



รายงานโครงการวิจัย

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์พืช

The Use of Molecular Markers for Identification and
Plant Breeding

หัวหน้าโครงการวิจัย

ประสาน สืบสุข

Prasarn Seubsuk

ปี พ.ศ. 2560



รายงานโครงการวิจัย

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์พืช

The Use of Molecular Markers for Identification and
Plant Breeding

หัวหน้าโครงการวิจัย

ประสาน สืบสุข

Prasarn Seubsuk

ปี พ.ศ. 2560

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	5
ผู้วิจัย	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	7
บทนำ	8
บทคัดย่อ	13
1. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่และการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุเรียน	19
2. การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล	48
3. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์	69
4. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด	79
5. การศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรโดยใช้เทคนิคทางซีวีโมเลกุล	89
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	102
บรรณานุกรม	103
ภาคผนวก	109

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์พืช ได้ดำเนินการได้ โดยได้รับการสนับสนุนจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ให้การสนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณนักวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและทำงานวิจัยอย่าง มุ่งมั่น และดำเนินงานวิจัยให้บรรลุวัตถุประสงค์ สนับสนุนให้งานวิจัยสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้ และนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ได้ให้การสนับสนุนงานในด้านอื่นๆ แต่มิได้เอ่ยนามไว้ ซึ่งล้วนมีส่วนช่วยส่งเสริมให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินงานจนประสบผลสำเร็จ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัย

การทดลองที่ 1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่และ
การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุเรียน

หัวหน้าการทดลองที่ 1 นายประสาน สืบสุข	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน 1. นางสาวกุหลาบ คงทอง	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. นางสาวอรุณทัย ซาววา	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
3. นางสาวศิริพร วรกุลดำรงชัย	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
4. นางชนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 2 การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

หัวหน้าการทดลองที่ 2 นางสาวอรุณทัย ซาววา	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน 1. นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. นางสาวจารุฉัตร เขนยทิพย์	สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
3. นายประสาน สืบสุข	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 3 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

หัวหน้าการทดลองที่ 3 นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน นางสาวอรุณทัย ซาววา	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสุภาวดี จ้อเหรียญ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 4 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้
แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด

หัวหน้าการทดลองที่ 4 นายประสาน สืบสุข	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน 1. นางสาวกุหลาบ คงทอง	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. นางสาวจิราพร แก่นทรัพย์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
3. นางสาวศิริไล ลาภบรรจบ	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์
4. นายสุริพัฒน์ ไทยเทศ	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์

การทดลองที่ 5 การศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์
รับรองของกรมวิชาการเกษตรโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

หัวหน้าการทดลองที่ 5 นางสาวจิราพร แก่นทรัพย์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน 1. นางชนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. นายประสาน สืบสุข	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ม.ล. = มิลลิลิตร

ชม. = ชั่วโมง

 μl = ไมโครลิตร

ng = นาโนกรัม

ก.ก. = กิโลกรัม

% = เปอร์เซ็นต์

 μM = ไมโครโมล

mg = มิลลิกรัม

ซ.ม. = เซนติเมตร

 $^{\circ}\text{C}$ = องศาเซลเซียส

ml = มิลลิลิตร

g = กรัม

บทนำ

การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์พืชส่วนใหญ่เป็นการประเมินจากลักษณะทางฟีโนไทป์ รวมถึงลักษณะทางการเกษตรต่างๆ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาและพื้นที่ในการศึกษา ซึ่งการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอยังมีน้อย ทำให้การใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุกรรมได้ไม่เต็มที่มากนัก นอกจากนี้การจำแนกด้วยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจให้ข้อมูลที่อาจไม่ถูกต้อง เพราะลักษณะบางอย่างแยกจากกันได้ยาก บางลักษณะอาจจะเป็นผลจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่แตกต่างกัน การนำความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ หรือเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกและคัดเลือกพันธุ์พืช ทำให้ประสิทธิภาพในการจัดจำแนกและคัดเลือกพันธุ์เพิ่มมากขึ้น มีความแม่นยำ และรวดเร็ว จึงได้นำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้กับ ทูเรียน ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง กล้วยไม้สกุลหวาย และอินทผาลัม สำหรับจัดจำแนกและปรับปรุงพันธุ์

ทูเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นไม้ผลเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการส่งออกทั้งในรูปผลสด แช่แข็ง และแปรรูป ในประเทศไทยมีการปลูกทูเรียนมาเป็นเวลานาน จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์ เชื่อได้ว่าทูเรียนนำเข้ามาปลูกในประเทศไทย ตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยา และเป็นการนำมาจากทางใต้ของประเทศไทย โดยในระยะต้นมีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากเป็นการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ และเกษตรกรเป็นผู้คัดเลือกพันธุ์ที่ดีในอดีต ซึ่งเป็นผลดีต่อการปรับปรุงพันธุ์ทูเรียนมาจนถึงปัจจุบัน แต่พันธุ์ทูเรียนที่เกิดขึ้นมีการตั้งชื่อพันธุ์ในหลายๆ รูปแบบ ไม่มีหลักเกณฑ์ อาจใช้ชื่อผู้ที่เพาะเมล็ด ชื่อสถานที่หรือตำแหน่งที่ต้นพันธุ์นั้นงอก ลักษณะรูปทรง ผล สี รสชาติ ฯลฯ ซึ่งเป็นลักษณะที่เด่นชัดเป็นตัวกำหนดในการตั้งชื่อ ประกอบกับมีการกระจายการปลูกทูเรียนไปยังภาคต่างๆ ทำให้มีการกระจายพันธุ์ไปยังแหล่งปลูกใหม่เป็นจำนวนมาก อาจทำให้หลายๆ พันธุ์ที่เป็นพันธุ์เดียวกัน มีการตั้งชื่อใหม่ จึงเป็นการซ้ำซ้อน สับสน และไม่สามารถใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการได้เท่าที่ควร พันธุ์ทูเรียนที่เกิดขึ้นจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้น ไม่สามารถทราบเชื้อสายพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์ได้ อีกทั้งลักษณะภายนอกไม่สามารถจำแนกพืชในระดับพันธุ์ได้อย่างชัดเจน วิธีการตรวจสอบพืชในระดับดีเอ็นเอถือเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเที่ยงตรงสูง เนื่องจากไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม และอิทธิพลจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมกับยีนเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้การศึกษาพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการคัดเลือกที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกให้ได้จีโนไทป์ตามต้องการ โดยมีพื้นฐานอยู่บนความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่จะคัดเลือก การมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลหลายๆ ตำแหน่งที่วางอยู่บนแผนที่ยีน สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่จะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชทราบถึงตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ใช้เป็นแนวทางในการรวบรวมยีนที่ดีเด่นต่าง ๆ เข้ามาอยู่ในพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในขั้นตอนการ

ปรับปรุงพันธุ์พืชเข้ามาช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้น้อยลง เพิ่มประสิทธิภาพสูงทั้งในด้านความถูกต้องและแม่นยำ ที่ผ่านมามีเครื่องหมายโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ทุเรียน เช่น เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP), อาร์เอพีดี (Random Amplification Polymorphic DNA; RAPD) และ เอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat; SSR) (Santos, 2004; ฤทัยชนก, 2554; โองการ, 2554; ปิรัชญ์, 2552; ประสาน, 2556) โดยเฉพาะเอสเอสอาร์ถือว่าเป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี มีความเสถียรสูง ทำซ้ำได้ มีความหลากหลายสูง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าตำแหน่งเครื่องหมายเอสเอสอาร์ของทุเรียนที่ใช้อยู่ปัจจุบันมีน้อย ถ้าพิจารณาในเรื่องของการจำแนกพันธุ์พบว่าไม่เพียงพอในการใช้จำแนกสายพันธุ์ทุเรียนออกจากกันได้ทั้งหมด จากผลการทดลองของ ประสาน, 2556 พบว่าเมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอจำนวน 14 ตำแหน่ง การเกิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนพื้นเมืองพันธุ์กำป็นเจ้ากรม กบหลังวิหารและทูลถวายเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันทั้ง 14 ตำแหน่ง ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และถ้าต้องการนำเครื่องหมาย SSR ไปใช้เพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชพบว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์มีน้อยจนไม่สามารถนำไปใช้หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่ต้องการ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เพื่อค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ของทุเรียนโดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบสยุคใหม่ (Next Generation Sequencing; NGS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ช่วยลดระยะเวลาลดขั้นตอน และค่าใช้จ่ายในหาลำดับเบสของแต่ละโคลน

อินทผลัมเป็นพืชที่มีประวัติยาวนานมาหลายพันปี ปัจจุบันเป็นพืชที่พบมากและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศในแถบแอฟริกาเหนือ เช่น ตูนิเซีย แอลจีเรีย อียิปต์ เป็นต้น และของประเทศในแถบตะวันออกกลาง โดยธรรมชาติเป็นพืชที่เกิดอยู่ในภูมิภาคที่มีความร้อนและแห้ง แต่ละสายพันธุ์ก็มีแหล่งกำเนิดในภูมิภาคที่แตกต่างกันไป เรื่องจำนวนสายพันธุ์ยังไม่แน่ชัดนักในจำนวนที่แท้จริง แต่พอสรุปได้ว่ามีหลายร้อยสายพันธุ์ในโลกปัจจุบัน ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ แต่ละประเทศก็มีสายพันธุ์เด่นๆ เฉพาะประเทศของตน การขยายพันธุ์อินทผลัมสามารถขยายพันธุ์ได้ ๓ วิธี คือ การเพาะเมล็ด การแยกเหง้า และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิธีแรกการเพาะเมล็ด ถือเป็นวิธีการปลูกอินทผลัมที่เป็นการลงทุนที่ต่ำที่สุด ราคาต้นกล้าไม่ถึงกับสูงมาก แต่ก็เป็นเรื่องปกติของอินทผลัมที่ปลูกจากการเพาะเมล็ด ที่ปลูกลงแล้วจะต้องมีการตามลุ้นเรื่องต่างๆ เช่น รอลุ้นต้นตัวผู้ ต้นตัวเมีย และการกลายพันธุ์ วิธีต่อมา คือ การการแยกเหง้า อินทผลัมจะมีเหง้าแตกออกมาทางโคนด้านล่างของต้น ในต่างประเทศจะมีการขุดแยกเหง้า หรือต้นให้เกิดรากจากต้นแม่พันธุ์ดี เพื่อนำมาปลูกจะได้ต้นตัวเมียตามพันธุ์นั้นๆ สำหรับประเทศไทยในตอนนี้ ยังไม่มีต้นพันธุ์แบบนี้ขายในเชิงพาณิชย์ แม้จะมีบ้างก็คงเป็นกลุ่มผู้ที่ทดลองปลูกร่วมกันอยู่แลกเปลี่ยน ขาย หรือแบ่งปันกันไปทดลองปลูก ถ้าต้องการต้องไปค้นหาข้อมูลจากต่างประเทศ ราคาค่อนข้างสูง เพราะจะได้ต้นพันธุ์ดีจำนวนไม่มาก เนื่องจากต้นแม่พันธุ์ดีต้นหนึ่งจะได้เหง้าตลอดอายุเพียงไม่เกิน ๒๐ เหง้า หากจะขยายจำนวนมากๆ ต้องอาศัยต้นแม่จำนวนพอสมควร ประเด็นหนึ่งสำหรับเรื่องการแยกเหง้า คือ เหง้าที่เกิดจะไปดึงต้นให้โตช้าลง การปลูกจากเหง้าให้ผลช้ากว่าเมล็ด ปลูกจากเมล็ดให้ผลเร็วกว่าถ้ามี

