได้ 2 รูปแบบ ดังรูปที่ 4.9 จากผลการศึกษาพบว่าทั้ง 2 รูปแบบมีโครงสร้างพันธุกรรมแยกค่อนข้างชัดเจน โดยพันธุกรรมรูปแบบที่ 1 (สีแดง) เป็นตัวอย่างทุเรียนจากจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีและพันธุกรรมรูปแบบที่ 2 (สีเหลือง) เป็นตัวอย่างทุเรียนจังหวัดชุมพร ซึ่งอาจมีพันธุกรรมปะปนกันเล็กน้อย ยกเว้นทองย้อยเดิม (DZ28) ก้านยาวสีนาค (DZ29) และต้นใหญ่กลางสวน (DZ40) มีการปะปนของลักษณะพันธุกรรมรูปแบบที่ 2 ค่อนข้างสูง โดยเฉพาะทองย้อยเดิมและก้านยาวสีนาค แสดงให้เห็นว่าอาจจะเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการปลูกมาเป็นเวลานาน จึงมีลักษณะพันธุกรรมคล้ายกับทุเรียนจากจังหวัดชุมพร ในขณะที่มีตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรที่มีการปะปนของลักษณะพันธุกรรมรูปแบบที่ 1 อาจเกิดการผสมพันธุ์กันตามธรรมชาติ หรือมีการนำเมล็ดทุเรียนลงไปปลูกที่ชุมพร จึงทำให้มีโอกาสที่ลักษณะพันธุกรรมคล้ายกัน (Riupassa *et al.*, 2015) ส่วนตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรที่ไม่มีการปะปนของพันธุกรรมรูปแบบที่ 1 มีความเป็นไปได้ที่เป็นทุเรียนที่มาจากแหล่งพันธุกรรมจากภาคใต้ เนื่องจากประวัติของทุเรียนกล่าวไว้ว่ามีการปลูกครั้งแรกทางภาคใต้ด้วยเมล็ดเพราะกิ่งพันธุ์หายาก จึงคาดว่ามีการเคลื่อนย้ายเมล็ดจากประเทศมาเลเซียหรืออินโดนีเซียที่เป็นต้นกำเนิดของทุเรียนเข้ามาทางภาคใต้ของประเทศไทย

จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่ามี 5 ตัวอย่าง คือ CH06, CH11, CH12, CH15 และ CH16 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เอสเอสอาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกัน พบว่าตัวอย่างเหล่านี้ไม่มีการผันแปรทางพันธุกรรม ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มของทุเรียนจากจังหวัดชุมพรที่คาดว่า เป็นทุเรียนพื้นเมืองที่มีแหล่งพันธุกรรมจากภาคใต้โดยเฉพาะจึงมีรูปแบบของโครงสร้างพันธุกรรมแยกชัดเจน



รูปที่ 4.9 แผนภูมิแสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย (ก) เครื่องหมายไมเลกุลเอสอาร์เอพี (ข) เครื่องหมายไมเลกุลเอสเอสอาร์ และ (ค) 2 เครื่องหมายร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำข้อมูลของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เอสเอสอาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกันมา วิเคราะห์ความหลากหลายของกลุ่มประชากรทุเรียนด้วยโปรแกรม ARLEQUIN แสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบ AMOVA ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (G_{ST} หรือ F_{ST}) ตามแนวคิดของ Wright (1978) แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (AMOVA) ของกลุ่มประชากรทุเรียนด้วย เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เอสเอสอาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกัน

ชนิดเครื่องหมายโมเลกุล	Source of variation	Percentage of variation (%)	Coefficient of gene differentiation (G_{ST})
เอสอาร์เอพี	ระหว่างกลุ่มประชากร	23.13	0.1511
	ภายในกลุ่มประชากร	76.87	
เอสเอสอาร์	ระหว่างกลุ่มประชากร	19.57	0.1943
	ภายในกลุ่มประชากร	80.43	
2 เครื่องหมายร่วมกัน	ระหว่างกลุ่มประชากร	20.73	0.1668
	ภายในกลุ่มประชากร	79.27	

จากตารางที่ 4.5 พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร (among populations) น้อย และเกิดความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากร (within populations) มาก ที่เป็นเช่นนี้เพราะเป็นตัวอย่างทุเรียนเหมือนกันจึงมีความต่างทางพันธุกรรมน้อยแต่มีความแปรปรวนภายในสายพันธุ์ทุเรียนด้วยตัวเอง เนื่องจากเมื่อนำทุเรียนพันธุ์หนึ่งๆ มาเพาะเมล็ดได้ลักษณะที่ผิดแปลกไปจากเดิม และมีคุณลักษณะที่ตึกจะนำมาตั้งชื่อพันธุ์ใหม่ทำให้ทุเรียนมีหลากหลายสายพันธุ์ และพบว่ามีค่า G_{ST} คล้ายคลึงกันซึ่งแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมตามแนวคิดของ Wright (1978) ได้ระดับสูง โดยประวัติของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละบ้านใน 2 อำเภอของจังหวัดชุมพรมีภูมิหลังการขยายพันธุ์โดยการปลูกด้วยเมล็ด จึงทำให้เกิดความหลากหลายของทุเรียนที่ใช้ศึกษาในระดับสูง ผลงานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Riupassa *et al.* (2015) ได้ค่า G_{ST} เท่ากับ 0.2308 พบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ระดับสูง เนื่องจากตัวอย่างทุเรียนนี้มีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ตามธรรมชาติจึงเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง

เมื่อเทียบงานวิจัยในพืชชนิดอื่นของ Chen *et al.* (2014) ได้ศึกษาความหลากหลายในดอกแมกโนเลีย (*Magnolia wufengensis*) 10 กลุ่มประชากรจากประเทศจีนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี ได้ค่า G_{ST} เท่ากับ 0.171 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากพืชนี้มีการขยายพันธุ์ด้วยการผสมเกสรจากแมลงตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศจึงมีค่าความหลากหลาย

ทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้มีการศึกษาในมะม่วง (*Mangifera indica*) จำนวน 112 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีจากประเทศบราซิล พบว่าได้ค่า G_{ST} เท่ากับ 0.035 แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ เนื่องจากมะม่วงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการตอนกิ่งหรือทาบกิ่ง (Gálvez-López *et al.*, 2009) และมีการศึกษาความหลากหลายในทับทิม (*Punica granatum* L.) จำนวน 63 ตัวอย่างในประเทศอิหร่านด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี พบว่าได้ค่า G_{ST} เท่ากับ 0.025 แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เนื่องจากตัวอย่างที่ศึกษาเก็บมาจากศูนย์ที่รวบรวมสายพันธุ์จึงเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ (Soleimani *et al.*, 2012)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน คือการเลือกความแตกต่างของกลุ่มประชากรและจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษา รวมถึงภูมิหลังของการขยายพันธุ์พืชแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยครั้งนี้และการทบทวนงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า พืชที่ปลูกในเชิงเศรษฐกิจนิยมขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการต่อกิ่งและการทาบกิ่งซึ่งเป็นการดำรงลักษณะที่ดีของพืชนั้นไว้ ทำให้มีค่าความหลากหลายหรือความแตกต่างพันธุกรรมในระดับที่ต่ำ (Wang *et al.*, 2011) ในขณะที่พืชที่มีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติด้วยการผสมข้ามพันธุ์ การแพร่กระจายพันธุ์ด้วยเมล็ดพบว่า มีความหลากหลายหรือความแตกต่างพันธุกรรมในระดับที่สูง (Hamrick, 1989; Zhang *et al.*, 2012)

โดยพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของพืชสัมพันธ์กับประวัติและวิวัฒนาการของพืชชนิดนั้นๆ จึงส่งผลให้เกิดกระจายตัวของความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรรวมไปถึงโครงสร้างประชากรอีกด้วย (Hamrick, 1987) นอกจากนี้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรเกิดได้จากสภาพแวดล้อม การคัดเลือกโดยธรรมชาติ ภูมิหลังทางประวัติศาสตร์ การขยายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ (Hamrick and Godt, 1996) โดยทุเรียนจัดเป็นพืชที่มีการผสมข้ามพันธุ์ตามธรรมชาติ ทำให้มีพันธุกรรมแบบพันทาง (Heterogeneous) ซึ่งเป็นผลต่อการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียน (ทรงพล, 2553)

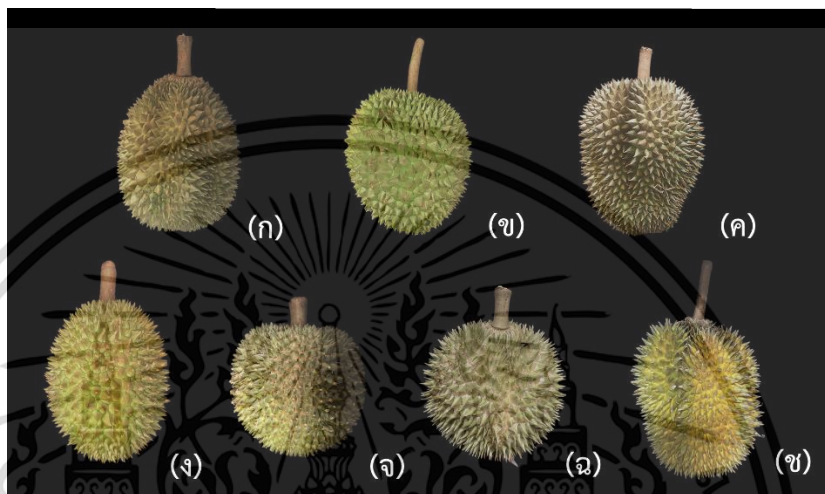
4.6 ผลการศึกษาข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพผลที่มีความสำคัญทาง

เศรษฐกิจ

ทำการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์คุณภาพผลของทุเรียนบ้านในพื้นที่อำเภอปะทิวและอำเภอกำแพงเจ็ดตัวจังหวัดชุมพร ซึ่งบางตัวอย่างไม่มีผลทุเรียนจึงได้ตัวอย่างทุเรียนมาศึกษาเพียง 22 ตัวอย่าง ได้แก่ CH01, CH02, CH04, CH05, CH08, CH10, CH11, CH12, CH13, CH14, CH16, CH17, CH19, CH20, CH21, CH24, CH27, CH28, CH30, CH38, CH40 และ CH41

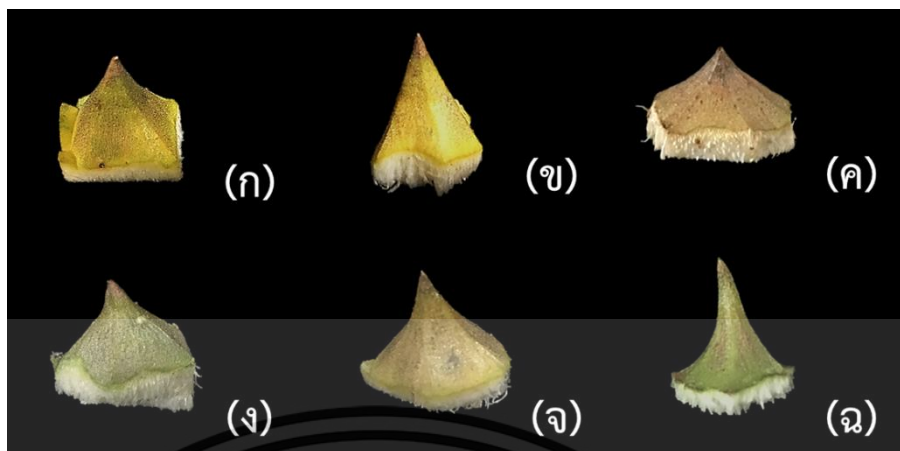
จากตัวอย่างทั้ง 22 ตัวอย่าง สามารถแบ่งลักษณะของรูปร่างทรงผล รูปร่างหนาม สีเนื้อ และรูปร่างเมล็ดได้ซึ่งเป็นลักษณะภายนอกที่ปรากฏเด่นชัด เมื่ออาศัยลักษณะรูปร่างทรงผลสามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนได้ 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีทรงผลรูปไข่ (ovoid) พบ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CH01 และ CH20 คิดเป็น 9.09 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีทรงผลรูปไข่กลับ (obovoid) พบ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CH02 และ CH05 คิดเป็น 9.09 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีทรงผลรูปรี (eliptic) มี 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CH11 และ CH12 คิดเป็น 9.09 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีทรงผลทรงรี (oval) พบ 9 ตัวอย่าง ได้แก่ CH10, CH19, CH21, CH24, CH27, CH28, CH30,