เหง้าเกิดขึ้นให้ตัดทิ้งเสีย และวิธีสุดท้าย คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นการขยายต้นตัวเมียพันธุ์ดีๆ แบบจำนวนมาก จะได้ต้นตัวเมียตามพันธุ์นั้นๆ เป็นอีกวิธีการปลูกที่ต่างประเทศนิยมนำไปปลูกในเชิงพาณิชย์ ราคาต่อต้นสูงพอสมควร และในประเทศไทยยังคงต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ เริ่มมีคนสั่งเข้ามาทดลองปลูกบ้างแล้ว แต่ถ้าจะสั่งจะต้องสั่งจำนวนมากจึงจะส่งให้ ดังนั้นต้องใช้ทุนจำนวนมากในการปลูก และต้องพิจารณาว่าห้องที่เพาะเนื้อเยื่อขนานาเชื้อถือระดับไหน ต้องดูแลแหล่งข้อมูลว่าเคยมีปัญหาอะไรหรือไม่ มีมาตรฐานระดับไหน ส่งไปขายที่ประเทศไหนบ้าง เคยมีประวัติการฟ้องร้องกันหรือไม่ เป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยสร้างความมั่นใจเพราะห้องเพาะเลี้ยงบางที่อาจไม่ได้มาตรฐาน เลือกต้นพันธุ์แม่ที่ไม่ได้มาตรฐาน (พันธุ์แม่ไม่ดี หรือ พันธุ์ยังไม่นิ่ง) มาหลอกขาย เป็นต้น อย่างไรก็ตามการปลูกแบบเพาะเมล็ดแม้จะมีความเสี่ยงเรื่องต้นทุนตัวผู้ตัวเมียและการกลายพันธุ์ แต่ก็มีข้อดีคือ ประหยัดต้นทุนการปลูกมากกว่า มีโอกาสได้พันธุ์ใหม่ๆ ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ มีการปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิศาสตร์ของประเทศไทยได้ดี และไทยยังใหม่อยู่กับเรื่องการปลูกพืชชนิดนี้ การเริ่มต้นพัฒนาการปลูกด้วยการเพาะเมล็ดน่าจะช่วยเพิ่มประสบการณ์และการเรียนรู้เกี่ยวกับอินทผลัมมากยิ่งขึ้น ในอนาคตค่อนนำไปสู่การพัฒนาเรื่องการปลูกด้วยวิธีอื่นๆ มากยิ่งขึ้น อีกทั้งการปลูก การศึกษาเรื่องสภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสม การดูแลรักษา หากเรียนรู้พื้นฐานจากการปลูกด้วยเมล็ดมาก่อนน่าจะเป็นบทเรียนที่ดีแก่ผู้ที่สนใจพืชชนิดนี้ การเพาะเมล็ดจะช่วยสร้างพันธุ์อินทผลัมพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นในโลกได้แน่นอน หากมีการกลายพันธุ์ไปในลักษณะที่พึงประสงค์หรือกลายดี ยิ่งจะเป็นของขวัญชิ้นใหญ่ให้กับผู้ปลูกได้ด้วย เพราะการเพาะจากเมล็ดนั้น เมื่อนำมาเพาะใหม่แล้ว เราสามารถตั้งชื่อพันธุ์ใหม่ได้เลย แต่อินทผลัมเป็นพืชที่ไม่สมบูรณ์เพศ การขยายพันธุ์โดยเมล็ด โอกาสที่จะได้เป็นต้นตัวผู้และต้นตัวเมียมีอย่างละครึ่ง และเราจะไม่สามารถทราบเพศของต้นอินทผลัมจากการเพาะเมล็ด ต้องปลูกไว้รอจนกว่าต้นจะออกดอกถึงจะทราบเพศ ซึ่งใช้เวลา 3-8 ปี ทำให้เสียทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา เช่น ปุ๋ย และสารเคมี เป็นต้น เพราะหากเป็นต้นตัวผู้ก็จะไม่สามารถให้ผลผลิตได้ต้องตัดทิ้ง หากนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการแยกเพศได้ในช่วงเริ่มต้นของวิธีการเพาะเมล็ด ก็จะช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายลงได้ เนื่องจากไม่ต้องรอจนต้นออกดอก ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะมาช่วยคัดเลือกต้นตัวเมียได้

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ประกาศให้กล้วยไม้ 4 สกุล ได้แก่ สกุลหวาย และลูกผสม สกุลแวนดาและลูกผสม สกุลฟาแลนนอบซิสและลูกผสม สกุลคัทลียาและลูกผสมเป็นชนิดพืชที่พันธุ์พืชใหม่สามารถขอรับความคุ้มครองตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาแนวทางและหลักเกณฑ์ในการคุ้มครองกล้วยไม้ทั้ง 4 สกุล ที่เป็นสากลและยอมรับได้ในทางวิชาการโดยดำเนินการศึกษากฎหมายคุ้มครองพันธุ์พืชและกฎหมายลำดับรองที่เกี่ยวข้อง หลักเกณฑ์การคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ภายใต้อนุสัญญาระหว่างประเทศว่าด้วยการคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ ได้มีการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้ทั้ง 4 สกุลและสกุลใกล้เคียงที่สามารถผสมกับกล้วยไม้ทั้ง 4 สกุลนี้ได้ร่างหลักเกณฑ์และวิธีการตรวจสอบและนำไปประกอบคำขอจดทะเบียนพันธุ์ของเกษตรกร นักปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้จำนวนมาก แต่ยังคงขาดข้อมูล

ลักษณะดีเอ็นเอ ซึ่งในปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพได้พัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์เพื่อจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนดา และได้นำมาทดสอบเบื้องต้นกับกล้วยไม้หลายชนิดพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ค่าโพลีมอร์ฟิซึมของกล้วยไม้แต่ละชนิดได้ ในการศึกษาที่ต้องการคัดเลือก ทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งมีประสิทธิภาพเหมาะสมในการสร้างเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ จึงนำเทคนิคดังกล่าวมาช่วยในการจำแนกระดับโมเลกุลต่อไป

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight; NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ที่ทำความเสียหายให้กับข้าวโพด ส่งผลกระทบต่อผลผลิตลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด พบว่าถ้าเกิดโรคก่อนระยะออกไหมจะทำให้ผลผลิตลดลงมาก หากมีการระบาดเกิดขึ้นหลังจากข้าวโพดออกไหมแล้ว 6-8 สัปดาห์ ความเสียหายจะลดน้อยลง (Degefu, 2003) ซึ่งการป้องกันความเสียหายจากโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค (Lipps and Mills, 2002; Pataky *et al.*, 1998) ซึ่งสามารถลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรคได้ เป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ นอกจากให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูงแล้วจะต้องมีความต้านทานต่อโรคของข้าวโพดด้วย การพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานโรคในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมความเสียหายของผลผลิต ปัจจุบันการศึกษาด้านเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถนำมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ได้มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ เช่น ได้มีการค้นพบเครื่องหมายดีเอ็นเอสการ์ (Sequence Characterized Amplified Region; SCAR) ของซินดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อพันธุ์ข้าวโพดที่มีความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Juthaporn *et al.*, 2008) นักวิจัยหลายคณะได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ศึกษาตำแหน่งของชุดยีนที่ทำให้เกิดลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณ (Quantitative Trait Loci; QTL) ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ บนโครโมโซมทั้ง 10 คู่ ของข้าวโพด พบว่ามีตำแหน่งของชุดยีน จำนวน 5 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด วางตัวอยู่บนบนโครโมโซม 1.01 (mmc0031), 5.05 (bnlg1118), 6.05 (nc009), 7.03 (phi114-bmc1666) และ 8.05 (bmc1812) (จุฑาพร., 2551; Freymark *et al.*, 1994; Dingerdissen *et al.*, 1996; Simcox and Bennetzen, 1993) และได้มีรายงานลำดับเบสของยีนที่ในพืชที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความต้านทานต่อโรคของข้าวโพด จากองค์ความรู้เกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถนำไปใช้ตรวจหาและจำแนกข้าวโพดสายพันธุ์ที่ต้านทาน และไม่ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ได้ และซึ่งสามารถนำมาใช้คัดเลือกข้าวโพดต้นที่ต้านทาน และต้นไม่ต้านทานโรคได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำถึงระดับดีเอ็นเอ เป็นการลดเวลาในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีความ

ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ให้สั้นลงได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ ตรวจสอบและจำแนกข้าวโพดในประชากรของเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไป

การเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศโลกเป็นผลสืบเนื่องมาจากปรากฏการณ์จากภาวะโลกร้อนซึ่งมีสาเหตุจากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อผลผลิตการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศกำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทยที่การเกษตรพึ่งพาน้ำฝนและฤดูกาลตามธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น ความแปรปรวนของฤดูกาล ปัญหาภัยแล้งและน้ำท่วมที่เกิดบ่อยครั้งขึ้น ส่งผลกระทบต่อผลผลิตการเกษตรเป็นอย่างมาก ปัญหาน้ำท่วมและปัญหาภัยแล้งสร้างความเสียหายแก่เศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ดังนั้นการปรับตัวของภาคการเกษตรต่อการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง แนวทางในการปรับตัวของภาคการเกษตรวิธีการหนึ่ง ได้แก่ การปรับเปลี่ยนสายพันธุ์ให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เช่น พันธุ์ทนอุณหภูมิสูง พันธุ์ทนแล้ง และพันธุ์ทนน้ำท่วม เป็นต้น ซึ่งการค้นคว้าวิจัยเพื่อค้นหาและปรับปรุงพันธุ์ให้เหมาะสมดังกล่าว เป็นสิ่งที่มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมน้ำมันพืช อาหารสัตว์ และอาหารมนุษย์ จนถึงปัจจุบันนี้พันธุ์ถั่วเหลืองที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์และรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรมีจำนวน 18 พันธุ์ การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของถั่วเหลืองดังกล่าวมีการดำเนินการไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น ลักษณะของต้น ใบ ดอก ฝัก และเมล็ด รวมถึงลักษณะทางการเกษตร เช่น อายุถึงวันออกดอก อายุเก็บเกี่ยว ปริมาณโปรตีนและน้ำมันในเมล็ด เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2547) แต่ไม่มีการศึกษาถึงความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ รวมถึงความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้ง การศึกษาจะทำให้ทราบว่าพันธุ์รับรองใดเหมาะสมต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งที่สุด สามารถนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรให้ปลูกในพื้นที่ที่ประสบปัญหาดังกล่าว

ดังนั้นวิจัยครั้งนี้เพื่อพัฒนาและทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้จัดจำแนกพันธุ์ทุเรียนกล้วยไม้สกุลหวาย และตรวจสอบเพศของต้นกล้าอินทผลัม และเพื่อศึกษารูปแบบการปรากฏของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ และสการ์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุ์ข้าวโพด และศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ทุเรียนเป็นหนึ่งในไม้ผลที่มีความสำคัญมากของประเทศไทย มีการปลูกแพร่หลายตามภาคต่าง ๆ ของประเทศทำให้เกิดความซ้ำซ้อนในการตั้งชื่อ และข้อมูลด้านเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ตรวจสอบพันธุ์มีไม่เพียงพอ จึงได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (NGS) ผลจากการศึกษานี้ สามารถหาลำดับเบสรวมได้ 25,909,606,800 เบส จากข้อมูลขึ้นลำดับเบส (raw read) จำนวน 30,107,9102 read จากการรวม raw read ให้เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น (contig) ได้ 424,882 contig เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้ไปค้นหาเครื่องหมาย SSR พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 11,156 คู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสองมีมากที่สุด 6,545 (58.67%) คู่ไพรเมอร์ รองลงมาคือลำดับเบสซ้ำสาม 2,295 (20.57%) คู่ไพรเมอร์ ลำดับเบสซ้ำหก 1,056 (9.47%) คู่ไพรเมอร์ ลำดับเบสซ้ำสี่ 781 (7.00%) คู่ไพรเมอร์ และลำดับเบสซ้ำห้า 479 (4.29%) คู่ไพรเมอร์ และได้คัดเลือกหาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่าง พบไพรเมอร์ SSR 17 คู่ ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างกันในทุเรียน 40 พันธุ์ พบรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกัน 73 อัลลีล โดยแต่ละไพรเมอร์ให้อัลลีลที่ต่างกันตั้งแต่ 2-8 อัลลีล ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาได้จากการทดลองนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของทุเรียนที่เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่ปลูกในพื้นที่ต่างกัน และแต่มีชื่อเรียกต่างกันได้ และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน อีกทั้งยังประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์

อินทผลัมเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ต้นที่เพาะจากเมล็ดต้องรอให้ออกดอก 3-7 ปี ถึงจะทราบเพศทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา การทดลองนี้จึงได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จากการทดสอบไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยแสดงแถบดีเอ็นเอเฉพาะในต้นตัวผู้ที่มีขนาด 450 เบส การทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้ว จำนวน 169 ต้น พบผลการตรวจเพศไม่ตรงตามเพศจำนวน 8 ต้น คิดเป็นร้อยละ 4.7 มีความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลคิดเป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากการตีลูกเหล็ก พบมีความบริสุทธิ์เทียบเท่ากับการสกัดด้วยวิธี CTAB แต่รวดเร็วกว่า สำหรับการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM) โดยใช้ไพรเมอร์ DpHRM พบว่าสามารถแยกเพศเมียออกจากเพศผู้ได้ และตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการตรวจเพศอินทผลัมในระดับต้นกล้า

จากการสุ่มนำไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมด จำนวน 70 คู่สายมาทำ PCR กับตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์สกุลหวาย ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ 3

คู่สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ คือ ไพรเมอร์ Vandbirdo_022 Vandbirdo_026 และ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดแถบแบน จากไพรเมอร์ Vandbirdo_022 ประมาณ 240 คู่เบส เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ที่จำเพาะ 3 ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอกล้วยไม้ 96 สายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์ Vandbirdo_026 สามารถเพิ่มปริมาณจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ 74 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 280 คู่เบส และไพรเมอร์ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 80 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่เบส แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายได้ จึงได้ปรับใช้เทคนิคอื่นได้แก่การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด จากการรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จากฟาร์มเกษตรกรที่นำพันธุ์พืชมาจดทะเบียนพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กล้วยไม้สกุลหวายพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 30 สายพันธุ์ เพื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดบาร์โค้ด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต่าง ๆ จำนวน 4 ยีน ได้แก่ matK, ITS, trnH-psbA และ rbcL แล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติโดยบริษัทเอกชนและเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ได้ชื่อกล้วยไม้พร้อมทั้งสามารถจัดกลุ่มชนิดของกล้วยไม้หวายได้ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล phylogenetic tree โดยใช้ ClustalWII Phylogeny ผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ rbcL และ matK ซึ่งจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ต่อไป

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight, NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ที่ทำความเสียหายให้กับข้าวโพด ส่งผลกระทบต่อผลผลิตลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด การป้องกันความเสียหายจากโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่มีประสิทธิภาพและประหยัดมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวโพดจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ 12 คู่ไพรเมอร์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในพันธุ์ข้าวโพดที่พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค พบว่าไพรเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอต่อโรคและข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสการ์ SCA07496 SCA16420 SCB09464 และ SCE20429 ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลสการ์ทั้ง 4 เครื่องหมายให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กับการต้านทานต่อโรคกับพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ได้ทำการศึกษา

การศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม จำนวน 20 พันธุ์ ประกอบด้วยถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร 18 พันธุ์ และถั่วเหลืองที่ใช้เป็นพันธุ์ควบคุม (control) 2 พันธุ์ ได้แก่ อุตสาหะ-เอ และ Williams ในส่วนของลักษณะทางสรีรวิทยาได้ทำการทดสอบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอก และการทดสอบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรกงอกโดยใช้สาร Polyethylene glycol (PEG) แต่ผลการทดลองวางแผนแบบ 2 x 20 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance พบว่า ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมแตกต่างกัน พันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 พันธุ์เชียงใหม่ 2 และพันธุ์สุโขทัย 1 พันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 พันธุ์เชียงใหม่ 5 และพันธุ์ สจ.4 สำหรับสภาพแห้งแล้ง พันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 พันธุ์เชียงใหม่ 2 และพันธุ์สุโขทัย 1 พันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 พันธุ์เชียงใหม่ 84-2 และพันธุ์เชียงใหม่ 6 เมื่อกำหนดหาค่าความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอกในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีความสัมพันธ์ (Correlation) เชิงบวกระหว่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าถั่วเหลืองพันธุ์รับรองพันธุ์ใดเหมาะสมต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งที่เกิดขึ้นในช่วงปลูกถั่วเหลืองรวมถึงระยะแรกงอก สามารถนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรให้ปลูกในพื้นที่ที่ประสบปัญหาดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตาม การต่อยอดงานวิจัยนี้โดยการศึกษาสารพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรด้วยเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมหรือสภาพแห้งแล้ง คาดว่าจะเป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองในระดับยีน รวมถึงสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งไปใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในอนาคต

Abstract

Durian is one of the most important agricultural economic fruits in Thailand. It is widely grown in several parts of the country, resulting in duplication of names. However, the genetic information on durian is limited for the clones detection. It is necessary to develop more SSR molecular markers with next generation sequencing (NGS) technology. this study was development of SSR markers by next-generation sequencing and DNA fingerprinting in durian. In the present study, total of

25,909,606,800 base of sequence data were generated. We obtained 30,107,9102 raw reads. These reads were assembled into 424,882 contigs, 11,156 primers were designed. Di-nucleotides motifs being the most abundant 6,545 (58.67%) followed by tri- 2,295 (20.57%), hexa- 1,056 (9.47%), tetra- 781 (7.00%) and penta-nucleotide 479 (4.29%) repeats. After detecting 17 simple sequence repeat (SSR) markers for polymorphisms in 40 durian clones, all the seventeen microsatellite markers were found to be polymorphic for 73 alleles were found. In this present study, the number of alleles ranged from 2 to 8 alleles per locus. Microsatellite markers have been used to identify durian clones to obtain DNA fingerprints for clone identification to avoid the case of duplication. For example, similar clones of durian collected from several growing areas have different names. The DNA fingerprint information can be used to indicate the relationship and the difference of genetic base of each durian clone.

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is an economic importance fruit. The sex of plants became known only at the time of first flowering that takes around 3-7 years after seeding, which it wastes cost and time for crop management. This research aims to study and development of the techniques for sex detection in the seedling stage. The results showed DpDOAF and DpDOAR primers could identify the sex by PCR technique. The PCR fragments were generated with the length approximately 450 bp specific to male tree. For validation of DNA marker, the primers were used to amplify the DNA of 169 trees that are known the sex. The results of amplifications were shown 8 trees that inconsistent to the marker. It is 4.7 percentages of all samples. Therefore, the accuracy of these primers is 95.3 percentages. In part of DNA extraction by homogenizing with the steel ball method was indicated the purity equivalent to CTAB method and faster. Moreover, the sex of date palm could identify by HRM technique using DpHRM primers, which can be used for high throughput scanning. It is an alternative method to sex detection in a phase of seedlings.

Northern Corn Leaf Blight (NCLB) is a destructive foliar disease of maize that results from infection of the fungal pathogen, *Exserohilum turcicum*. The yield losses incurred from NCLB in Thailand may exceed 30-40 % when environmental conditions were optimal for disease development. Using the cultivars resistance to reduce the

detrimental effects of NCLB on maize productivity is the most cost-effective. However, this study was use of SSR and SCAR markers for detection on NCLB resistance in maize germplasm. After detecting 12 simple sequence repeat (SSR) markers for polymorphisms between resistant and susceptible cultivars of maize, three markers may be linked to NCLB resistance cultivars; umc2037, bnlg1233 and bnlg1607 were identified. The use of sequence characterized amplified region (SCAR) markers; SCA07₄₉₆ SCA16₄₂₀ SCB09₄₆₄ and SCE20₄₂₉ for polymorphisms between resistant and susceptible cultivars of maize, all of the SCAR markers were not related to the disease resistance of the studied maize cultivars.

Study of flooding tolerance and drought tolerance in DOA recommended soybean cultivars using biotechnology. Twenty soybean cultivars consisting of 18 DOA recommended cultivars and 2 control cultivars, namely Utsaha-A and Williams, were examined. In physiological test, germination percentage after soaking treatment and germination percentage under drought stress that induced by Polyethylene glycol (PEG) were measured to investigate seed-flooding tolerance and drought tolerance, respectively. Each experiment was performed as Factorial based on Completely Randomized Design (CRD) with four replications. Analysis of variance (ANOVA) was conducted for germination percentage. The result of seed-flooding tolerance test showed that the germination percentage was affected by different cultivars suggesting the presence of genetic control of seed-flooding tolerance. The three most tolerant cultivars in flooding were Srisamrong1, CM 2, and Sukothai1. The three most susceptible ones were CM1, CM5, and SJ4. In seed-drought tolerance test, the result showed that the three most tolerant cultivars were Srisamrong1, CM 2, and Sukothai1. The three most susceptible cultivars in drought stress were CM1, CM84-2, and CM6. Correlation between germination percentage after soaking treatment as seed-flooding tolerance and germination percentage under drought stress as seed-drought tolerance of the examined cultivars were calculated. And the result showed that there was a significant positive correlation between them, indicating that cultivars having tolerance to seed-flooding tended to show tolerance to seed-drought stress as well. From this research, the seed-flooding tolerance and drought tolerance of DOA recommended soybean cultivars was studied. The information will be useful for selecting soybean cultivars to plant in area with much rainfall or

flooding and area facing drought problem at sowing time. Further research in genetics such as study of molecular markers and genes related to flooding tolerance and drought tolerance using the DOA recommended soybean cultivars will help us to understand the tolerance mechanisms at gene level more clearly. Furthermore, identification of candidate molecular markers or genes applicable for marker-assisted selection for flooding tolerance and drought tolerance will be highly beneficial.

การทดลองที่ 1

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่
และการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุเรียน

Development of SSR markers by next-generation sequencing and DNA
Fingerprinting in Durian

ประสาน สีสสุข กุหลาบ คงทอง อรุณทัย ชาววา ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ศิริพร วรกุลดำรงชัย

คำสำคัญ เครื่องหมายโมเลกุล ทุเรียน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ molecular markers SSR Durian next-generation sequencing

บทคัดย่อ

ทุเรียนเป็นหนึ่งในไม้ผลที่มีความสำคัญมากของประเทศไทย มีการปลูกแพร่หลายตามภาคต่าง ๆ ของประเทศทำให้เกิดความซ้ำซ้อนในการตั้งชื่อ และข้อมูลด้านเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ตรวจสอบพันธุ์มีไม่เพียงพอ จึงได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (NGS) ผลจากการศึกษานี้ สามารถหาลำดับเบสรวมได้ 25,909,606,800 เบส จากข้อมูลขึ้นลำดับเบส (raw read) จำนวน 30,107,9102 read จากการรวม raw read ให้เป็นขึ้นดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น (contig) ได้ 424,882 contig เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้ไปค้นหาเครื่องหมาย SSR พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 11,156 คู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสองมีมากที่สุด 6,545 (58.67%) คู่ไพรเมอร์ รองลงมาคือลำดับเบสซ้ำสาม 2,295 (20.57%) คู่ไพรเมอร์ ลำดับเบสซ้ำหก 1,056 (9.47%) คู่ไพรเมอร์ ลำดับเบสซ้ำสี่ 781 (7.00%) คู่ไพรเมอร์ และลำดับเบสซ้ำห้า 479 (4.29%) คู่ไพรเมอร์ และได้คัดเลือกหาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่าง พบไพรเมอร์ SSR 17 คู่ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างกันในทุเรียน 40 พันธุ์ พบรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกัน 73 อัลลีล โดยแต่ละไพรเมอร์ให้อัลลีลที่ต่างกันตั้งแต่ 2-8 อัลลีล ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาได้จากการทดลองนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของทุเรียนที่เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่ปลูกในพื้นที่ต่างกัน และแต่มีชื่อเรียกต่างกันได้ และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน อีกทั้งยังประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์

Abstract

Durian is one of the most important agricultural economic fruits in Thailand. It is widely grown in several parts of the country, resulting in duplication of names. However, the genetic information on durian is limited for the clones detection. It is necessary to develop more SSR molecular markers with next generation sequencing (NGS) technology. this study was development of SSR markers by next-generation sequencing and DNA fingerprinting in durian. In the present study, total of 25,909,606,800 base of sequence data were generated. We obtained 30,107,9102 raw reads. These reads were assembled into 424,882 contigs, 11,156 primers were designed. Di-nucleotides motifs being the most abundant 6,545 (58.67%) followed by tri- 2,295 (20.57%), hexa- 1,056 (9.47%), tetra- 781 (7.00%) and penta-nucleotide 479 (4.29%) repeats. After detecting 17 simple sequence repeat (SSR) markers for polymorphisms in 40 durian clones, all the seventeen microsatellite markers were found to be polymorphic for 73 alleles were found. In this present study, the number of alleles ranged from 2 to 8 alleles per locus. Microsatellite markers have been used to identify durian clones to obtain DNA fingerprints for clone identification to avoid the case of duplication. For example, similar clones of durian collected from several growing areas have different names. The DNA fingerprint information can be used to indicate the relationship and the difference of genetic base of each durian clone.

คำนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นไม้ผลเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการส่งออกทั้งในรูปผลสด แช่แข็ง และแปรรูป ในประเทศไทยมีการปลูกทุเรียนมาเป็นเวลานาน จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์ เชื่อได้ว่าทุเรียนนำเข้ามาปลูกในประเทศไทย ตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยา และเป็นการนำมาจากทางใต้ของประเทศไทย โดยในระยะต้นมีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากเป็นการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ และเกษตรกรเป็นผู้คัดเลือกพันธุ์ที่ดีในอดีต ซึ่งเป็นผลดีต่อการปรับปรุงพันธุ์ทุเรียนมาจนถึงปัจจุบัน แต่พันธุ์ทุเรียนที่เกิดขึ้นมีการตั้งชื่อพันธุ์ในหลายๆ รูปแบบ ไม่มีหลักเกณฑ์ อาจใช้ชื่อผู้เพาะเมล็ด ชื่อสถานที่หรือตำแหน่งที่ต้นพันธุ์นั้นงอก ลักษณะรูปทรง ผล สี รสชาติ ฯลฯ ซึ่งเป็นลักษณะที่เด่นชัดเป็นตัวกำหนดในการตั้งชื่อ ประกอบกับมีการกระจายการปลูกทุเรียนไปยังภาคต่างๆ ทำให้มีการกระจายพันธุ์ไปยังแหล่งปลูกใหม่เป็นจำนวนมาก อาจทำให้หลายๆ พันธุ์ที่เป็นพันธุ์เดียวกัน มีการตั้งชื่อใหม่ จึงเป็นการซ้ำซ้อน สับสน และไม่สามารถใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการได้เท่าที่ควร พันธุ์ทุเรียนที่เกิดขึ้นจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้น ไม่สามารถทราบเชื้อสายพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์ได้ อีกทั้งลักษณะภายนอกไม่สามารถจำแนกพืชในระดับพันธุ์ได้อย่างชัดเจน วิธีการตรวจสอบพืชในระดับดี

เอ็นเอถือเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเที่ยงตรงสูง เนื่องจากไม่มีผลการทบจากสิ่งแวดล้อม และอิทธิพลของจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมกับยีนเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้การศึกษาพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอนั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการคัดเลือกที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกให้ได้จีโนไทป์ตามต้องการ โดยมีพื้นฐานอยู่บนความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่จะคัดเลือก การมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลหลาย ๆ ตำแหน่งที่วางอยู่บนแผนที่ยีน สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่จะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชทราบถึงตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ใช้เป็นแนวทางในการรวบรวมยีนที่ดีเด่นต่าง ๆ เข้ามาอยู่ในพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์พืชเข้ามาช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้น้อยลง เพิ่มประสิทธิภาพสูงทั้งในด้านความถูกต้องและแม่นยำ

ที่ผ่านมาเครื่องหมายโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ทุเรียน เช่น PCR-RFLPs, AFLP, RAPD และ SSR (Santoso, 2004; ฤทัยชนก, 2554; โองการ, 2554; ปิยรัชฎ์, 2552; ประสาน, 2556) โดยเฉพาะ SSR ถือว่าเป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี มีความเสถียรสูง ทำซ้ำได้ มีความหลากหลายสูง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าตำแหน่งเครื่องหมาย SSR ของทุเรียนที่ใช้อยู่ปัจจุบันมีน้อย ถ้าพิจารณาในเรื่องของการจำแนกพันธุ์พบว่าไม่เพียงพอในการใช้จำแนกสายพันธุ์ทุเรียนออกจากกันได้ทั้งหมด (ประสาน, 2556) และถ้าต้องการนำเครื่องหมาย SSR ไปใช้เพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชพบว่าเครื่องหมาย SSR มีน้อยจนไม่สามารถนำไปใช้หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่ต้องการ ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ของทุเรียนโดยใช้เทคนิค next-generation sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคที่ช่วยลดระยะเวลาลด ขั้นตอน และค่าใช้จ่ายในหาลำดับเบสของแต่ละโคลน

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์จากดีเอ็นเอของทุเรียน โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสยุคใหม่ เพื่อนำลำดับเบสที่ได้มาหาส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำแบบเอสเอสอาร์ พร้อมทั้งออกแบบไพรเมอร์ให้ขนาดข้างส่วนของลำดับเบสที่เป็นเอสเอสอาร์ แล้วนำไปทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับทุเรียน พร้อมทั้งนำไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ไปทดสอบหาชนิดของไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) กับทุเรียน

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2558 - กันยายน 2560

วิธีดำเนินการ

1. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์จากทุเรียน

1.1 เก็บตัวอย่างใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง จากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี

1.2 สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ วิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*, 1994 ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) เติม 0.2% β -mercaptoethanol ก่อน ใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นำใบกาแพ 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผง แป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาแช่ทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอน ดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สอง ครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ Lambda DNA ขนาด 30 และ 60 ng/ul และวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Qubit Fluorometer โดยใช้ชุด Qubit dsDNA HS Assay Kit โดยใช้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้อย่างน้อย 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

1.3 ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบสยุคใหม่ (next-generation sequencing; NGS) ด้วยส่งตัวอย่างวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Illumina (HiSeq 2000/2500) BGI Tech Solution (HongKong) Co., Limited พร้อมจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ (de novo assembly) ค้นหาตำแหน่งที่มีลำดับเบสซ้ำแบบเอสเอสอาร์ ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ ที่วิเคราะห์โดย BGI Tech Solution (HongKong) Co., Limited

1.5 ทดสอบหาอุณหภูมิและปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ ในการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียนพันธุ์หมอนทอง โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำการ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยมีส่วนประกอบด้วยดังต่อไปนี้

1. 10X PCR Buffer	2	ไมโครลิตร
2. 10 mM dNTP	0.4	ไมโครลิตร

3. 50 mM MgCl ₂	0.6	ไมโครลิตร
4. 10 μM Forward Primer	1	ไมโครลิตร
5. 10 μM Reverse Primer	1	ไมโครลิตร
6. ดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/ul)	5	ไมโครลิตร
7. 5 U/μl Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.2	ไมโครลิตร
8. เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ	20	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น

94 °C 2 นาที 1 รอบ	} 35 รอบ
94 °C 1 นาที	
55-60 °C 1 นาที	
72 °C 2 นาที	
72 °C 10 นาที 1 รอบ	

1.6 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ตรวจสอบโดยการย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

1.7 บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เพื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ทดสอบหาไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ

2. การทดสอบหาไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ

2.1 เก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอจากทุเรียน 40 พันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 ที่เก็บตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี และ แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี

2.2 สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปจากพืช แต่ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

2.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียน 4 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ จำนวน 100 คู่ไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 2

2.4 ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดซันดีเอ็นเอ ตรวจสอบและบันทึกภาพ

2.5 คัดเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทุเรียน 8 พันธุ์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมนำไปติดตามการเรืองแสงในขั้นต่อไป

2.6 นำลำดับเบสของไพรเมอร์เอสเอสอาร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุเรียนแต่ละพันธุ์ ในข้อ 2.5 นำไปติดตามด้วยสารเรืองแสง FAM VIC NED และ PET

2.7 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียน 40 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ที่ติดตามแล้ว จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มปริมาณได้ของแถบดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดซันดีเอ็นเอ ตรวจสอบผลและบันทึกภาพ

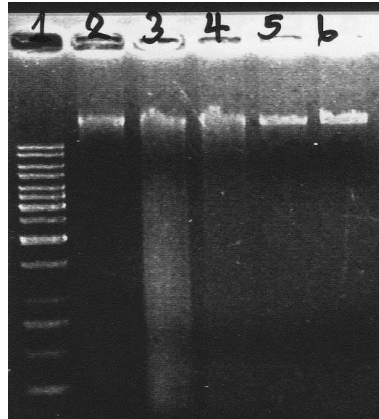
2.8 นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์ของทุเรียนพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ตามข้อ 2.7 ไปตรวจสอบขนาดของซันส่วนดีเอ็นเออย่างละเอียด โดยการแยกขนาดซันดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ ABI 310 Genetic Analyzer ที่มีตัวเปรียบเทียบขนาดซันดีเอ็นเออยู่ทุกตัวอย่าง (Internal Size Standard) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของซันดีเอ็นเอ (LIZ 500 Size Standard)

3.5 วิเคราะห์ผลและคำนวณขนาดของซันดีเอ็นเอที่พบในทุเรียนแต่ละพันธุ์ โดยใช้โปรแกรม GeneMapper Version 5.0

ผลการทดลองและอภิปราย

1. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์จากทุเรียน

1.1 ได้เก็บตัวอย่างใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง จากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี นำมาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง และสกัดดีเอ็นเอ พร้อมทั้งตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Qubit Fluorometer ได้ดีเอ็นเอจำนวน 3 หลอด ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมีดังนี้ หลอดที่ 1 ความเข้มข้น 42.9 ng/ul จำนวน 45 ul หลอดที่ 2 ความเข้มข้น 33.0.9 ng/ul จำนวน 30 ul และ หลอดที่ 3 ความเข้มข้น 49.3 ng/ul จำนวน 30 ul รวมปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 1,479 นาโนกรัม พบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับการส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสซ้ำโดยใช้เทคนิค next-generation sequencing จึงได้ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอทุเรียนไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง Illumina (HiSeq 2000/2500) กับบริษัท BGI Tech Solution (HongKong) Co., Limited พร้อมจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ (de novo assembly) ค้นหาตำแหน่งที่มีลำดับเบสซ้ำแบบเอสเอสอาร์ ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์



ภาพที่ 1 แสดงดีเอ็นเอของทุเรียน (2-6) ที่สกัดได้ และตรวจสอบด้วยอะกาโรส 1= 1 Kb DNA Ladder

1.2 ผลจากการวิเคราะห์หาลำดับเบสซ้ำ (SSR) ของทุเรียน โดยเทคนิคการวิเคราะห์หาลำดับเบสยุคใหม่ (next-generation sequencing; NGS) พร้อมทั้งจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอใหม่ (de novo assembly) และค้นหาลำดับเบสซ้ำแบบเอสเอสอาร์ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ผลจากการศึกษานี้ สามารถหาลำดับเบสรวมได้ 25,909,606,800 เบส จากข้อมูลขึ้นลำดับเบส (raw read) จำนวน 30,107,9102 read จากการรวม raw read ให้เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น (contig) ได้ 424,882 contig เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้ไปค้นหาเครื่องหมาย SSR พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 11,156 คู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำแบบซ้ำสองมีมากที่สุด 6,545 (58.67%) คู่ไพรเมอร์ รองลงมาคือลำดับเบสซ้ำสาม 2,295 (20.57%) คู่ไพรเมอร์ ลำดับเบสซ้ำหก 1,056 (9.47%) คู่ไพรเมอร์ ลำดับเบสซ้ำสี่ 781 (7.00%) คู่ไพรเมอร์ และลำดับเบสซ้ำห้า 479 (4.29%) คู่ไพรเมอร์ ตัวอย่างตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่ออกแบบจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของทุเรียนโดยใช้เทคนิค next-generation sequencing ได้แสดงในตารางที่ 2

1.3 จากการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียนพันธุ์หมอนทอง โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 100 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 98 คู่ไพรเมอร์ อีก 2 คู่ไพรเมอร์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 และตัวอย่างภาพเจลในภาพที่ 2

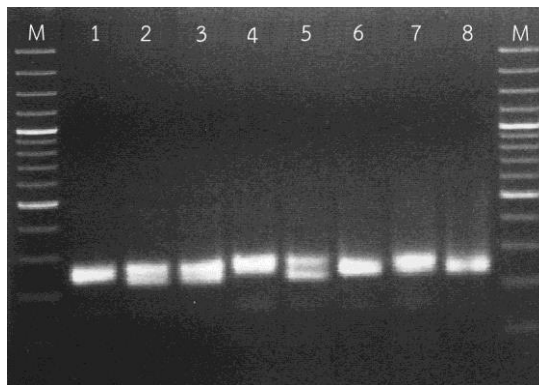


ภาพที่ 2 ไพรเมอร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ mDzDOA213 - mDzDOA230 M= 100 bp DNA Ladder