CH40 และ CH41 คิดเป็น 40.91 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีทรงผลกลมแป้น (oblate) พบ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CH04 และ CH16 คิดเป็น 9.09 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีทรงผลกลม (globose) พบ 4 ตัวอย่าง ได้แก่ CH08, CH13, CH14 และ CH17 คิดเป็น 18.18 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่มีทรงผลขอบขนาน (oblong) พบ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ CH38 คิดเป็น 4.55 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่าทุเรียนที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างทรงผลเป็นทรงรี แสดงดังรูปที่ 4.10



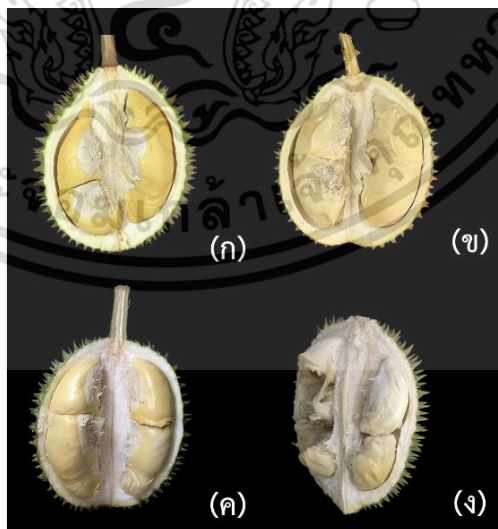
รูปที่ 4.10 ลักษณะรูปร่างทรงผลทุเรียน (ก) ผลรูปไข่ (ovoid) (ข) ผลรูปไข่กลับ (obovoid) (ค) ผลรูปรี (elliptic) (ง) ผลทรงรี (oval) (จ) ผลกลมแป้น (oblate) (ฉ) ผลกลม (globose) และ (ช) ผลขอบขนาน (oblong)

หากจัดกลุ่มทุเรียนโดยอาศัยลักษณะรูปร่างหนามทุเรียนสามารถแบ่งได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ พีระมิด (pyramidal) พบ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ CH20 คิดเป็น 4.55 เปอร์เซ็นต์ ทรงกรวย (conical) พบ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ CH02 คิดเป็น 4.55 เปอร์เซ็นต์ นูน (convex) พบ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CH01 และ CH24 คิดเป็น 9.10 เปอร์เซ็นต์ นูนปลายแหลม (pointed-convex) พบ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CH05 และ CH12 คิดเป็น 9.10 เปอร์เซ็นต์ เว้า (concave) พบ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ CH04, CH10, CH21, CH38 และ CH41 คิดเป็น 22.72 เปอร์เซ็นต์ และเว้าปลายแหลม (pointed-concave) พบ 11 ตัวอย่าง ได้แก่ CH08, CH11, CH13, CH14, CH16, CH17, CH19, CH27, CH28, CH30 และ CH40 คิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่าทุเรียนที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างหนามเว้าปลายแหลม (pointed-concave) แสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ลักษณะรูปร่างนามทุเรียน (ก) พีระมิด (pyramidal) (ข) ทรงกรวย (conical) (ค) นูน (convex) (ง) นูนปลายแหลม (pointed-convex) (จ) เว้า (concave) และ (ฉ) เว้าปลายแหลม (pointed-concave)

เมื่ออาศัยลักษณะสีเนื้อทุเรียนสามารถแบ่งได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีเนื้อสีเหลืองเข้ม (dark yellow) พบ 7 ตัวอย่าง ได้แก่ CH01, CH02, CH04, CH10, CH24, CH38 และ CH41 คิดเป็น 31.82 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีเนื้อสีเหลือง (yellow) พบ 7 ตัวอย่าง ได้แก่ CH05, CH08, CH11, CH19, CH20, CH21 และ CH27 คิดเป็น 31.82 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีเนื้อสีเหลืองอ่อน (light yellow) พบ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ CH12, CH14, CH16, CH28 และ CH30 คิดเป็น 22.73 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่มีเนื้อสีซีดขาว (pale yellow) พบ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ CH13, CH17 และ CH40 คิดเป็น 13.64 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษพบว่าทุเรียนที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่มีสีเนื้อเป็นสีเหลือง (yellow) แสดงดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 ลักษณะสีเนื้อทุเรียน (ก) เนื้อสีเหลืองเข้ม (dark yellow) (ข) เนื้อสีเหลือง (yellow) (ค) เนื้อสีเหลืองอ่อน (light yellow) และ (ง) เนื้อสีซีด (pale yellow)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อจัดกลุ่มทุเรียนโดยอาศัยลักษณะรูปร่างเมล็ดสามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีรูปกลมรี (spheroid) พบ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ CH04, CH16 และ CH40 คิดเป็น 13.64 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่มีรูปขอบขนาน (oblong) พบ 6 ตัวอย่าง ได้แก่ CH08, CH14, CH19, CH24, CH28 และ CH41 คิดเป็น 27.28 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่มีรูปกลมรีเหมือนไข่ (ellipsoid) พบ 13 ตัวอย่าง ได้แก่ CH01, CH02, CH05, CH10, CH11, CH12, CH13, CH17, CH20, CH21, CH27, CH30 และ CH38 คิดเป็น 59.10 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่าทุเรียนที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างเมล็ดเป็นรูปกลมรีเหมือนไข่ (ellipsoid) แสดงดังรูปที่ 4.13

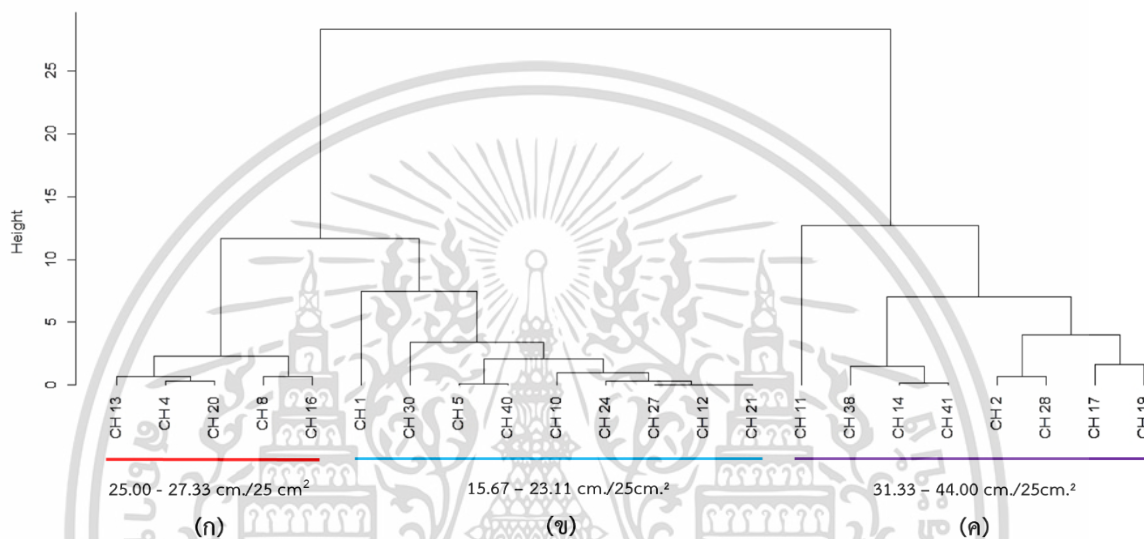


รูปที่ 4.13 ลักษณะรูปร่างเมล็ดทุเรียน (ก) รูปกลมรี (spheroid) (ข) รูปขอบขนาน (oblong) และ (ค) รูปกลมรีเหมือนไข่ (ellipsoid)

ผลการศึกษาพบว่าทรงผลที่พบมาก คือทรงรี ทรงหนามที่พบมาก คือเว้าปลายแหลม สีเนื้อที่พบมาก คือสีเหลือง และรูปร่างเมล็ดที่พบมาก คือรูปกลมรีเหมือนไข่ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ ฮูตา (2556) ที่ศึกษาความหลากหลายของรูปร่างทรงผล รูปร่างหนาม และสีเนื้อในทุเรียนบ้านทางภาคใต้ พบว่ารูปร่างทรงผลที่พบมาก คือทรงรี จึงกล่าวได้ว่าทุเรียนบ้านภาคใต้ส่วนใหญ่มีลักษณะทรงผลเป็นทรงรี สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของทุเรียนจำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณ Total soluble solids หรือค่าความหวานอยู่ในช่วง 14.51 ถึง 31.25 %brix โดยตัวอย่าง CH17 มีค่าความหวานน้อยที่สุด และตัวอย่าง CH41 มีค่าความหวานมากที่สุด ปริมาณแป้งอยู่ในช่วง 0.1424 ถึง 0.4579 กรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่าง CH04 มีปริมาณแป้งน้อยที่สุด และตัวอย่าง CH41 มีปริมาณแป้งมากที่สุด ปริมาณเส้นใยอยู่ในช่วง 0.50 ถึง 5.74 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่าง CH13 มีปริมาณเส้นใยน้อยที่สุด และตัวอย่าง CH30 มีปริมาณเส้นใยมากที่สุด ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์พบว่า ตัวอย่าง CH16 มีปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์น้อยที่สุด และตัวอย่าง CH41 ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์มากที่สุด

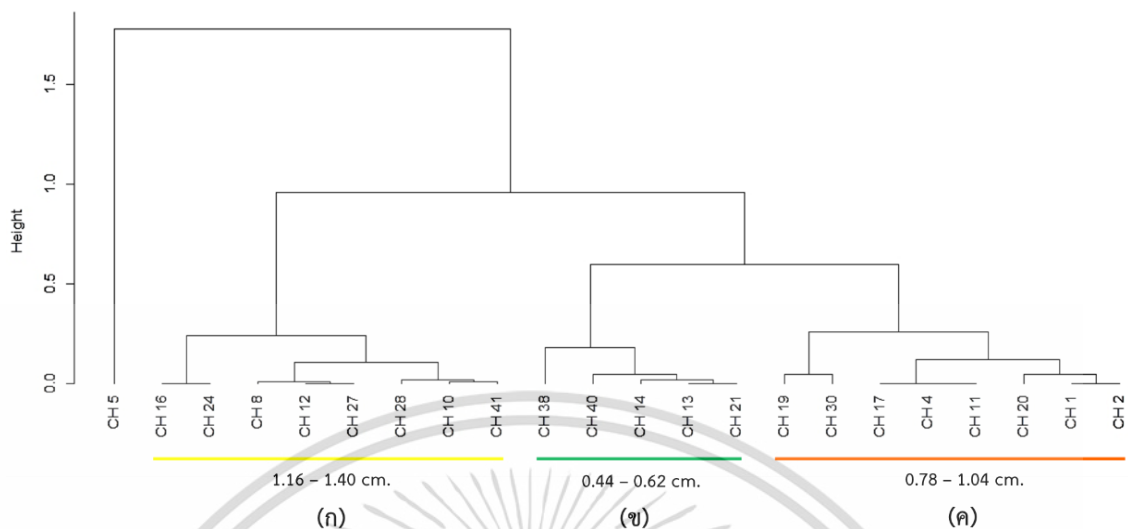
เมื่อนำข้อมูลทางสถิติฐานวิทยาที่บันทึกตามแบบฟอร์มและข้อมูลคุณภาพผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R studio เพื่อใช้ในการตัดสินใจหรือใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกคุณลักษณะที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ ซึ่งจะแสดงผลออกมาในรูปของแผนภาพต้นไม้พบว่า แต่ละข้อมูลไม่มีความสัมพันธ์กับแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเออาร์เอฟไอเอสเออาร์ และ 2 เครื่องหมายร่วมกัน เนื่องจากตัวอย่างทุเรียนมีการกระจายปะปนกัน เป็นเพราะในการปลูกทุเรียนนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยของสภาพภูมิอากาศ สภาพแวดล้อม และความอุดมสมบูรณ์ซึ่งมีผลต่อ

กระบวนการพัฒนาของผลทุเรียน (ศิริพร, 2559) เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกที่ปรากฏ เช่น ข้อมูลความหนาแน่นของหนาม เมื่อใช้โปรแกรม R studio สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (ก) มีความหนาแน่นหนามอยู่ในช่วง 25.00 ถึง 27.33 เซนติเมตรต่อ 25 ตารางเซนติเมตร กลุ่ม (ข) มีความหนาแน่นหนามอยู่ในช่วง 15.67 ถึง 23.11 เซนติเมตรต่อ 25 ตารางเซนติเมตร และกลุ่ม (ค) มีความหนาแน่นหนามอยู่ในช่วง 31.33 ถึง 44.00 เซนติเมตรต่อ 25 ตารางเซนติเมตร แสดงดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 แผนภาพต้นไม้ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลความหนาแน่นของหนามทุเรียนจำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม R studio

เช่นเดียวกับข้อมูลความหนาของเปลือกพบว่า จัดกลุ่มตัวอย่างทุเรียนออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม (ก) มีความหนาของเปลือกอยู่ในช่วง 1.16 ถึง 1.40 เซนติเมตร กลุ่ม (ข) มีความหนาของเปลือกอยู่ในช่วง 0.44 ถึง 0.62 เซนติเมตร และกลุ่ม (ค) มีความหนาของเปลือกอยู่ในช่วง 0.78 ถึง 1.04 เซนติเมตร พบว่าไม่มีความสัมพันธ์เช่นกัน แสดงดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แผนภาพต้นไม้ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลความหนาของเปลือกทุเรียนจำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม R studio

ยกเว้นข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาในส่วนของรูปร่างทรงผล รูปร่างหนาม รูปร่างเมล็ด และสีเนื้อที่ค่อนข้างมีความสัมพันธ์กับการจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างทุเรียน คือเมื่อนำแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีร่วมกับเอสเอสอาร์มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาในส่วนของผลทุเรียนพบว่า กลุ่มที่ 1 เป็นสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มก้านยาวและกลุ่มทองย้อย รวมถึงตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรที่มีรูปแบบยีน (จีโนไทป์) เหมือนกับสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มนี้ โดยลักษณะภายนอก (ฟีโนไทป์) ที่พบมีทรงผลรูปไข่กลับ และทรงผลกลม มีรูปร่างหนามเป็นทรงนูนปลายแหลม สีเนื้อเป็นสีเหลืองจนถึงเหลืองเข้ม และรูปร่างเมล็ดมีทรงกลมรีเหมือนไข่ กลมรี และขอบขนาน กลุ่มที่ 2 เป็นสายพันธุ์ทุเรียนในกลุ่มกบและกลุ่มกำป็น รวมถึงตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพร โดยลักษณะภายนอกที่พบมีทรงผลกลม ผลรูปไข่กลับ ผลรูปรี ผลทรงรี และผลขอบขนาน มีรูปร่างหนามเป็นทรงเว้า สีเนื้อเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงเหลือง และรูปร่างเมล็ดมีทรงกลมรีเหมือนไข่ กลมรี และขอบขนาน กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 เป็นตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรที่มีรูปแบบยีนต่างออกไป โดยลักษณะภายนอกที่พบมีทรงผลกลม ผลกลมแป้น และผลทรงรี มีรูปร่างหนามเป็นทรงเว้าปลายแหลม สีเนื้อเป็นสีเหลืองซีดจนถึงเหลืองอ่อน และรูปร่างเมล็ดมีทรงกลมรีเหมือนไข่ และกลมรี แสดงให้เห็นว่าลักษณะที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มทุเรียน คือรูปร่างหนาม ซึ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรจะพบรูปร่างหนามเป็นทรงเว้าปลายแหลม โดยแต่ละกลุ่มแสดงตัวอย่างของแต่ละลักษณะดังรูปที่ 4.16

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แสดงให้เห็นว่าหากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ทุเรียนที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอ เพราะลักษณะทางฟีโนไทป์เป็นลักษณะที่มีการแสดงออกทางภายนอก มีการเปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลาเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม รวมถึงมีปัจจัยหลายอย่างต่อการเจริญของพืชชนิดทุเรียนนี้ จึงไม่สามารถใช้จัดจำแนกได้อย่างชัดเจน ขณะที่ลักษณะจีโนไทป์หรือรูปแบบยีนซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมสามารถบ่งบอกถึงพันธุกรรมของพืชชนิดนั้นๆ ได้อย่างชัดเจน (สุรินทร์, 2545) ส่งผลให้การจัดจำแนกกลุ่มทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ศึกษา ไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากทุเรียนที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนหรือใกล้เคียงกัน อาจมีจีโนไทป์ที่ต่างกันจนถูกจัดไปอยู่ในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ใกล้เคียงกัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะเกิดจากวิวัฒนาการทางประวัติศาสตร์ การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การเคลื่อนย้ายของยีน ระบบการผสมพันธุ์ และการกลายพันธุ์ (Hamrick and Godt, 1996) จึงมีโอกาสที่ลักษณะทางพันธุกรรมหรือจีโนไทป์มีความต่างกัน โดยที่ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ปรากฏอาจจะเหมือนหรือต่างกันได้



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนจำนวน 45 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ สามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีได้ 13 คู่ไพรเมอร์ และเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ 14 คู่ไพรเมอร์ นำมาศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างทุเรียนพบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 65.62 และ 71.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.76 ถึง 0.98 แบ่งกลุ่มทุเรียนออกเป็น 5 กลุ่ม (เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี) 0.67 ถึง 0.97 แบ่งกลุ่มทุเรียนออกเป็น 6 กลุ่ม (เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์) และพบว่ากลุ่มตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งพื้นที่ที่เก็บ แต่เมื่อวิเคราะห์ร่วมกันของ 2 เครื่องหมายโมเลกุล ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.72 ถึง 0.96 แบ่งกลุ่มทุเรียนเป็น 5 กลุ่ม พบว่าตัวอย่างในพื้นที่ตำบลรือ อำเภอกาบัง ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างทุเรียนได้ดีขึ้น และเมื่อดูความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของทุเรียนจากจังหวัดชุมพรพบว่า บางตัวอย่างในจังหวัดชุมพรมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับตัวอย่างทุเรียนจากศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดจันทบุรีในกลุ่มกำปัน กลุ่มทองย้อย กลุ่มกบ และกลุ่มกำนยาว และมีบางตัวอย่างจากจังหวัดชุมพรที่มีลักษณะพันธุกรรมเฉพาะจึงมีรูปแบบของโครงสร้างพันธุกรรมแยกชัดเจน และเมื่อประเมินความเป็นไปได้ของโครงสร้างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรทุเรียน (ค่า K) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE พบว่ามีโครงสร้างทางพันธุกรรม 2 รูปแบบ (K=2) และเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของกลุ่มประชากรทุเรียนด้วยโปรแกรม ARLEQUIN พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของยีน (G_{ST}) เท่ากับ 0.1511 (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี) 0.1943 (วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์) และ 0.1668 (วิเคราะห์ร่วมกันของ 2 เครื่องหมายโมเลกุล) แสดงให้เห็นว่าทุเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ระดับสูง ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการปลุกด้วยเมล็ดนั่นเอง

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในส่วนของผลพบว่า ทุเรียนที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างทรงผลเป็นทรงรี รูปร่างหนามเว้าปลายแหลม สีเนื้อเป็นสีเหลือง และรูปร่างเมล็ดเป็นรูปกลมรีเหมือนไข่ และเมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแผนภาพที่วิเคราะห์ด้วย 2 เครื่องหมายกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลคุณภาพผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพบว่า ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาในส่วนของผลค่อนข้างมีความสัมพันธ์กับการจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างทุเรียน โดยเฉพาะรูปร่างหนาม ซึ่งกลุ่มตัวอย่างทุเรียนจากจังหวัดชุมพรจะพบรูปร่างหนามเป็นทรงเว้าปลายแหลม ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์ในครั้งนี้นับเป็นงานวิจัยที่มีความสำคัญ แสดงให้เห็นว่าพืชในกลุ่มทุเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง อีกทั้งข้อมูลนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ทุเรียน อนุรักษ์พันธุกรรม รวมถึงข้อมูลคุณภาพผลทุเรียน

สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ทุเรียนได้ เช่น ผลทุเรียนจากต้น CH16 ที่เก็บจากตำบลนากระตาม อำเภอท่าแซะ มีผลขนาดเล็ก เปลือกบาง แกะง่าย มีความฉ่ำมาก หวานพอเหมาะ มีความมันเป็นครีมน้อย และกลื่นอ่อน ซึ่งมีลักษณะพันธุ์ดี สามารถพัฒนาในเรื่องการปลูกและการเก็บเกี่ยวให้ง่ายขึ้นเพื่อส่งเสริมเป็นสายพันธุ์การค้าได้ในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในอนาคตสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีและเอสเอสอาร์มาประยุกต์ใช้ในการหาความสัมพันธ์ ความหลากหลาย รวมถึงนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบในทุเรียนได้ อย่างไรก็ตามควรใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นๆ มาศึกษาเพิ่มเติม เช่น เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี ซึ่งอาจให้ข้อมูลที่ละเอียดหรือแตกต่างกับงานวิจัยครั้งนี้ อีกทั้งควรเพิ่มตัวอย่างให้มีความครอบคลุมทั่วพื้นที่ในจังหวัดชุมพร และอาจเพิ่มพื้นที่ทางภาคใต้ในจังหวัดอื่นๆ เนื่องจากภาคใต้เป็นแหล่งความหลากหลายของทุเรียนบ้านจำนวนมาก และควรเพิ่มตัวอย่างทุเรียนเศรษฐกิจให้มากขึ้นเพื่อให้การวิเคราะห์เป็นไปอย่างสมบูรณ์