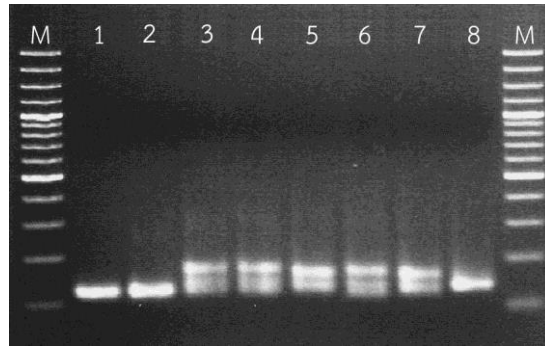
2. การทดสอบหาไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ

การทดสอบหาไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุเรียน ที่ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากข้อ 1.3 จำนวน 98 คู่ไพรเมอร์ ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับทุเรียน 8 พันธุ์ พบมีไพรเมอร์ จำนวน 68 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน (Polymorphism) คิดเป็น 69.39 % และมีไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอไม่แตกต่าง (Monomorphism) คิดเป็น 30.61 % ดังแสดงผลของแต่ละไพรเมอร์ในตารางที่ 3 และตัวอย่างผลการตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลของไพรเมอร์ mDzDOA209 และ mDzDOA211 (ภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4)

จึงได้เลือกไพรเมอร์เอสเอสอาร์ที่พัฒนาได้จากทุเรียนจำนวน 17 คู่ ไปติดฉลากสารเรืองแสงชนิด FAM VIC NED และ PET โดยไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือก ได้แก่ mDzDOA16-FAM mDzDOA52-VIC mDzDOA61-NED mDzDOA141-FAM mDzDOA154-VIC mDzDOA164-NED mDzDOA172-PET mDzDOA145-FAM mDzDOA165-NED mDzDOA173-PET mDzDOA148-FAM mDzDOA160-VIC mDzDOA162-VIC mDzDOA170-NED mDzDOA177-PET mDzDOA153-FAM และ mDzDOA179-PET เพื่อนำไปจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนพันธุ์ต่างๆ ต่อไป

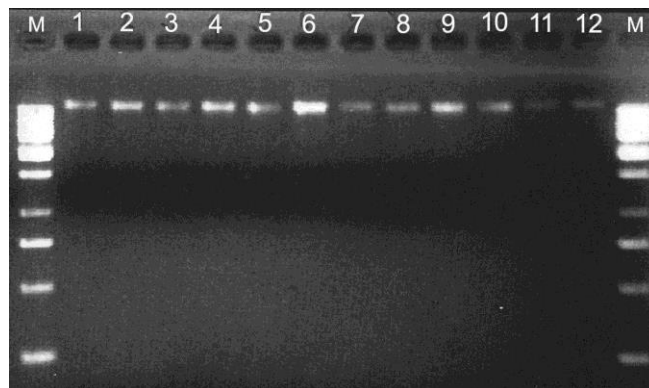


ภาพที่ 3 การคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างในพันธุ์ทุเรียน โดยการแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลลำดับที่ 1-8 = ไพรเมอร์ mDzDOA209 M = 100 bp plus DNA Ladder



ภาพที่ 4 การคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างในพันธุ์ทุเรียน โดยการแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลลำดับที่ 1-8 = ไพรเมอร์ mDzDOA211 M = 100 bp plus DNA Ladder

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบทุเรียน 40 พันธุ์ ดังตารางที่ 1 โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช และเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส สามารถตรวจเห็นแถบดีเอ็นเอจากภาพเจลได้ ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพบว่าดีเอ็นเอของทุเรียนทั้ง 40 พันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์



ภาพที่ 5 แสดงดีเอ็นเอของทุเรียน (1-12) ที่สกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช และตรวจสอบด้วยอะกาโรส M= 1 Kb DNA Ladder

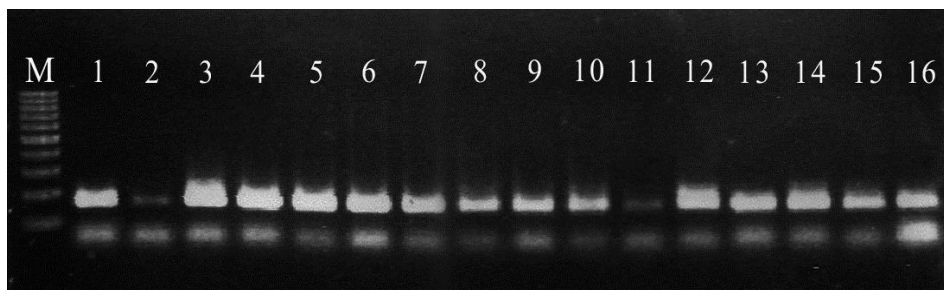
จากการทดลองจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียน 40 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จำนวน 17 คู่ ได้แก่ mDzDOA16-FAM mDzDOA52-VIC mDzDOA61-NED mDzDOA141-FAM mDzDOA154-VIC mDzDOA164-NED mDzDOA172-PET mDzDOA145-FAM mDzDOA165-NED mDzDOA173-PET mDzDOA148-FAM mDzDOA160-VIC mDzDOA162-VIC mDzDOA170-NED mDzDOA177-PET mDzDOA153-

FAM และ mDzDOA179-PET พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ 17 คู่ไพเรเมอร์ ที่พัฒนาได้จากทุเรียน สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 6 การใช้ไพเรเมอร์ต่างชนิดกันทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทุเรียน 40 พันธุ์ ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 7 บางพันธุ์อาจมีความเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ได้แถบดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดความแตกต่างขึ้นทั้งหมด 73 ตำแหน่ง (polymorphism alleles) ของทุเรียน 40 พันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นต่อไพเรเมอร์มีตั้งแต่ 2 ถึง 8 แถบ (alleles) ไพเรเมอร์แต่ละชนิดให้แถบดีเอ็นเอจำนวนต่าง ๆ คือ

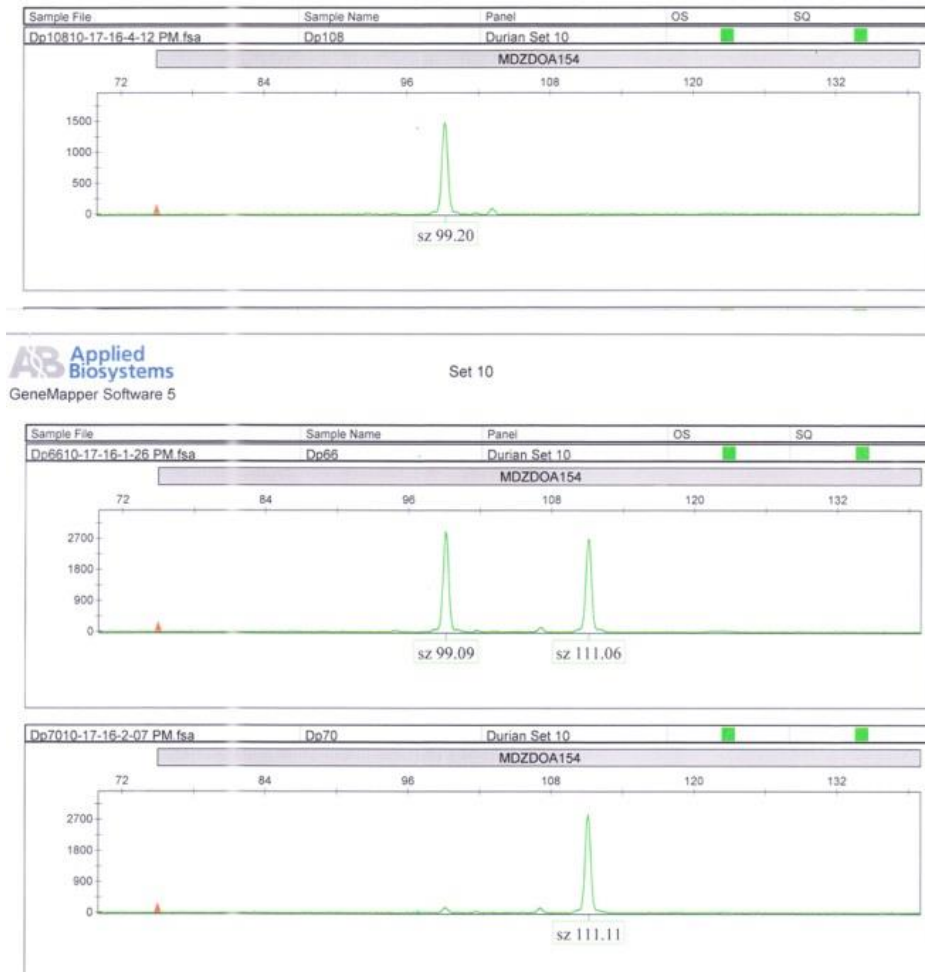
1. ไพเรเมอร์ที่ปรากฏดีเอ็นเอ 8 แถบ มีจำนวน 2 คู่ไพเรเมอร์ ได้แก่ mDzDOA52-VIC และ mDzDOA61-NED
2. ไพเรเมอร์ที่ปรากฏดีเอ็นเอ 4 แถบ มีจำนวน 9 คู่ไพเรเมอร์ ได้แก่ mDzDOA141-FAM mDzDOA154-VIC mDzDOA164-NED mDzDOA172-PET mDzDOA145-FAM mDzDOA165-NED mDzDOA162-VIC mDzDOA153-FAM และ mDzDOA179-PET
3. ไพเรเมอร์ที่ปรากฏดีเอ็นเอ 3 แถบ มีจำนวน 3 คู่ไพเรเมอร์ ได้แก่ mDzDOA16-FAM mDzDOA173-PET และ mDzDOA160-VIC
4. ไพเรเมอร์ที่ปรากฏดีเอ็นเอ 2 แถบ มีจำนวน 3 คู่ไพเรเมอร์ ได้แก่ mDzDOA148-FAM mDzDOA170-NED และ mDzDOA177-PET

การปรากฏจำนวนอัลลีลหรือจำนวนแถบดีเอ็นเอในการทดลองนี้ ซึ่งใช้พันธุ์ทุเรียนเพียง 40 พันธุ์ พบว่าไพเรเมอร์ mDzDOA52-VIC และ mDzDOA61-NED ให้แถบมากที่สุด จำนวน 8 อัลลีล ส่วนไพเรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 2 อัลลีล คือไพเรเมอร์ mDzDOA148-FAM mDzDOA170-NED และ mDzDOA177-PET อย่างไรก็ตามการปรากฏจำนวนอัลลีลของแต่ละไพเรเมอร์นั้น จะขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรที่ใช้ศึกษาด้วย หากใช้ประชากรจำนวนมากและประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม โอกาสที่จะพบจำนวนอัลลีลเพิ่มมากขึ้นก็จะมีมากด้วย ดังเช่นจากการศึกษาของ ประสาน และคณะ 2554 ได้วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ของข้าวโพด พบว่าการปรากฏจำนวนอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอที่ได้ทดสอบกับสายพันธุ์ข้าวโพด 186 ตัวอย่าง เมื่อใช้ไพเรเมอร์ bnlg161 ทำให้มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลสูงสุด 21 อัลลีล และการใช้ไพเรเมอร์ umc1535 มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีล 3 อัลลีล แต่อีกการทดลองหนึ่งเมื่อทดสอบกับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 26 พันธุ์ เมื่อใช้ไพเรเมอร์ bnlg161 และ umc1535 มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลเพียง 6 อัลลีล และ 2 อัลลีล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการปรากฏจำนวนอัลลีลของแต่ละไพเรเมอร์นั้นขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่าง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ทำการศึกษา ถ้าหากใช้จำนวนตัวอย่างมาก โอกาสที่จะตรวจพบอัลลีลทั้งหมดของประชากรก็จะเป็นไปได้สูงด้วย