เอกสารอ้างอิง

- เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2528. **ไม้ผลเมืองร้อน**. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2546. **การจัดจำแนกไม้ผล**. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กรมวิชาการเกษตร. 2553. **การผลิตทุเรียนอย่างถูกต้องและเหมาะสม**. [Online]. Available : <http://www.soclaimon.Wordpress.com/2010/06/14.html>.
- ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์ วิภาวิ ชั้นโรจน์ สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง สิริโชค ตั้งภัสสรเรื่อง และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2552. “การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันจากเหมืองข้อมูล ESTs.” หน้า 110-118. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 16**. ปทุมธานี : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต.
- ฐิตาภรณ์ สุขโหด อินทิรา จารุเพ็ง ประไพ โมจรินทร อภิรดี เพิ่มผล อรุณนี สระเกา ศิริวรรณ เทียนมงคล ปิยรัชฎ์ ปริญญาพงษ์ และพรชัย จุฑามาศ. 2554. “การจัดจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus* Merr.) โดยใช้เทคนิค AFLP.” หน้า 405-410. ใน **การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย : สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว**. ปทุมธานี : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต.
- ณัฐกุล ถิ่นหัวเตย สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม พรรณิภา ย้วยล และโองการ วณิชชิวะ. 2559. “การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล SRAP สำหรับระบุสายพันธุ์ทุเรียน (*Durio zibethinus*).” **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 47(2) (พิเศษ) : 241-244.
- ฤทัยชนก กิตติวิโรตม และคณพล จุฑามณี. 2554. “การตรวจสอบพันธุ์ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค AFLP.” หน้า 1-9. ใน **การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทรงพล สมศรี. 2551. **ทุเรียนไทยกับการปรับปรุงพันธุ์: กรณีการศึกษาพันธุ์จันทบุรี 1 จันทบุรี 2 จันทบุรี 3**. กรุงเทพฯ : สำนักผู้เชี่ยวชาญกรมวิชาการเกษตร.
- ทรงพล สมศรี. 2553. **รายงานแผนงานวิจัยการศึกษาและพัฒนาทุเรียน**. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- นารี เอี่ยมวิวัฒน์กิจ ชูเรืองสุข. 2554. **ทุเรียนบ้านต้นไม้จากรุ่นปู่ย่าควรรค่าอนุรักษ์ไว้**. [Online]. Available : <https://www.gotoknow.org/posts/454271>.
- เบญจวรรณ รัตวัตร ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก และพินิจ หวังสมนึก. 2554. “การศึกษาพันธุกรรมมันสำปะหลังบางพันธุ์ในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR.” หน้า 564-571. ใน **The Graduate Research Conference ครั้งที่ 12**. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปณาลี ภูวรงค์ชัย สราวุฒิ เกตุแก้ว เขมวรรณ ศรีตงกิม บุปผา คงสมัย และอัญมณี อาวุชานนท์. 2551. “การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP และลักษณะคุณภาพผลของฟักทองพันธุ์การค้าของไทยบางพันธุ์.” หน้า 1100-1106. ใน **การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9**. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์ จิตตาภรณ์ ภูมิไชย์ อินทิตรา จารุเพ็ง อรชร โชติญาณวงษ์ ประไพ โมจรินทร์ และพรชัย จุฑามาศ. 2552. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์.” หน้า 25-27. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16. ปทุมธานี : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต.
- พิจิตร โชติวัฒนา. 2542. **คู่มือการปลูกทุเรียน**. กรุงเทพฯ : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน.
- วาริน วรรณประไพ. 2545. “การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจสอบยาลูกกราด ยางพลวง และยางที่คาดว่าเป็นลูกผสม.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริพร วรกุลดำรงชัย. 2559. “การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศต่อการผลิตไม้ผล (ทุเรียน มังคุด).” [Online]. Available : <https://www.kehakaset.com/file/.pdf>.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมวงศ์ ตระกูลรุ่ง. 2540. “Molecular marker technology.” หน้า 122-129. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ National Training Course on Crop Improvement by Using Mutation Technique and Biotechnology. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ. 2544. **ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืชทุเรียน**. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. **ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร-ทุเรียน**. [Online]. Available : <http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/durian.pdf>.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ สุขวัฒน์ จันทรปรณิก และเสริมสุข สลักเพ็ชร. 2546. **เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2551. “ทุเรียน.” **สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฉบับเสริมการเรียนรู้**. เล่มที่ 10 : 89-125.
- อรพินธุ์ สฤชดีน้ำ. 2559. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์.” *แก่นเกษตร*. (44)1 : 147-152.
- ฮูตา แก้วศรีสม. 2556 “การศึกษาพันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้าน (*Durio zebithinus* Murr.) ในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- ฮูดา แก้วศรีสม กรกช นาคคะนอง และจรัสศรี นวลศรี. 2557. “การวิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้านในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์.” *แก่นเกษตร*. 42(3) : 271-276.
- Abedian, M. Talebi, M. Golmohammadi, H.R. and Sayed-Tabatabaei, B.E. 2012. “Genetic diversity and population structure of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP markers.” *Biochemical Systematics and Ecology*. 40 : 112-117.
- Chaoguang, Y. Yunlong, Y. David, L. Zhiguo, L. and Jianhua, X. 2016. “Morphological characters and SRAP analysis of two hybrids between *Hibiscus dasycalyx* and *Hibiscus* ‘Moy Grande’.” *Scientia Horticulturae*. 198 : 118-124.
- Chen, S. Zhou J. Chen, Q. Chang, Y. Du, J. and Meng, H. 2013 “Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm by SRAP.” *Biochemical Systematics and Ecology*. 50 : 139-146.
- Chen, L. Chen, F. He, S. and Ma, L. 2014. “High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers.” *Electronic Journal of Biotechnology*. 17: 268-274.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.” *Phytochemical Bulletin*. 19 : 11-15.
- Du, F. Jiang, J. Jia, H. Zhao, X.Y. Wang, W.H. Gao, Q.K. Mao, W.H. Wu, Y. Zhang, L. Grierson, D. Xia, Y.P. and Gao, Z.S. 2015. “Selection of generally applicable SSR markers for evaluation of genetic diversity and identity in *Lilium*.” *Biochemical Systematics and Ecology*. 61 : 278-285.
- Earl, D.A. and Vonholdt, B.M. 2012. “STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method.” *Conservation Genetics Resources*. 4 : 359-361.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. “Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.” *Molecular Ecology Resources*. 10 : 564-567.
- Falush, D. Stephens, M. and Pritchard, J.K. 2007. “Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles.” *Molecular Ecology*. 7 : 574-578.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Ferriol, M. Pico, B. and Nuez, F. 2003. "Genetic diversity of a germplasm collection *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers." *Theoretical and Applied Genetics*. 107 : 271-282.
- Ga'lvéz-Lo'pez, D. Hernández-Delgado, S. González-Paz, M. Becerra-Leor, E.N. Salvador-Figueroa, M. and Mayek-Pérez, N. 2009. "Genetic analysis of mango landraces from Mexico based on molecular markers." *Plant Genetic Resources*. 7 : 244-251.
- Gulsen, O. Uzun, A. Canan, I. Seday, U. and Canihos, E. 2010. "A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers." *Euphytica*. 173 : 265-277.
- Hamrick, J.L., 1987. Gene flow distribution of genetic variation in plant populations and Differentiation Patterns in Higher Plants. Academic Press, New York.
- Hamrick, J.L., 1989. Allozyme diversity in plant species and plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sunderland, Mass, pp. 43-46.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1996. "Effect of life history traits on genetic diversity in plant species." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 351 : 1291-1298.
- Handayani, F. and Rahayu, S.P. 2017. "Assessment of genetic diversity in Lai (*Durio kutejensis*) local cultivars of Batuah (Indonesia) using ISSR marker." *Biodiversitas*. 18(2) : 525-529.
- Hariyati, T. Kusnadi, J. and Arumingtyas, E.L. 2013. "Genetic diversity of hybrid durian resulted from cross breeding between *Durio kutejensis* and *Durio zibethinus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)." *American Journal of Molecular Biology*. 3 : 153-157.
- Ince, A.G. Karaca, M. and Onus, A.N. 2010. "Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species." *Plant Molecular Biology Reporter*. 28 : 285-291.
- Jakobsson, M. and Rosenberg, N.A. 2007. "CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure." *Bioinformatics*. 23 : 1801-1806.
- Karaca, M. Ince, A.G. Elmasulu, S.Y. Onus, A.N. and Turgut, K. 2005. "Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants." *Anal Biochem*. 343 : 353-355.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Li, G. and Quiros, C.F. 2001. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*." *Theoretical and Applied Genetics*. 103 : 455-461.
- Macmillan, H.F. 1949. **Tropical Planting and Gardening**. Macmillan and Co. Ltd, London. 560 p.
- Meng, F. Liu, L. Peng, M. Wang, Z. Wang, C. and Zhao, Y. 2015. "Genetic diversity and population structure analysis in wild strawberry (*Fragaria nubicola* L.) from Motuo in Tibet Plateau based on simple sequence repeats (SSRs)." *Biochemical Systematics and Ecology*. 63 : 113-118.
- Mursyidin, D.H. and Daryono, B.S. 2016. "Genetic Diversity of Local Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Cultivars of South Kalimantan's Province Based on RAPD Markers." *Advances of Science and Technology for Society Conference Proceedings*. 1755 : 040008-1-040008-7.
- Nie, N.H. Bent, D.H. and Hull, C.H. 1970. SPSS: statistical package for the social sciences. McGraw-Hill. 343 p.
- Oliveira, E.J. Padua, J.G. Zucchi, M.I. Vencovsky, R. and Vieira, M.L.C. 2006. "Origin, evolution and genome distribution of microsatellites." *Genetics and Molecular Biology*. 29 : 294-307.
- Padmakar, P. Kanupriya, C. Latha, P.M. Prashant, K.S. Dinesh, M.R. Sailaja, D. and Aswatha, C. 2015. "Development of SRAP and SSR marker-based genetic linkage maps of guava (*Psidium guajava* L.)." *Scientia Horticulturae*. 192 : 158-165.
- Phengkhai, C. 1978. "BOMBACACEAE." *Flora of Thailand*. 9(1) : 10-32.
- Powell, W. Machray, C. and Provan, J. 1996. "Polymorphism revealed by simple sequence repeat." *Trends in Plant Science*. 1 : 215-222.
- Prihatini, R. Ihsan, F. and Indriyani, N.L.P. 2016. "Genomic profiling of F₁ hybrids of durian (*Durio zibethinus*) revealed by RAPD-PCR." *Journal of Horticultural Research*. 24(2) : 69-76.
- Pritchard, J.K. Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. "Inference of population structure using multilocus genotype data." *Genetics*. 155 : 945-959.
- Pruim, R. 2011. Computational Statistics Using R and R Studio an Introduction for Scientists. SC 11 in Seattle. 115 p.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Riupassa, P.A. Chikmawati, T. Miftahudin and Suharsono. 2015. "The molecular diversity based ISSR of *Durio tanjungpurensis* originating from West Kalimantan, Indonesia." *Makara Journal. Science.* 19(1) : 27-36.
- Riupassa, P.A. Miftahudin, S. and Chikmawati, T. 2016. "Species-specific Loci of three Indonesian *Durio* sp. inferred from ISSR fingerprinting." *Annual Research & Review in Biology.* 10(5) : 1-11.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.10e, Exeter Ltd., Setauket, NY, USA.
- Rosmaina, W. Suhaida, J. and Zulfahmi, T. 2016. "Genetic variability and relationship among durian cultivars (*Durio zibethinus* Murr) in the Kampar, Indonesia assessed by RAPD markers." *Pakistan Journal of Biotechnology.* 13(2) : 87-94.
- Ruwaida, I. P. Supriyadi and Parjanto. 2009. "Variability analysis of Sukun durian plant (*Durio zibethinus*) base on RAPD marker." *Nusantara Bioscience.* 1 : 84-91.
- Sales, E.K. 2015. "Durian marker kit for durian (*Durio zibethinus* Murr.) Identity." *International Scholarly and Scientific Research & Innovation.* 9(5) : 532-542.
- Santoso, P.J. Pancoro, A. Suhandono, S. and Aryantha, I.N.P. 2017. "Development of simple-sequence repeats markers from durian (*Durio zibethinus* Murr. cultv. Matahari) genomic library." *AGRIVITA Journal of Agricultural Science.* 39(3) : 257-265.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman Co., California.
- Soleimani, M.H. Talebi, M. and Tabatabaei, B.E.S. 2012. "Use of SRAP markers to assess genetic diversity and population structure of wild, cultivated, and ornamental pomegranates (*Punica granatum* L.) in different regions of Iran." *Plant Systematics and Evolution.* 298 : 1141-1149.
- Somsri, S. 2007. "Thai Durian." Horticulture Research Institute, Department of Agriculture Chatuchak, Bangkok, Thailand.
- Souza, I.G.B. Valente, S.E.S. Britto, F.B. Souza, V.A.B. and Lima, P.S.C. 2011. "RAPD analysis of the genetic diversity of mango (*Mangifera indica*) germplasm in Brazil." *Genetics and Molecular Research.* 10(4) : 3080-3089.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Teh, B.T. Lim, K. Yong, C.H. Young, C.C. Rao, S.R. Rajasegaran, V. Lim, W.K. Ong, C.K. Chan, K. Cheng, V.K.Y. Soh, P.S. Swarup, S. Rozen, S.G. Nagarajan, N. and Tan, P. 2017. "The draft genome of tropical fruit durian (*Durio zibethinus*)." *Nature genetics*. 49 : 1633-1641.
- Thinhuatoey, N. Poeaim, A. Vanijajiva, O. Youryon, P. and Poeaim, S. 2016. "Genetic diversity of durian (*Durio zibethinus* Murray) based on SRAP marker." *Journal of Agricultural Technology*. 12(7.1) :1481-1489.
- Topcua, H. Ikhsana, A.S. Sutyemez, M. Coban, N. Guneya, M. and Kafkas, S. 2015. "Development of 185 polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from walnut (*Juglans regia* L.)." *Scientia Horticulturae*. 194 : 160-167.
- Vanijajiva, O. 2011. "Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand detected by RAPD analysis." *Journal of Agricultural Technology*. 7 : 1105-1114.
- Vanijajiva, O. 2012. "The application of ISSR markers in genetic variance detection among Durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand." *Journal of Agricultural Technology*. 33 : 155-159.
- Wang, S. Yang, W. and Shen, H. 2011. "Genetic diversity in *Apium graveolens* and related species revealed by SRAP and SSR markers." *Scientia Horticulturae*. 129 : 1-8.
- Wang, Z. Liao, L. Yuan, X. Guo, A. and Liu, J. 2011. "Genetic relationships of bermudagrass (*Cynodon dactylon* var. *dactylon*) from different countries revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) analysis." *Africa Journal. Biotechnol.* 10 : 17106-17115.
- Wright, S. 1978. **Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations.** The University of Chicago Press, Chicago.
- Yang, M. Han, Y. Xu, L. Zhao, J. and Liu, Y. 2012. "Comparative analysis of genetic diversity of lotus (*Nelumbo*) using SSR and SRAP markers." *Scientia Horticulturae*. 142 : 185-195.
- Zhang, X. Leung, F.C. Chan, D.K.O. Chen, Y. and Wu, C. 2002. "Comparative analysis of allozyme, random amplified on Chinese native chicken." *Breeding and Genetics*. 20 : 1093-1098.
- Zhang, F. Ge, Y. Wang, W. Shen, X. Liu, X. Liu, J. Tian, D. and Yu, X. 2012. "Genetic diversity and population structure of cultivated bromeliad accessions assessed by SRAP markers." *Scientia Horticulturae*. 141 : 1-6.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

Zhang, M. and Bai, X.J. 2013. "Genetic diversity of the fox using SRAP markers." *Genetics and Molecular Research*. 12(4) : 6176-6183.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 2X CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง CTAB 2 กรัม PVP 1 กรัม NaCl 0.4 กรัม จากนั้นปิเปต EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 4 มิลลิลิตร และ 1 โมลาร์ Tris-HCl จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยอาจใช้ความร้อนเพื่อช่วยให้สารละลายได้ดีมากขึ้น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น sterile จนครบ 100 มิลลิลิตร

1.2 10% CTAB (ใน 0.7M NaCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ปิเปต NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (จาก stock) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เติมน้ำ 43 มิลลิลิตร ชั่งสาร CTAB 5 กรัม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic bar คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.3 0.5M EDTA (pH 8) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่ง EDTA 93.06 กรัม ลงในภาชนะ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic bar จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 10X Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 108 กรัม ชั่ง Boric Acid 61.83 กรัม และชั่ง EDTA 9.305 กรัม นำสารที่ชั่งมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และถ้าต้องการเตรียม 1XTBE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อใช้งาน ให้ดูดสารละลาย 10XTBE มา 50 มิลลิลิตร แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

1.5 1M Tris-HCl (pH 8) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris 121 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย 1 โมลาร์ HCl จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.6 10mM TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ดูด 1 โมลาร์ Tris-HCl (pH 8) มาปริมาตร 10 มิลลิลิตร และดูด 0.5 โมลาร์ EDTA (pH 8) มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และถ้าต้องการเตรียม 0.1 มิลลิโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้องดูดสารจาก 10 มิลลิโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตร

ภาคผนวก(ต่อ)

1.7 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง RNase A ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ DI water (deionized water) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น Vortex จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การเตรียมสารในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR)

2.1 20 pmol/μl ไพรมเมอร์ (ไพรมเมอร์ SRAP และ SSR) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ดูดแต่ละไพรมเมอร์ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย DI water (deionized water) เป็น 20 ไมโครลิตร

2.2 1.25 mM Deoxynucleotide Triphosphate (dNTP) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จาก stock เบสแต่ละเบสประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ต้องปิเปต dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) แต่ละเบส 1.25 ไมโครลิตร รวมเป็น 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม DI water (deionized water) ปริมาตร 95 ไมโครลิตร จะได้ mix dNTPs ที่มีความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1 การเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ลงในพลาสติก เติม 1X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทใส่ถาดสำหรับเตรียมเจลที่มีหัว หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว

3.2 การเตรียม 3X Gel loading dye ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

ดูด 6X Gel loading dye ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ DI water (deionized water) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4. การเตรียมเอติเดียมโบรไมด์ (EtBr)

ดูดเอติเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หรือ 500 ไมโครลิตร ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ เติม 1X TBE Buffer ปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณัฐกุล ถิ่นหัวเตย
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 21 มิถุนายน พ.ศ. 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	190/103 หมู่ 5 หมู่บ้านตีพร้อมตีไพรซ์มารี ถนนพุทธสี-เทพารักษ์ ต.แพรक्षा อ.เมืองสมุทรปราการ จ.สมุทรปราการ 10280
ประวัติการศึกษา	(2558) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรตเฉลี่ย 3.62 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2560) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. ณัฐกุล ถิ่นหัวเตย สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม พรรณิภา ย้วยล และโองการ วณิชชีวะ. 2559. “การคัดเลือกไพรมอร์ที่เหมาะสมของ เครื่องหมายโมเลกุล SRAP สำหรับระบุสายพันธุ์ทุเรียน (<i>Durio zibethinus</i>).” <i>วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร</i> . 47(2) (พิเศษ) : 241-244. 2. Thinhuatoey, N. Poeaim, A. Vanijajiva, O. Youryon, P. and Poeaim, S. 2016. “Genetic diversity of durian (<i>Durio zibethinus</i> Murray) based on SRAP marker.” <i>Journal of Agricultural Technology</i> . 12(7.1) : 1481-1489.



ผลงานทางวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genetic diversity of durian (*Durio zibethinus* Murray) based on SRAP marker

Nattakul Thinhuatoey¹, Anurag Poeaim¹, Ongkarn Vanijajiva², Pannipa Youryon³ and Supattra Poeaim^{1*}

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

²Faculty of Science and Technology, Phranakorn Rajabhat University, Bangkok, 10220, Thailand.

³Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus, Chumphon Province, 86160, Thailand.

Thinhuatoey, N., Poeaim, A., Vanijajiva, O., Youryon, P. and Poeaim, S. (2016). Genetic diversity of durian (*Durio zibethinus* Murray) based on SRAP marker. Journal of Agricultural Technology 12(7.1):1481-1489.

Durian (*Durio zibethinus* Murray) is described as "the king of tropical fruit" which is one of the most important commercial fruit crops. In Thailand, there are many different cultivars of durian. Only a few of these are in commercial cultivation that large potential for supply both local and export markets. This research aims to observe the genetic variability and relationship among durian cultivars using Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers. DNA extraction from leaves of 29 durian cultivars which were collected from Chanthaburi Horticultural Research Center, Chanthaburi Province, Thailand. The result of this study obtained a total of 234 DNA fragments of which 182 fragments (77.78%) were polymorphic from 13 primer combinations of SRAP technique. The result were analyzed the genetic relationship with UPGMA by NTSYS program. There is similarity coefficient ranged from 0.62-0.93. Based on a cut-off point of 0.77 in Dice's similarity coefficient, the 29 durian cultivars were divided into four groups and three individual. In this study, SRAP showed itself to be the most efficient. Therefore, SRAP marker can be used to examine the genetic diversity of another durian cultivars in future.

Keywords: genetic diversity, durian, *Durio zibethinus*, SRAP marker

Introduction

Durian is one of the most popular and famous local fruits in Southeast Asia, has been cultivated for centuries (Subhadrabandhu and Ketsa, 2001). The fruit is generally referred to as the king of fruits since its extremely delicious taste and nutritional value. Among the thirty recognised *Durio* species, at least four of which found in Thailand: *D. malaccensis* Planch. Ex. Mast., *D. griffithii*

* **Corresponding author:** Supattra Poeaim **Email:** poeaim@hotmail.com

(Mast.) Bakh., *D. pinangianus* Ridley and *D. zibethinus* Murray. *D. zibethinus* or durian is the only species has been popular for both domestic and international consumption, widely grown commercially and also has an extremely important economic role (Hiranpradit, 2008). In the beginning of planting, usually the growers propagate durian by seeds, resulting in a number of different cultivars. Therefore, there are probably more than 200 cultivars are reported in Thailand. Individual cultivars have a different flavor and odor profile. Most of them have a common name such as Kop Suwan, Thong Yip, Chat Si Thong and Krapuk Thongdee etc. However, there are no economic importance. There are only four cultivars: Monthong, Chanee, KanYao and Kradumthong which are popular and economic importance (Department of Agriculture, 2010).

Although, there are many characteristics, the botanical description are the most similar which unable to identified or separated durian cultivars. Therefore, it relies on molecular markers used in the classification and genetic diversity. Despite its great power, the molecular study of plant genetic diversity are necessary. Molecular markers such as Amplified Fragment Length Polymorphism: AFLP (Sukhotu *et al.*, 2009), Simple Sequence Repeat: SSR (Chareonsap *et al.*, 2009), Random Amplification of Polymorphic DNA: RAPD (Vanijajiva, 2011) and inter-simple sequence repeats: ISSR (Vanijajiva, 2012) have been reported. However, Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) marker, amplify open reading frames (ORFs) (Li and Quiros, 2001) based on two special primer have not been reported. Therefore, the purpose of this research to determine genetic diversity of durian cultivars using SRAP marker.