จากการคำนวณค่าความถี่ของการเกิดรูปแบบแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์หาค่า PIC ในแต่ละไพรเมอร์ ซึ่งคำนวณจากจำนวนของแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่พบในทุเรียนจำนวน 40 สายพันธุ์ พบว่าค่า PIC มีตั้งแต่ต่ำสุดคือ 0.05 และสูงสุดคือ 0.79 โดยค่า PIC นี้เป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะพบความหลากหลาย (polymorphism) ว่ามีมากเท่าไร ซึ่งค่า PIC จะมีค่าสูงสุดได้ เท่ากับ 1 จากไพรเมอร์ที่ได้ศึกษาทั้งหมด 17 คู่ พบว่าไพรเมอร์ mDzDOA61-NED ให้ค่า PIC สูงที่สุดคือ เท่ากับ 0.79 รองลงมาคือ mDzDOA52-VIC mDzDOA154-VIC และ mDzDOA141-FAM มีค่า PICs เท่ากับ 0.73 0.72 และ 0.69 ตามลำดับ สำหรับไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC น้อยกว่านี้ ได้แสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 โดยไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC สูงนั้นถือว่าเป็นไพรเมอร์ให้ความหลากหลายของรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่สูงในประชากรที่ศึกษา ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนพันธุ์อื่นๆ



ภาพที่ 6 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ในพันธุ์ทุเรียน 16 พันธุ์ โดยการแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจล ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ mDzDOA165



ภาพที่ 7 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ในพันธุ์ทุเรียน โดยการแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแบบละเอียดโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ABI PRISM™ 310 DNA Sequencer ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ mDzDOA154

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อทุเรียนพันธุ์ และแหล่งที่มาของตัวอย่างพันธุ์ทุเรียนที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน	รหัสพันธุ์	แหล่งที่มาของตัวอย่างพันธุ์
1	จันทบุรี 1	Dt1	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
2	จันทบุรี 2	Dt2	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
3	จันทบุรี 3	Dt3	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
4	จันทบุรี 4	Dt4	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
5	จันทบุรี 5	Dt5	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
6	จันทบุรี 6	Dt6	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
7	จันทบุรี 7	Dt7	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน	รหัสพันธุ์	แหล่งที่มาของตัวอย่างพันธุ์
8	จันทบุรี 8	Dt8	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
9	จันทบุรี 9	Dt9	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
10	สามกึ่ง	Dt19	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
11	ชะนี	Dp45	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
12	หมอนทอง	Dp50	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
13	สาธิตกา	Dp53	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
14	พวงมณี	Dp60	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
15	ก้านยาว	Dp86	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
16	นวลทองจันทร์	Dp88	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
17	ชะนีน้ำตาลทราย	Dt13	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
18	ชะนีก้านยาว	Dh21	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
19	หลงลับแล	Dh41	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
20	หลินลับแล	Dh42	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
21	ไม่รู้ชื่อพันธุ์	Dp108	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
22	กบขายน้ำ	Dt14	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
23	ทองใหม่	Dt15	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
24	กะเทยข้าวสั้น	Dt16	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี
25	กบขายน้ำ	Dh22	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
26	ก้านยาวพวง	Dh27	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
27	ลวงทอง	Dh36	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
28	ลวง	Dh37	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
29	เม็ดในยายปราง	Dh39	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
30	กบพวง	Dp67	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
31	ไอ้ใหม่	Dp74	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
32	ก้านยาววัดสัก	Dp82	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
33	กระดุมสีนาก	Dp85	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
34	ทุเรียนนก	Dp102	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
35	กระดุมเขียว	Dp103	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
36	กระดุม	Dp105	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
37	ทองใหม่	Dp128	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี
38	เม็ดในยายปราง	Dp135	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน	รหัสพันธุ์	แหล่งที่มาของตัวอย่างพันธุ์
39	จอกลอย	Dh32	แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน จ.จันทบุรี
40	หลงลับแล	Dp140	ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่ออกแบบจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของทุเรียนโดยใช้เทคนิค next-generation sequencing

No.	Primer Name	Motif	Repeats	Tm_F	Tm_R	PCR_Length
1	mDzDOA16	AAATTC	8	61.4	60.6	158
2	mDzDOA42	GT	25	62.9	63.2	160
3	mDzDOA52	AC	39	62	61.6	160
4	mDzDOA61	AC	14	63.4	64	158
5	mDzDOA141	TTAT	20	62.5	61.8	299
6	mDzDOA145	TTAT	19	62.8	62.7	202
7	mDzDOA148	AAAT	19	62.7	62.8	286
8	mDzDOA151	TTTA	19	61	60.4	160
9	mDzDOA152	GAAA	19	63.8	62.9	159
10	mDzDOA153	TTTA	18	62.3	61.6	240
11	mDzDOA154	TTCT	18	62	62.6	155
13	mDzDOA157	AAAT	18	61.9	62.8	150
13	mDzDOA158	AATG	18	62.5	61.6	154
14	mDzDOA159	TTAT	18	62.2	62.9	237
15	mDzDOA160	AAAT	18	60.6	61.6	298
16	mDzDOA161	AAAT	18	62.9	63.9	156
17	mDzDOA162	TTTA	18	61.7	62.5	273
18	mDzDOA163	AAAT	18	63	62.9	154
19	mDzDOA164	AAAT	18	62.6	63	157
20	mDzDOA165	ATAC	18	62.9	63.1	203
21	mDzDOA166	TTAA	18	62.1	62.1	236
22	mDzDOA167	TATG	17	62.6	63.2	238
23	mDzDOA168	CATA	17	62	63	186
24	mDzDOA169	AATG	17	60.4	60	143
25	mDzDOA170	AAAT	17	61.9	61.3	159

No.	Primer Name	Motif	Repeats	Tm_F	Tm_R	PCR_Length
26	mDzDOA171	TTAA	17	62.8	62.3	214
27	mDzDOA172	TATT	17	62.9	63	146
28	mDzDOA173	TTTA	17	61.5	61	153
29	mDzDOA174	ATGT	17	62.5	63.5	146
30	mDzDOA175	AAAT	17	62	62	160
31	mDzDOA176	TCTT	17	62.6	63	212
32	mDzDOA177	TTTA	17	62.4	61.4	159
33	mDzDOA178	ATAC	17	62.8	63.2	151
34	mDzDOA179	TATG	17	62.3	61.3	160
35	mDzDOA180	AATT	16	61.3	61.7	238
36	mDzDOA181	CATT	16	62.5	61.8	155
37	mDzDOA182	ATAC	16	62.6	62.7	160
38	mDzDOA183	GTAT	16	62.7	63	116
39	mDzDOA184	GAAA	16	60.3	60.3	148
40	mDzDOA185	CATA	16	62.4	62.1	140
41	mDzDOA186	ATAA	16	63	62.4	227
42	mDzDOA187	TTCA	16	61.8	61.7	152
43	mDzDOA188	TAAT	16	64.3	64.8	238
44	mDzDOA189	ATGA	16	61.2	62	160
45	mDzDOA190	TTTA	16	63.2	62.9	224
46	mDzDOA191	ACAT	16	62.8	63.4	157
47	mDzDOA192	AGAT	16	62.9	63	234
48	mDzDOA193	TTAT	16	61.5	61.2	113
49	mDzDOA194	TTAT	16	62.3	63.1	192
50	mDzDOA195	ATTA	16	62.3	61.4	236
51	mDzDOA196	ATTT	16	63	63	238
51	mDzDOA197	AAAT	16	62.6	63	160
53	mDzDOA198	AATA	16	61.2	60.6	156
54	mDzDOA199	TTTA	16	61.5	62.5	158
55	mDzDOA200	AAAT	16	63.3	63.2	205
56	mDzDOA201	TTTTAT	8	60.5	60.2	187

No.	Primer Name	Motif	Repeats	Tm_F	Tm_R	PCR_Length
57	mDzDOA202	TTAAAT	8	62.3	62.1	284
58	mDzDOA203	AAAGAT	8	62.3	62.1	151
59	mDzDOA204	ATTTTA	8	62.8	62.7	227
60	mDzDOA205	TTCATT	8	60.4	61.2	156
61	mDzDOA206	AAAAAG	8	63.3	63	115
62	mDzDOA207	AAAATT	8	61.2	61.2	158
63	mDzDOA208	ATTTTA	8	63.2	62.5	158
64	mDzDOA209	TATATC	8	62.8	62.8	231
65	mDzDOA210	AATTTT	8	63	62.4	236
66	mDzDOA211	TCCTAT	7	62.9	63.2	135
67	mDzDOA212	AAATTA	7	62.5	63.3	157
68	mDzDOA213	GATGAG	7	62.9	63.3	149
69	mDzDOA214	CTGATA	7	62.4	63.2	117
70	mDzDOA215	TTTTAT	7	61.9	62.6	261
71	mDzDOA216	AATAAA	7	62.5	63.1	130
72	mDzDOA217	TATTAC	7	62.8	62.8	147
73	mDzDOA218	GCACAA	7	62.9	63	148
74	mDzDOA219	TGCTGT	7	63.7	62.7	128
75	mDzDOA220	CCTCGA	7	63	62.6	205
76	mDzDOA221	GATTGG	7	63.3	63.5	142
77	mDzDOA222	GACGAA	7	63.3	62.8	145
78	mDzDOA223	AATTAT	7	62.6	62.9	159
79	mDzDOA224	GCAGGT	7	62.5	62.5	138
80	mDzDOA225	TGCTGT	7	62.5	62.8	131
81	mDzDOA226	GAACTG	7	62.9	63	134
82	mDzDOA227	CTGGGG	7	63	63.8	128
83	mDzDOA228	CGAAGT	7	62.9	63.5	118
84	mDzDOA229	CCTAAA	7	63	62.9	160
85	mDzDOA230	CATGTG	7	60.9	61.5	160
86	mDzDOA231	AAGACG	7	62.2	63	155
87	mDzDOA232	CTGTCT	7	62.5	62.8	148

No.	Primer Name	Motif	Repeats	Tm_F	Tm_R	PCR_Length
88	mDzDOA233	TATATG	7	63	62.7	153
89	mDzDOA234	TTAAAT	7	60.9	61.6	210
90	mDzDOA235	CGTCCT	7	63.5	63.5	150
91	mDzDOA236	TCTTTC	7	63.2	62.3	109
92	mDzDOA237	TTTTGC	7	62.9	63.9	114
93	mDzDOA238	TATTTA	6	62.7	62.8	154
94	mDzDOA239	GACACA	6	63	62.2	160
95	mDzDOA240	AGACAA	6	63	63.1	147
96	mDzDOA241	TTTGG	16	63	63.2	153
97	mDzDOA242	ATTTT	16	60.1	60	160
98	mDzDOA243	GTTTT	16	63.6	62.7	146
99	mDzDOA244	TAAAT	16	63.1	63	225
100	mDzDOA245	TTTAT	15	61	60.1	237

ตารางที่ 3 แสดงผลของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ที่ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียน พันธุ์หมอนทอง

No.	Primer Name	PCR Product	Polymorphism
1	mDzDOA16	Y	P
2	mDzDOA42	Y	P
3	mDzDOA52	Y	P
4	mDzDOA61	Y	P
5	mDzDOA141	Y	P
6	mDzDOA145	Y	P
7	mDzDOA148	Y	P
8	mDzDOA151	Y	P
9	mDzDOA152	Y	M
10	mDzDOA153	Y	P
11	mDzDOA154	Y	P
13	mDzDOA157	Y	M
13	mDzDOA158	Y	M
14	mDzDOA159	Y	M

No.	Primer Name	PCR Product	Polymorphism
15	mDzDOA160	Y	P
16	mDzDOA161	Y	M
17	mDzDOA162	Y	P
18	mDzDOA163	Y	M
19	mDzDOA164	Y	P
20	mDzDOA165	Y	P
21	mDzDOA166	Y	P
22	mDzDOA167	Y	M
23	mDzDOA168	Y	M
24	mDzDOA169	Y	M
25	mDzDOA170	Y	P
26	mDzDOA171	Y	P
27	mDzDOA172	Y	P
28	mDzDOA173	Y	P
29	mDzDOA174	Y	M
30	mDzDOA175	Y	M
31	mDzDOA176	Y	P
32	mDzDOA177	Y	P
33	mDzDOA178	Y	M
34	mDzDOA179	Y	P
35	mDzDOA180	Y	M
36	mDzDOA181	Y	M
37	mDzDOA182	Y	M
38	mDzDOA183	Y	P
39	mDzDOA184	Y	M
40	mDzDOA185	Y	M
41	mDzDOA186	Y	M
42	mDzDOA187	Y	M
43	mDzDOA188	Y	P
44	mDzDOA189	Y	M
45	mDzDOA190	Y	M