Materials and methods

Plant materials and DNA extraction

This study was carried out using twenty-nine durian cultivars leaves that collected from Chanthaburi Horticultural Research Center, Chanthaburi province showed as Table 1. DNA extraction are modify the CTAB protocol followed Doyle and Doyle, (1990). The leaves (1 to 2 g) were ground and mixed with 700 μ L of 2X CTAB solution [2% (w/v) CTAB, 1M Tris-HCl (pH 8), 0.5M EDTA, 1% PVP and 5M NaCl]. Transfer homogeneous solution into a 1.5 ml microcentrifuge tube and add 2 μ l of β -mercaptoethanol. Mix gently and incubate at 65 °C in a water bath for 4 hour. The homogenate was mixed in equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1, v/v) by gentle inversion. After centrifugation at 14,000 rpm at 4 °C for 15 min, the upper aqueous layer was transferred to a fresh microcentrifuge tube. RNA was

removed by treating with 2 μ l of the RNase (20 mg/ml) for 1 hour at 37 °C. After that, add 50 μ l of 10% CTAB in 0.7M NaCl. The extraction of DNA with chloroform: isoamyl alcohol was repeated one more time. The DNA was precipitated with ice-cold isopropanol. The pellet is washed with ice cold 70% ethanol followed by absolute ethanol. The final step, the pellet was dissolved in TE buffer. The DNA extract quantity and quality were measured using optical density (OD) at 260 nm and 280 nm by spectrophotometer and 1% agarose gel electrophoresis. The DNA was stored at -20 °C until further use.

SRAP analysis

The SRAP analysis was followed according to Li and Quiros (2001). The SRAP reaction was carried out in a final volume of 20 μ L consists of 1X standard *Taq* reaction buffer (New England BioLabs, USA), 2.5 mM MgCl₂ (Vivantis, Malaysia), 1U *Taq* DNA polymerase (New England BioLabs, USA), 200 μ M of dNTPs (Vivantis, Malaysia), 1.0 μ M of each primer and 100 ng genomic DNA. The PCR amplification program was conducted following the protocol of Abedian *et al.*, (2012): 3 min of initial denaturing at 94 °C, five cycles of three steps: 1 min of denaturing at 94 °C, 1 min of annealing at 35 °C and 1 min of elongation at 72 °C, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min; followed by a final extension 10 min at 72 °C. The SRAP products were separated by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gel in 1X TBE buffer along with the VC 100 bp plus DNA Ladder marker (Vivantis, Malaysia). The gel was stained with ethidium bromide solution and examined under UV light transilluminator.

Data scoring and SRAP analysis

Clear and well resolved bands of the samples were compared with each other and DNA fragments were scored as present (1) or absent (0) from each primer. Dice's similarity coefficients among the 29 genotypes were calculated. The dendrogram was constructed by genetic similarity matrices using the unweighted pair group mean algorithm (UPGMA) method by the NTSYS-pc software package version 2.01e (Rohlf, 2000).

Table 1. Code and cultivar name of twenty-nine durian cultivars used in this study

Code	Cultivar name	Code	Cultivar name	Code	Cultivar name
DZ05	Jao Noge	DZ 24	Chai Mafai	DZ 37	Kop Chainam
DZ06	Nom Sawan	DZ 25	Chat Si Thong	DZ 38	E-ngon
DZ 07	Krapuk Thongdee	DZ 26	Chat Si Thong	DZ 39	Nok Yip
DZ 08	Saochom Fakthong	DZ 27	Maled Kotchasarn	DZ 40	Tonyai
DZ 12	Lueang Thong	DZ 28	Thong Yoi Doem	DZ 41	E-lip
DZ 13	Kop Suwan	DZ 29	Kanyao Si-nak	DZ 42	Yindi
DZ 15	Metnai Yaiprang	DZ 30	Pin Thong	DZ 43	Saochomhet
DZ 18	Kop Watklual	DZ 33	Kop Nasan	DZ 44	Eai-Mai
DZ 21	Kop Langwihan	DZ 34	Kop Thongpheng	DZ 45	Thunthawai
DZ 23	Thong Yip	DZ 35	Kop Chaokhun		

Results and Discussions

SRAP amplification

In preliminary, thirty sets of primer combinations that were combined by 5 forward primers and 6 reverse primers were screened, out of which only 13 primer combinations showed reproducible fragments with easily recordable bands and gave polymorphisms (Thinhuatoey *et al.*, 2016). In this study, determine the genetic diversity among twenty nine durian cultivars with the thirteen SRAP primer combinations that able to produce intense bands in all samples. The SRAP profiles of 29 samples from ME1/EM1 and ME4/EM5 primer combinations shown in figure 1A and 1B, respectively. From thirteen primer combination, the total of 234 DNA fragments were observed. The number of SRAP bands per primer combinations ranged from 15 (ME5/EM2) to 21 (ME4/EM5) with an average 18. ME5/EM2 primers gave the highest number of polymorphic fragments (86.87 %). However, in the total 182 polymorphic bands were scored with an average 14 and percentage of polymorphism (% polymorphism) is 77.78% (Table 2).

SRAP relationship between cultivars

The dendrogram was constructed from the distance matrix based on Dice's similarity coefficients. The dendrogram by UPGMA analysis, similarity coefficient ranged from 0.62 to 0.93. Based on a cut-off point of 0.77 in Dice's similarity coefficient scale, the twenty nine durian cultivars were divided into four groups and three individual. The first group contained only two cultivars (DZ05 and DZ06). The major group II divided into three sub-groups. The first sub-group consist of four cultivars: DZ07, DZ25, DZ26 and DZ44. Inside the second sub-group were six cultivars: DZ08, DZ21, DZ29, DZ45,

DZ15 and DZ23, with close relationship to third sub-group consist of Kob cultivars (DZ13, DZ18, DZ33, DZ35 and DZ37). The group III and IV contained each two cultivars, which have close relationship lower other groups. The section of three individual consisted of DZ39, DZ40 and DZ43 (Figure 2).

Classification can be residents different of morphology to a certain extent but durian have several cultivars. Durian cultivars have been divided into six groups based on fruit morphology which consists of leaf shape, leaf apex, leaf base, fruit and thorn, (Hiranpradit *et al.*, 2003). There are Kob group, Luang group, Kan Yao group, Kam Pan group, Thong Yoi group and Miscellaneous group. The durian samples used in this study were classified, rather in the same way as morphology. Kob group, Thong Yoi group and Miscellaneous group considering the leaf shape and leaf base that each group has several forms, which were classified close together group. In group II cultivars are in the majority of Kob group, Thong Yoi group and Miscellaneous group. Generally, the Miscellaneous group have many different morphological variation, may be similar with Kob and Thong Yoi group. However, Kop Thongpheng (DZ34) may be differences, it was separated from the Kob group.

Vanijajiva (2011 and 2012) using RAPD and ISSR markers in the same cultivars from Nonthaburi province showed ISSR marker are more interspecific diversity than RAPD. Including, Sukhotu *et al.*, (2009) using AFLP marker to identification and classification of durian from Chanthaburi Horticultural Research Center, that showed high polymorphism about 83.64% and two major clusters were detected. In this study, we used samples in same cultivars for determination genetic diversity which results were agreeable with the AFLP marker such as Chat Si Thong has a close relationship with Krapuk Thongdee. Including, Maled Kotchasarn have a closer relationship with Kop Chaokhun.

Table 2. Primer codes combination, the number of total DNA bands, the number of polymorphic bands and the percentage of polymorphism detected by the SRAP marker in 29 durian cultivars

Primer codes combination	No. of total DNA bands	No. of polymorphic bands	% of polymorphism
ME1/EM1	17	12	70.59
ME1/EM4	20	17	85.00
ME2/EM1	17	14	82.35
ME3/EM3	18	11	61.11
ME3/EM4	16	12	75.00
ME3/EM5	19	15	78.95
ME3/EM6	20	17	85.00
ME4/EM2	16	12	75.00
ME4/EM5	21	18	85.71
ME5/EM1	17	10	58.82
ME5/EM2	15	13	86.87
ME5/EM3	19	15	78.95
ME5/EM5	18	15	83.33
Total	234	182	-
Average	18	14	77.78

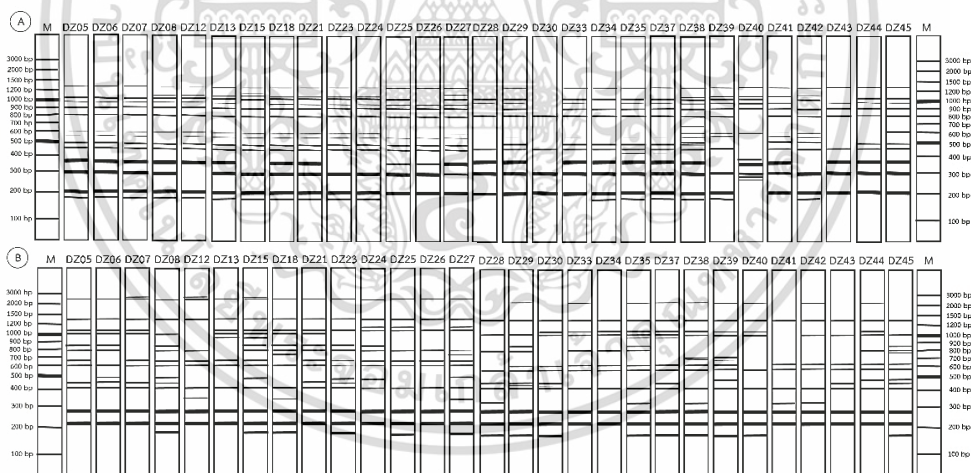


Figure 1. Examples of the SRAP profiles from 29 durian cultivars revealed by SRAP primer combinations (A) ME1/EM1 and (B) ME4/EM5 (left to right: Lane M: VC 100 bp plus DNA Ladder, Lane DZ codes: genomic DNA isolated from different durian cultivars. The numbers correspond the code of durian is given in Table 1)

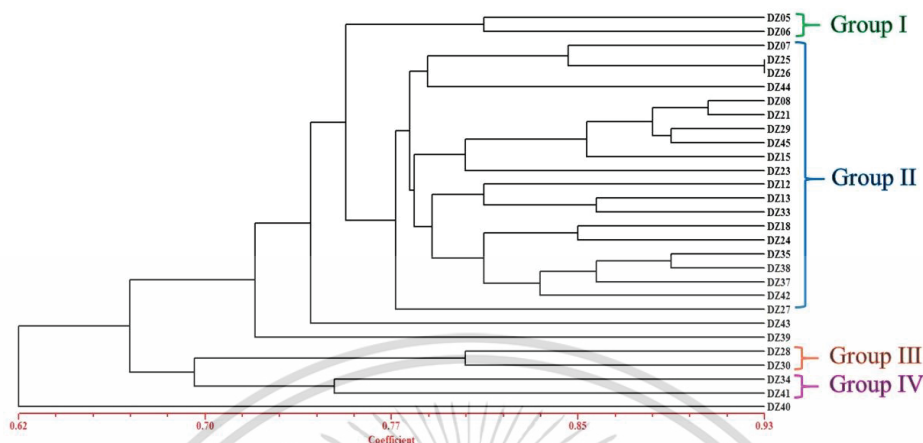


Figure 2. Dendrogram of 29 durian cultivars constructed from SRAP data using UPGMA method based on Dice's similarity coefficient

Conclusion

For SRAP marker, determination of genetic diversity among twenty nine durian cultivars with the thirteen SRAP primer combinations that percentage of polymorphism is 77.78%. ME5/EM2 primer combinations gave the highest number of polymorphic (86.87 %). The similarity coefficient ranged from 0.62 to 0.93, revealed medium level of genetic diversity. However, based on a cut-off point of 0.77 in similarity coefficient were divided into four groups and three individual. The cultivars in Kob group are classified and clearly isolated from other groups. The results from this study indicate that SRAP marker is efficiency and stable similar to AFLP marker, simple as well as faster. Therefore, this study provides evidence that SRAP marker could be used for future determination in large durian population.