No.	Primer Name	PCR Product	Polymorphism
46	mDzDOA191	Y	P
47	mDzDOA192	Y	M
48	mDzDOA193	Y	P
49	mDzDOA194	Y	M
50	mDzDOA195	Y	M
51	mDzDOA196	Y	M
51	mDzDOA197	Y	P
53	mDzDOA198	Y	M
54	mDzDOA199	Y	M
55	mDzDOA200	Y	P
56	mDzDOA201	Y	P
57	mDzDOA202	Y	P
58	mDzDOA203	Y	P
59	mDzDOA204	Y	M
60	mDzDOA205	Y	P
61	mDzDOA206	Y	P
62	mDzDOA207	Y	M
63	mDzDOA208	Y	M
64	mDzDOA209	Y	P
65	mDzDOA210	Y	P
66	mDzDOA211	Y	P
67	mDzDOA212	Y	P
68	mDzDOA213	Y	P
69	mDzDOA214	Y	P
70	mDzDOA215	Y	P
71	mDzDOA216	Y	P
72	mDzDOA217	Y	P
73	mDzDOA218	Y	P
74	mDzDOA219	Y	P
75	mDzDOA220	Y	P
76	mDzDOA221	Y	P

No.	Primer Name	PCR Product	Polymorphism
77	mDzDOA222	Y	P
78	mDzDOA223	Y	P
79	mDzDOA224	Y	P
80	mDzDOA225	Y	P
81	mDzDOA226	Y	P
82	mDzDOA227	Y	P
83	mDzDOA228	Y	P
84	mDzDOA229	N	N
85	mDzDOA230	Y	P
86	mDzDOA231	Y	P
87	mDzDOA232	Y	P
88	mDzDOA233	Y	P
89	mDzDOA234	Y	P
90	mDzDOA235	Y	P
91	mDzDOA236	Y	P
92	mDzDOA237	N	N
93	mDzDOA238	Y	P
94	mDzDOA239	Y	P
95	mDzDOA240	Y	P
96	mDzDOA241	Y	P
97	mDzDOA242	Y	P
98	mDzDOA243	Y	P
99	mDzDOA244	Y	P
100	mDzDOA245	Y	P

Y = สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ N = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

P = ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างพันธุ์ M = แถบดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์

ตารางที่ 4 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบในทุเรียนพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอส

เอสอาร์ไพรเมอร์ mDzDOA16 mDzDOA52 mDzDOA61 และ mDzDOA141

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)			
		mDzDOA16	mDzDOA52	mDzDOA61	mDzDOA141
1	จันทบุรี 1 (Dt1)	132, 145	116	158, 174	227, 235
2	จันทบุรี 2 (Dt2)	121	114, 116	156, 158	227, 243
3	จันทบุรี 3 (Dt3)	121, 132	98, 111	158, 174	227, 235
4	จันทบุรี 4 (Dt4)	132	116	156, 174	235
5	จันทบุรี 5 (Dt5)	121, 132	111, 116	174	235
6	จันทบุรี 6 (Dt6)	132	111, 116	156, 174	227, 235
7	จันทบุรี 7 (Dt7)	121, 132	98, 116	156, 158	227
8	จันทบุรี 8 (Dt8)	121	116	156, 158	227, 243
9	จันทบุรี 9 (Dt9)	121	98, 116	156, 158	235, 243
10	สามกิง (Dt19)	121, 132	111, 114	156, 174	235, 243
11	ชะนี (Dp45)	121	98, 116	158, 174	227, 235
12	หมอนทอง (Dp50)	132	107, 116	166, 174	227, 243
13	สาริกา (Dp53)	121, 132	116	156	235, 243
14	พวงมณี (Dp60)	121, 132	111, 114	156, 174	235, 243
15	ก้านยาว (Dp86)	132	111, 116	156, 174	227, 235
16	นวลทองจันทร์ (Dp88)	132	111, 114	174	235
17	ชะนีน้ำตาลทราย (Dt13)	121, 132	98	143, 158	235
18	ชะนีก้านยาว (Dh21)	121, 132	98	143, 158	235
19	หลงลับแล (Dh41)	121, 132	98, 116	158	227
20	หลินลับแล (Dh42)	121, 132	98, 116	145, 158	227, 243
21	ไม่รู้ชื่อพันธุ์ (Dp108)	132, 145	95, 111	174	227
22	กบขายน้า (Dt14)	121	98, 116	166	227
23	ทองใหม่ (Dt15)	121, 132	98	158, 174	227
24	กะเทยข้าวสัน (Dt16)	121	98, 116	166	227
25	กบขายน้า (Dh22)	121	98, 116	166	227
26	ก้านยาวพวง (Dh27)	132	111, 116	156, 174	-
27	ลวงทอง (Dh36)	121, 132	107, 116	166, 170	227, 235
28	ลวง (Dh37)	121, 132	107, 116	166, 170	227, 235

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของซันตีเอ็นเอทีพบ (คู่เบส)			
		mDzDOA16	mDzDOA52	mDzDOA61	mDzDOA141
29	เม็ดในยายปราง (Dh39)	132, 145	114, 116	156, 170	227, 235
30	กบพวง (Dp67)	132, 145	114, 116	156, 158	227, 235
31	ไอ้ใหม่ (Dp74)	121, 145	114, 116	156, 170	227
32	ก้านยาววัดสัก (Dp82)	121	98, 116	166	227
33	กระดุมสีนาก (Dp85)	132, 145	114, 116	156, 158	227, 235
34	ทุเรียนนก (Dp102)	121, 132	88, 101	145, 150	227
35	กระดุมเขียว (Dp103)	132, 145	114, 116	156, 158	227, 235
36	กระดุม (Dp105)	132, 145	114, 116	156, 158	227, 235
37	ทองใหม่ (Dp128)	121, 132	98	158	227
38	เม็ดในยายปราง (Dp135)	132, 145	114, 116	156, 170	227, 235
39	จอกลอย (Dh32)	132, 145	116	156, 158	227, 235
40	หลงลับแล (Dp140)	121	98, 116	158	227

* ตัวอักษรภายในวงเล็บตามหลังชื่อพันธุ์ทุเรียน แสดงถึงลำดับที่ของการจัดเก็บตัวอย่าง และอักษรแสดงถึงสถานที่จัดเก็บตัวอย่าง โดย Dp = ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี (พืชสวนพลู) Dt = ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี (ทุ่งพล) Dh = แปลงรวบรวมพันธุ์ทุเรียนห้วยสะพานหิน (ภายใต้การกำกับดูแลของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี)

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงขนาดของซันตีเอ็นเอทีตรวจพบในทุเรียนพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ mDzDOA154 mDzDOA164 mDzDOA172 และ mDzDOA145

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของซันตีเอ็นเอทีพบ (คู่เบส)			
		mDzDOA154	mDzDOA164	mDzDOA172	mDzDOA145
1	จันทบุรี 1 (Dt1)	112	98	90	152, 157
2	จันทบุรี 2 (Dt2)	100	98, 104	90	157
3	จันทบุรี 3 (Dt3)	100, 112	98	90	141, 152
4	จันทบุรี 4 (Dt4)	104, 112	98, 104	90, 98	141
5	จันทบุรี 5 (Dt5)	100, 112	98	90	152
6	จันทบุรี 6 (Dt6)	104, 112	98, 104	90, 98	152
7	จันทบุรี 7 (Dt7)	100, 104	98	90	157
8	จันทบุรี 8 (Dt8)	100, 104	98, 104	90, 98	141, 157
9	จันทบุรี 9 (Dt9)	100, 112	98, 104	90, 98	141, 157

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของชั้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)			
		mDzDOA154	mDzDOA164	mDzDOA172	mDzDOA145
10	สามกิง (Dt19)	100	104	90	152, 157
11	ชะนี (Dp45)	100, 104	98	90	152, 157
12	หมอนทอง (Dp50)	104	104	90, 98	152
13	สาริกา (Dp53)	104, 112	104	90, 98	141, 152
14	พวงมณี (Dp60)	100	104	90	152, 157
15	ก้านยาว (Dp86)	104, 112	98	90	141
16	นวลทองจันทร์ (Dp88)	100, 112	98, 104	90	152, 157
17	ชะนีน้ำตาลทราย (Dt13)	100, 104	98, 104	90	141
18	ชะนีก้านยาว (Dh21)	100, 104	98, 104	90	141
19	หลงลับแล (Dh41)	108, 112	98	90, 98	152, 157
20	หลินลับแล (Dh42)	108, 112	98	90, 98	152, 157
21	ไม่รู้ชื่อพันธุ์ (Dp108)	100	104	90, 98	152
22	กบชายน้ำ (Dt14)	104, 112	98, 104	86, 90, 98	157
23	ทองใหม่ (Dt15)	100, 112	104	90, 98	141,152,159
24	กะเทยข้าวสัน (Dt16)	104, 112	98, 104	86, 90, 98	157
25	กบชายน้ำ (Dh22)	104, 112	98, 104	86, 90, 98	157
26	ก้านยาวพวง (Dh27)	104, 112	98	90	141
27	ลวงทอง (Dh36)	100, 112	104	90, 98	157
28	ลวง (Dh37)	100, 112	98	90, 98	157
29	เมียดในยายปราง (Dh39)	100, 112	98	90, 98	152, 157
30	กบพวง (Dp67)	100, 112	98	90, 98	152
31	ไอ้ใหม่ (Dp74)	-	-	-	141, 152
32	ก้านยาววัดสัก (Dp82)	104, 112	98, 104	98	157
33	กระดุมสีนาก (Dp85)	100, 112	98	90, 98	152
34	ทุเรียนนก (Dp102)	104, 108	93	90, 98	141
35	กระดุมเขียว (Dp103)	100, 112	98, 104	90, 98	141, 152
36	กระดุม (Dp105)	100, 112	98	90, 98	152
37	ทองใหม่ (Dp128)	100, 112	98, 104	90, 98	141, 152
38	เมียดในยายปราง (Dp135)	100, 112	98	90, 98	152, 157
39	จอกลอย (Dh32)	104, 112	98	98	141, 152

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของซันตีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)			
		mDzDOA154	mDzDOA164	mDzDOA172	mDzDOA145
40	หลงลับแล (Dp140)	108, 112	98	90, 98	152, 157

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงขนาดของซันตีเอ็นเอที่ตรวจพบในทุเรียนพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ไพรมเมอร์ mDzDOA165 mDzDOA173 mDzDOA148 และ mDzDOA160

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของซันตีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)			
		mDzDOA165	mDzDOA173	mDzDOA148	mDzDOA160
1	จันทบุรี 1 (Dt1)	154	105, 117	228	256, 264
2	จันทบุรี 2 (Dt2)	150	105, 109	228	264
3	จันทบุรี 3 (Dt3)	154	105	228	256, 264
4	จันทบุรี 4 (Dt4)	154	105, 109	228	256, 264
5	จันทบุรี 5 (Dt5)	154	105	228	256, 264
6	จันทบุรี 6 (Dt6)	154	105, 109	228	264
7	จันทบุรี 7 (Dt7)	154	105	228	264
8	จันทบุรี 8 (Dt8)	154	105, 109	228	256, 264
9	จันทบุรี 9 (Dt9)	154	105, 109	228	256, 264
10	สามกิง (Dt19)	154	105, 109	228	256, 264
11	ชะนี (Dp45)	150	105	228	264
12	หมอนทอง (Dp50)	154, 162	109	228	256
13	สาร์กา (Dp53)	154	109	228	256, 264
14	พวงมณี (Dp60)	154	105, 109	228	256, 264
15	ก้านยาว (Dp86)	154	105	228	256, 264
16	นวลทองจันทร์ (Dp88)	154	105	228	256, 264
17	ชะนีน้ำตาลทราย (Dt13)	154	105, 109	228	256, 264
18	ชะนีก้านยาว (Dh21)	154	105, 109	228	256, 264
19	หลงลับแล (Dh41)	154	105, 117	228	264
20	หลินลับแล (Dh42)	154	105, 109	236	264
21	ไม่รู้ชื่อพันธุ์ (Dp108)	154	105, 109	228	256, 264
22	กบขายน้า (Dt14)	154, 162	109	228	256, 264
23	ทองใหม่ (Dt15)	154	109	228	256, 264