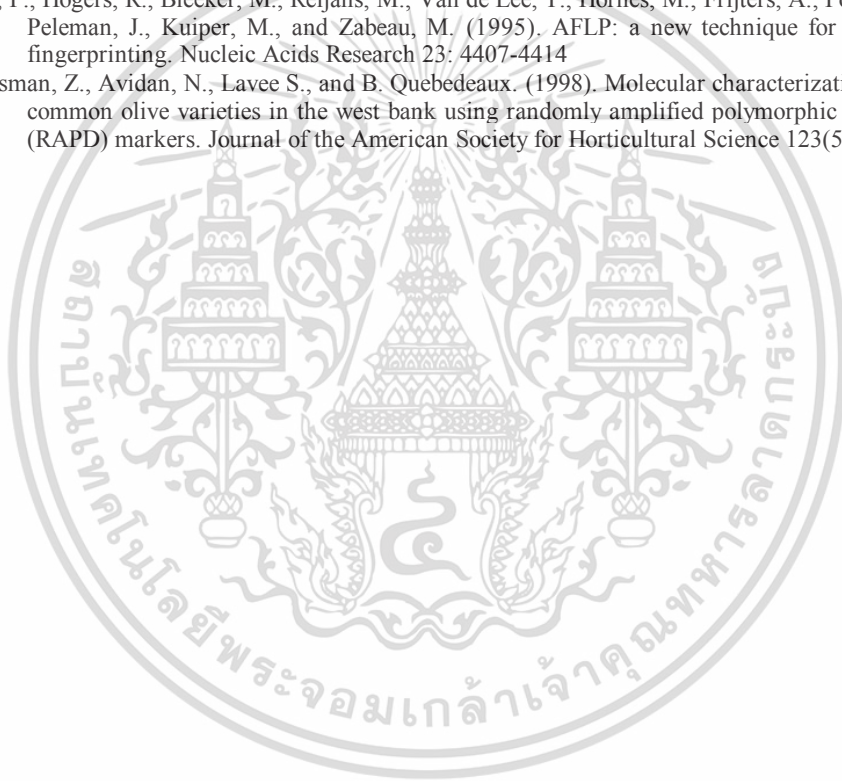
Acknowledgement

This work was supported by The National Research Council of Thailand (NRCT) under The Plant Genetic Conservation Project Under the Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG) fiscal year 2016. We gratefully acknowledge team from Chanthaburi Horticultural Research Center, Thailand for sampling. We thank anonymous reviewers for their helpful comments on the manuscript.

References

- Abedian, M., Talebi, M., Golmohammdi, H.R., and Sayed-Tabatabaei, B.E. (2012). Genetic diversity and population structure of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 40: 112-117.
- Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I., Gaussoin, R.E., Riordan, T.R., Dewiak, I. (2004). Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 108, 328–334.
- Chareonsap, P., Phumichai, T., Jarupeng, I., Chotiyarnwong, O., Mojarin, P. and Juthamas, P. 2009. Genetic Diversity of Durian (*Durio zibethinus* Merr.) using Microsatellite Markers. In: National Genetics Conference 2012. Thammasat University, Rangsit, Pathum Thani. 25-27 pp.
- Department of Agriculture. (2010). Production of fruit accurately and appropriately. Retrieved from <http://www.Soclainonwordpress.html>. On 5th October 2016.
- Dong, P., Wei, Y.M., Chen, G.Y., and Li, W. (2010). Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) in Israel and its ecological association. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 1-11.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15.
- Ferriol, M., Pico, B. and Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 271-282.
- Hiranpradit, H., Chandraparnik, S. and Salakpetch, S. (2003). Technology of Durian production. Kasetsart University Press, Bangkok: 206 pp.
- Hiranpradit, H. (2008). durian. *Encyclopedia Thailand for Edition Youth Learning*, Volume 10. Dan Publisher. Suthaka printing. Bangkok.
- Kaewsrisom, H., Nakkanong, K. and Nualsri, C. (2014). Genetic analysis of indigenous durian (*Durio zibethinus* Merr.) in southern Thailand using microsatellite markers. *Khon Kaen agr. J.* 42 Suppl 3.
- Li, G., and Quiros, C.F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 455–461.
- Li-Wang, L., Li-Ping, Z., Yi-Qin, G., Ming-Xia, W., Li-Ming, C., Jin-Lan, Y., Yan, W., Fan-Min, Y., Long-Zh, W. (2008). DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Sci. Hort.* 116, 240–247.
- Liu, L., Zhu, X., Gong, Y., Song, X., Wang, Y., Zhao, L., Wang, L., (2007). Genetic diversity analysis of radish germplasm with RAPD, AFLP and SRAP markers. *Acta Hort.* 760, 125–130.
- Office of Agricultural Economics. (2013). Product Manufacturing Information Agriculture-durian. Retrieved from: <http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/durian.pdf>. On 5th October 2016.
- Pradeep, R.M., Sarla, N., and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Publishing, Ltd., Setauket, NY
- Subhadrabandhu, S. and Ketsa, S. (2001). Durian: King of tropical fruit. New Zealand and Australia: Daphne Brasell Associates Ltd., CABI publishing.

- Sukhotu, T., Jarupeng, I., Mojarin, P., Peampol, A., Srakoa, A., Teinmongkol, S., Parinyapong, P. and Chuthamas, P. (2009). Identification and classification of Durian (*Durio zibethinus* Merr.) using AFLP analysis. Conference resource Thailand: Plain a thousand things, (Poster Pages 405-410).
- Thinhuatoey, N., Poeaim, S., Poeaim, A., Youryon, P. and Vanijajiva, O. (2016). Screening primers of SRAP markers for identify durian cultivars (*Durio zibethinus*). Agricultural Science Journal 47(2): 61-64.
- Vanijajiva, O. (2011). Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province Thailand detected by RAPD analysis, Journal of Agricultural Technology 7: 1105-1114.
- Vanijajiva, O. (2012). The application of ISSR markers in genetic variance detection among Durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand, Procedia Engineering 32: 155 – 159.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414
- Wiesman, Z., Avidan, N., Lavee S., and B. Quebedeaux. (1998). Molecular characterization of common olive varieties in the west bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Journal of the American Society for Horticultural Science 123(5): P



การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล SRAP สำหรับระบุสายพันธุ์ทุเรียน (*Durio zibethinus*)

Screening Primers of SRAP Markers for Identify Durian Cultivars (*Durio zibethinus*)

ณัฐกุล ถิ่นห้วเตย¹ สุปัตรา โพธิ์เอี่ยม¹ อนุรักษ โพธิ์เอี่ยม¹ พรรณีภา ย้วยล² และ โองการ วณิชชีวะ³
Thinhuatoey, N.¹, Poeaim, S.¹, Poeaim, A.¹, Youryon, P.² and Vanijajiva, O.³

Abstract

Durian (*Durio zibethinus* Merr.) is one of the most prominent complexes in fruit species. Known as "the king of tropical fruit" because of unique taste and odor, the species was developed in various cultivar names that made difficultly cultivars identification. The aim of this study was to utilize molecular marker for consistent and rapid detection and to investigate the genetic characterization using Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) techniques. In a preliminary study, three famous cultivars populations (Monthong, Chanee and Kob Suwan) were selected. Thirty primer combinations sets of 5 forward primers and 6 reverse primers were applied. Thirteen primer combinations which consistently produced well defined bands were further used for genetic profile analysis. A total of 149 bands were observed with an average of 11.46 bands per primer combination of which 61 were polymorphic (40.94%). Therefore, these suitable pairs of SRAP primers were selected for diversity and identify durian cultivars in the further.

Keywords: durian, *Durio zibethinus*, SRAP

บทคัดย่อ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Merr.) นับได้ว่าเป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีความซับซ้อนของสายพันธุ์มากที่สุดชนิดหนึ่ง รู้จักกันในนาม "ราชาของผลไม้เขตร้อน" เนื่องจากรสชาติและกลิ่นที่มีความเป็นเอกลักษณ์ สาเหตุนี้เองทำให้เกิดการพัฒนาส่งผลให้เกิดสายพันธุ์ที่มีชื่อเรียกที่หลากหลาย ส่งผลให้ยากต่อการระบุสายพันธุ์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความน่าเชื่อถือ และรวดเร็วสำหรับใช้ตรวจสอบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) การศึกษาเบื้องต้นได้ศึกษาในทุเรียนที่ได้รับความนิยมจำนวน 3 สายพันธุ์ของประชากร (หมอนทอง ชะนี และกบสุวรรณ) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ ซึ่งเป็นการจับคู่กันระหว่างไพรเมอร์ส่วนหน้า 5 ชนิด และไพรเมอร์ส่วนหลัง 6 ชนิด เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีจำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมต่อไปได้ และพบแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 149 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 11.46 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยมีแถบที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 61 แถบ (40.94%) ดังนั้นสามารถนำคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมไปใช้ในการศึกษาความหลากหลาย และระบุสายพันธุ์ของทุเรียนต่อไป

คำสำคัญ: ทุเรียน *Durio zibethinus* SRAP

คำนำ

พืชสกุลทุเรียน (*Durio* spp.) ในประเทศไทยมีรายงานอยู่ 4 ชนิด (species) คือทุเรียนดอน (*Durio malaccensis* Planch. Ex. Mast.) ทุเรียนนก (*D. griffithii* (Mast.) Bakh.) ทุเรียนป่า (*D. pinanginan* Ridley) และทุเรียน (*D. zibethinus* Merr.) โดยมีเฉพาะทุเรียนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั้งในและต่างประเทศ จึงมีการปลูกเชิงการค้าอย่างแพร่หลาย ทุเรียนเป็นไม้ผลที่มีชื่อเสียงในพื้นที่เขตร้อน และกึ่งเขตร้อน จัดเป็นราชาแห่งผลไม้

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กทม. 10520

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Road, Ladkrabang District, Bangkok, 10520

² ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160

² Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus, Chumphon Province, 86160

³ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร เลขที่ 9 แจ้งวัฒนะ แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน จังหวัดกรุงเทพฯ 10220

³ Faculty of Science and Technology, PhranakhonRajabhat University, Bangkok, 10220

(King of tropical fruit) ในช่วงแรกของการเพาะปลูก ชาวสวนขยายพันธุ์ทุเรียนด้วยการเพาะเมล็ดเป็นผลทำให้เกิดสายพันธุ์ต่างๆ จำนวนมาก ในประเทศไทยมีการรายงานความหลากหลายของสายพันธุ์ทุเรียนมากกว่า 200 สายพันธุ์ (cultivars) แต่สายพันธุ์ที่นิยม และมีสำคัญทางเศรษฐกิจ คือ หมอนทอง ชะนี ก้านยาว และกระดุมทอง โดยสายพันธุ์อื่นๆ มีสี กลิ่น รส และชื่อเรียกแตกต่างกันไป หรือเป็นที่รู้จักในบางพื้นที่เท่านั้น รวมทั้งไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แม้ว่ามีลักษณะที่แตกต่างกันไปบ้างตามสายพันธุ์ แต่ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ส่วนใหญ่ที่คล้ายคลึงกันทำให้ไม่สามารถระบุหรือแยกสายพันธุ์ทุเรียนได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลาย แม้ว่ามีการศึกษาด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (ฐิตาภรณ์ และคณะ, 2551) Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) (Vanijajiva, 2011) และ Simple Sequence Repeat (SSR) (ปิยรัชฎ์ และคณะ, 2552) แต่ยังไม่มีการรายงานด้วยเทคนิค Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วน open reading frame (ORF) ที่เป็นส่วนสำคัญของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) และไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) ขนาด 17 และ 18 เบส ตามลำดับที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นลำดับเบสหลัก (core sequence) ขนาด 13-14 เบส โดย 10-11 เบสแรกทางด้านปลาย 5' เป็นลำดับเบสที่ไม่ความจำเพาะเรียกว่า ลำดับเบสส่วนเติม (filler sequence) ตามด้วย CCGG ที่เป็นลำดับเบสจำเพาะของลำดับเบสไพรเมอร์ส่วนหน้า เพื่อจับกับส่วนเอ็กซอน (exon) หรือ ORF ซึ่งเป็นบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบส GC สูง (GC rich) และ AATT ที่เป็นลำดับเบสจำเพาะของไพรเมอร์ส่วนหลัง เพื่อจับกับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณที่มี AT สูง ซึ่งพบมากในส่วนอินทรอน (intron) ส่วนที่สองคือ ลำดับเบสแบบคัดเลือก (selective sequence) จำนวน 3 เบสที่เปลี่ยนแปลงได้ทางด้านปลาย 3' โดยเทคนิค SRAP สามารถทำซ้ำแล้วให้ผลคงที่ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบส และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันด้วยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยเทคนิคนี้มีความใกล้เคียงกับเทคนิค AFLP แต่ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่า (Li และ Quiros, 2001; Ferriol และคณะ, 2003; Roberts และ Wolfe, 2014) ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SRAP มาใช้ศึกษาความหลากหลาย และระบุสายพันธุ์ทุเรียน โดยเบื้องต้นเป็นการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำส่วนใบของทุเรียน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ หมอนทอง (DZ 01) ชะนี (DZ 02) และกบสุวรรณ (DZ 03) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) เมื่อได้ดีเอ็นเอนำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอมาทดสอบเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ ตามงานวิจัยของ Li และ Quiros (2001) ซึ่งเป็นการจับคู่กันระหว่างไพรเมอร์ส่วนหน้า 5 ชนิด (ME1-5) และไพรเมอร์ส่วนหลัง 6 ชนิด (EM1-6) ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 1X Standard *Taq* reaction buffer (New England BioLabs, USA) MgCl₂ (Vivantis, Malaysia) 2.5 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase (New England BioLabs, USA) 1 ยูนิต dNTP (Vivantis, Malaysia) 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 1 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ปรับปริมาตรด้วย Nuclease-free water โดยขั้นตอนของปฏิกิริยาใช้วิธี step up PCR คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 5 รอบแรก เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดี และปรับเพิ่มอุณหภูมิ annealing ให้สูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส 1 นาที อีกจำนวน 35 รอบ ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที เปรียบเทียบกับ DNA marker ชนิด VC 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia)

ผลการทดลอง

ในการทดลองคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล SRAP สำหรับระบุสายพันธุ์ประชากรทุเรียนต่อไป ได้ศึกษาโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในประชากรทุเรียน 3 สายพันธุ์ คือ หมอนทอง ชะนี และกบสุวรรณ ด้วยไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน มีจำนวนแถบไม่น้อยหรือมากเกินไป มีแถบที่ให้ความเข้มคมชัด สามารถแยกและนับจำนวนแถบได้ รวมทั้งในแต่ละโลคัส (locus) แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphic bands) จำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ME1/EM1, ME1/EM4, ME2/EM1, ME3/EM3, ME3/EM4, ME3/EM5, ME3/EM6, ME4/EM2, ME4/EM5, ME5/EM1, ME5/EM2, ME5/EM3 และ ME5/EM5 ดังแสดงแถบดีเอ็นเอ

ไม่วารณใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของทั้ง 3 สายพันธุ์ในทุกคู่ไพรเมอร์ใน Figure 1 และตัวอย่างของคู่ไพรเมอร์ ME3/EM4 แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส โดยตัวอย่าง DZ02 ไม่ปรากฏแถบเช่นเดียวกับ DZ01 และ DZ03 รวมทั้งตัวอย่างของคู่ไพรเมอร์ ME1/EM6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) ในทุกตัวอย่าง ซึ่งจะไม่นำไปใช้ในการระบุสายพันธุ์ และจากการศึกษาเฉพาะ 13 คู่ไพรเมอร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งหมด 149 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 11.46 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 61 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (% of polymorphism) เท่ากับ 40.94 เปอร์เซ็นต์โดยคู่ไพรเมอร์ ME5/EM1 ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่สุด คือ 11 แถบ คิดเป็น % of polymorphism เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามคู่ไพรเมอร์ ME3/EM5 แสดง % of polymorphism สูงสุด เท่ากับ 63.64 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน Table 1

วิจารณ์ผล

จากผลการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเทคนิค SRAP เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลาย และระบุสายพันธุ์ทุเรียนนั้นมี 13 คู่ไพรเมอร์ สอดคล้องกับงานวิจัย Chaoguang และคณะ (2016) ที่ใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์พันธุกรรมของชบาและชบาลูกผสม ซึ่งจัดเป็นพืชที่อยู่อันดับเดียวกับทุเรียน พบว่าเมื่อนำไพรเมอร์จำนวน 25 คู่ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถแยกชบาลูกผสมออกจากกลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน โดยแสดงให้เห็นว่าคู่ไพรเมอร์ที่ให้ค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี เทคนิค SRAP จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม และจัดจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างพืชที่มีลักษณะเป็นลูกผสมได้

สรุปผล

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล SRAP สำหรับระบุสายพันธุ์ทุเรียน (*D. zibethinus*) พบว่ามีจำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ จากจำนวนทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน สามารถแยกและนับจำนวนแถบได้ รวมทั้ง แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในแต่ละโลกซ์ โดยคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรมีค่า % of polymorphism สูง เช่น ME3/EM5 และ ME5/EM1 ดังนั้นสามารถนำคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการคัดเลือกนี้ไปใช้ในการศึกษาความหลากหลาย และระบุสายพันธุ์ทุเรียนต่อไป

คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2559 ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

เอกสารอ้างอิง

- ฐิตาภรณ์ สุขโหด อินทวิธา จารุเพ็ง ประไพ โมจิรินทร์ อภิรดี เพิ่มผล อรุณณี สระแก้ว ศิริวรรณ เทียนมงคล ปิยรัชฎ์ ปริณญา พงษ์ และพรชัย จุฑามาต. 2553, การจัดจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus* Merr.) โดยใช้เทคนิค AFLP, การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, หน้า 405-410.
- ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์ ฐิตาภรณ์ ภูมิไชย อินทวิธา จารุเพ็ง อรชร โชติญาณวงษ์ ประไพ โมจิรินทร์ และพรชัย จุฑามาต. 2552, ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์, การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี, หน้า 25-27.
- Chaoguang, Y., Yunlong, Y., David, L., Zhiguo, L., and Jianhua, X., 2016, Morphological characters and SRAP analysis of two hybrids between *Hibiscus dasycalyx* and *Hibiscus* 'Moy Grande', *Scientia Horticulturae*, 198: 118-124.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin Journal*, 19: 11-15.
- Ferriol, M., Pico, B., and Nuez, F., 2003, Genetic diversity of a germplasm collection *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 271-282.
- Li, G., and Quiros, C.F., 2001, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*, *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 455-461.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูช่างานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Robarts, D.W.H., and Wolfe, A.D., 2014, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology, *Applications in Plant Sciences*, 2 (7): 140017.
 Vanijajiva, O., 2011, Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province Thailand detected by RAPD analysis, *Journal of Agricultural Technology*, 7: 1105-1114.

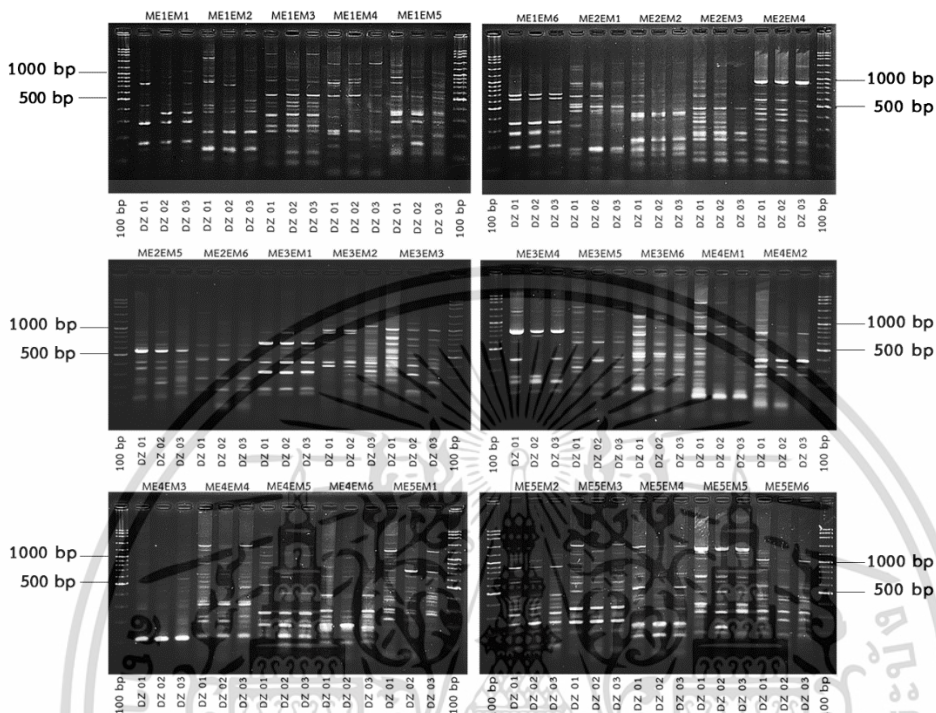


Figure 1 The SRAP polymorphisms revealed from DNA amplified using 30 primers pair (left to right: VC 100 bp plus DNA Ladder and 3 samples; DZ 01–DZ 03 analyzed in each primer pairs).

Table 1 Primer combination, the number of total DNA bands, the number of polymorphic bands and the percentage of polymorphism resulted from SRAP analysis of *Durio zibethinus*

Primer combination	No. of total DNA bands	No. of polymorphic bands	% of polymorphism
ME1/EM1	5	1	20.00
ME1/EM4	6	1	16.67
ME2/EM1	11	6	54.55
ME3/EM3	14	6	42.86
ME3/EM4	10	5	50.00
ME3/EM5	11	7	63.64
ME3/EM6	15	3	20.00
ME4/EM2	12	6	50.00
ME4/EM5	11	4	36.36
ME5/EM1	20	11	55.00
ME5/EM2	12	1	8.33
ME5/EM3	12	6	50.00
ME5/EM5	10	4	40.00
Total	149	61	-
Average	11.46	4.69	40.94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้