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของชั้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)			
		mDzDOA165	mDzDOA173	mDzDOA148	mDzDOA160
24	กะเทยข้าวสั้น (Dt16)	154, 162	109	228	256, 264
25	กบขายน้ำ (Dh22)	154, 162	109	228	256, 264
26	ก้านยาวพวง (Dh27)	154	105	228	256, 264
27	ลวงทอง (Dh36)	150, 162	109	228	256
28	ลวง (Dh37)	150, 162	109	228	256
29	เม็ดในยายปราง (Dh39)	150	109	228	256
30	กบพวง (Dp67)	150	109, 117	228	256, 264
31	ไอ้ใหม่ (Dp74)	150	109	228	256, 264
32	ก้านยาววัดสัก (Dp82)	154	109	228	256, 264
33	กระดุมสีนาก (Dp85)	150	109, 117	228	256, 264
34	ทุเรียนนก (Dp102)	150	109, 117	228	239
35	กระดุมเขียว (Dp103)	150	109, 117	228	256, 264
36	กระดุม (Dp105)	154	109, 117	228	256, 264
37	ทองใหม่ (Dp128)	154	109	228	256, 264
38	เม็ดในยายปราง (Dp135)	150	109	228	256
39	จอกลอย (Dh32)	154	105, 117	228	256, 264
40	หลงลับแล (Dp140)	150, 154	105, 117	228	256

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงขนาดของชั้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบในทุเรียนพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมาย

โมเลกุลเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ mDzDOA162 mDzDOA170 mDzDOA177

mDzDO153 และ mDzDOA179

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของชั้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)				
		mDzDOA162	mDzDOA170	mDzDOA177	mDzDOA153	mDzDOA179
1	จันทบุรี 1 (Dt1)	219	120	103, 112	184	123, 127
2	จันทบุรี 2 (Dt2)	187	107, 120	103	184	123, 127
3	จันทบุรี 3 (Dt3)	187	107	103, 112	184, 192	123, 127
4	จันทบุรี 4 (Dt4)	219	107	103, 112	192	123, 127
5	จันทบุรี 5 (Dt5)	187	107	103	184, 192	127
6	จันทบุรี 6 (Dt6)	187	107	103, 112	184, 192	127
7	จันทบุรี 7 (Dt7)	187	107, 120	103	192	123, 127

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของชั้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)				
		mDzDOA162	mDzDOA170	mDzDOA177	mDzDOA153	mDzDOA179
8	จันทบุรี 8 (Dt8)	187, 219	107	103	184, 192	127
9	จันทบุรี 9 (Dt9)	187, 219	107	103	192	127
10	สามกิง (Dt19)	187	107, 120	103, 112	184	123, 127
11	ชะนี (Dp45)	187, 219	107	103	184, 192	127
12	หมอนทอง (Dp50)	219	107, 120	103	184, 192	123, 127
13	สาริกา (Dp53)	219	107	103, 112	192	127
14	พวงมณี (Dp60)	187	107, 120	103, 112	184	123, 127
15	ก้านยาว (Dp86)	187	107, 120	103, 112	184, 192	123, 127
16	นวลทองจันทร์ (Dp88)	187, 219	120	103, 112	184, 192	123, 127
17	ชะนีน้ำตาลทราย (Dt13)	187	107, 120	103, 112	184, 192	127
18	ชะนีก้านยาว (Dh21)	187	107, 120	103, 112	184, 192	127
19	หลงลับแล (Dh41)	187, 219	107	103, 112	184, 192	123, 127
20	หลินลับแล (Dh42)	187, 219	107, 120	103, 112	184, 192	127
21	ไม่รู้ชื่อพันธุ์ (Dp108)	187, 219	107, 120	112	184	119, 123
22	กบชายน้ำ (Dt14)	187	107, 120	112	184, 188	123
23	ทองใหม่ (Dt15)	187	107, 120	103, 112	184, 192	127
24	กะเทยข้าวสัน (Dt16)	187	107, 120	112	184, 188	123
25	กบชายน้ำ (Dh22)	187	107, 120	112	184, 188	123
26	ก้านยาวพวง (Dh27)	187, 219	107, 120	103, 112	184, 192	123, 127
27	ลวงทอง (Dh36)	219	107	103	184, 192	119, 127
28	ลวง (Dh37)	219	107	103	184, 192	119, 127
29	เม็ดในยายปราง (Dh39)	219	107	103, 112	184	119, 123
30	กบพวง (Dp67)	219	107, 120	103, 112	184, 188	123, 127
31	ไอ้ใหม่ (Dp74)	-	107, 120	103	184, 192	119, 127
32	ก้านยาววัดสัก (Dp82)	187, 219	107, 120	112	184, 188	123
33	กระดุมสีนาก (Dp85)	219	107, 120	103, 112	184, 188	123, 127
34	ทุเรียนนก (Dp102)	191	107, 120	103	192, 196	123
35	กระดุมเขียว (Dp103)	219	107, 120	103, 112	184, 188	123, 127
36	กระดุม (Dp105)	219	107, 120	103, 112	184, 188	123, 127
37	ทองใหม่ (Dp128)	187	107	103, 112	184, 192	127

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ทุเรียน*	ขนาดของชั้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)				
		mDzDOA162	mDzDOA170	mDzDOA177	mDzDOA153	mDzDOA179
38	เม็ดในยายปราง (Dp135)	219	107	103, 112	184	119, 123
39	จอกลอย (Dh32)	219	107	103, 112	184	123, 127
40	หลงลับแล (Dp140)	219	107	103, 112	184, 192	123, 127

ตารางที่ 3 แสดงค่า PIC จำนวนอัลลีล ขนาดของชั้นดีเอ็นเอและความถี่ของแต่ละอัลลีล ของแต่ละไพรเมอร์ ที่ตรวจสอบกับทุเรียน 40 สายพันธุ์

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชั้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
mDzDOA16	0.62	1	121	39.39
		2	132	45.45
		3	145	15.15
mDzDOA52	0.73	1	88	1.41
		2	95	1.41
		3	98	21.13
		4	101	1.41
		5	107	4.23
		6	111	12.68
		7	114	15.45
		8	116	42.25
mDzDOA61	0.79	1	143	2.82
		2	145	2.82
		3	150	1.41
		4	156	28.17
		5	158	26.76
		6	166	9.86
		7	170	7.04
		8	174	21.13
mDzDOA141	0.69	1	203	3.28
		2	227	40.21
		3	235	32.99
		4	243	17.53
mDzDOA154	0.72	1	100	29.63
		2	104	24.07
		3	108	12.04
		4	112	34.26

ชื่อไพรมเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันตีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
mDzDOA164	0.59	1	93	1.27
		2	98	51.90
		3	104	35.44
		4	106	11.39
mDzDOA172	0.66	1	86	11.76
		2	90	45.10
		3	94	8.82
		4	98	34.31
mDzDOA145	0.67	1	141	25.00
		2	152	40.00
		3	157	33.33
		4	159	1.67
mDzDOA165	0.51	1	150	25.00
		2	154	64.58
		3	162	8.33
		4	166	2.08
mDzDOA173	0.61	1	105	36.67
		2	109	48.33
		3	117	15.00
mDzDOA148	0.05	1	228	97.50
		2	236	2.50
mDzDOA160	0.51	1	239	1.49
		2	256	49.25
		3	264	49.25
mDzDOA162	0.67	1	187	39.29
		2	191	11.90
		3	207	10.71
		4	219	38.10
mDzDOA 170	0.47	1	107	61.29
		2	120	38.71
mDzDOA177	0.50	1	103	54.69
		2	112	45.31
mDzDOA153	0.60	1	184	51.47
		2	188	11.76
		3	192	35.29
		4	196	1.47
mDzDOA179	0.59	1	115	1.54

ชื่อไพรมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันตีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		2	119	9.23
		3	123	40.00
		4	127	49.23

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ในทุเรียนด้วยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (NGS) ได้ลำดับเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถออกแบบไพรมอร์ได้ 11,156 คู่ไพรมอร์ และจากไพรมอร์จำนวน 100 คู่ ที่ได้ถูกคัดเลือกไปทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 98 คู่ไพรมอร์ และได้นำไปทดสอบหาไพรมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุเรียน 8 พันธุ์ พบว่ามีไพรมอร์ จำนวน 68 คู่ไพรมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน จากนั้นได้คัดเลือกไพรมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน จำนวน 17 คู่ ไปติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM VIC NED และ PET พบว่าไพรมอร์ทั้ง 17 คู่ ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างกันในทุเรียน 40 พันธุ์ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาได้จากการทดลองนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และใช้เป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ทุเรียน ซึ่งได้ข้อมูลในระดับเบื้องต้นเท่านั้น

อย่างไรก็ตามเป้าหมายงานวิจัยนี้จะต้องจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียนทุกพันธุ์ที่เก็บรวบรวมไว้ตามแหล่งต่าง ๆ และเพิ่มจำนวนไพรมอร์ที่ต้องทดสอบเพื่อให้ได้ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถแยกพันธุ์ทุเรียนได้ทุกพันธุ์ แต่เนื่องจากการทดลองนี้อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยที่ไม่ได้สนับสนุนให้ดำเนินการต่อในปี 2561 จึงต้องยุติงานวิจัย

การทดลองที่ 2

การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

Sex Detection of Date Palm Using Molecular Markers

อรุโณทัย ชาววา นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ จารุฉัตร เขนยทิพย์ ประสาน สืบสุข

คำสำคัญ อินทผลัม (Date palm), Sex detection, Molecular markers

บทคัดย่อ

อินทผลัมเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ต้นที่เพาะจากเมล็ดต้องรอให้ออกดอก 3-7 ปี ถึงจะทราบเพศทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา การทดลองนี้จึงได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จากการทดสอบไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยแสดงแถบดีเอ็นเอเฉพาะในต้นตัวผู้มีขนาด 450 เบส การทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้ว จำนวน 169 ต้น พบผลการตรวจเพศไม่ตรงตามเพศจำนวน 8 ต้น คิดเป็นร้อยละ 4.7 มีความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลคิดเป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากการตีลูกเหล็ก พบมีความบริสุทธิ์เทียบเท่ากับการสกัดด้วยวิธี CTAB แต่รวดเร็วกว่า สำหรับการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM) โดยใช้ไพรเมอร์ DpHRM พบว่าสามารถแยกเพศเมียออกจากเพศผู้ได้ และตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการตรวจเพศอินทผลัมในระดับต้นกล้า

Abstract

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is an economic importance fruit. The sex of plants became known only at the time of first flowering that takes around 3-7 years after seeding, which it wastes cost and time for crop management. This research aims to study and development of the techniques for sex detection in the seedling stage. The results showed DpDOAF and DpDOAR primers could identify the sex by PCR technique. The PCR fragments were generated with the length approximately 450 bp specific to male tree. For validation of DNA marker, the primers were used to amplify the DNA of 169 trees that are known the sex. The

results of amplifications were shown 8 trees that inconsistent to the marker. It is 4.7 percentages of all samples. Therefore, the accuracy of these primers is 95.3 percentages. In part of DNA extraction by homogenizing with the steel ball method was indicated the purity equivalent to CTAB method and faster. Moreover, the sex of date palm could identify by HRM technique using DpHRM primers, which can be used for high throughput scanning. It is an alternative method to sex detection in a phase of seedlings.

คำนำ

อินทผลัม (Date palm) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Phoenix dactylifera* L. มีจำนวนโครโมโซม $2n=2x=36$ อยู่ในตระกูล Arecaceae ตระกูลเดียวกับปาล์ม มีถิ่นกำเนิดในแถบตะวันออกกลาง เป็นพืชที่มีความสำคัญทางสังคมและเศรษฐกิจในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันตกและอัฟริกา ใช้เป็นผลไม้หรือพืชอาหาร มีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเกษตรในพื้นที่แห้งแล้งทั่วโลก เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนและแห้งแล้งแบบทะเลทราย (Wellmann *et al.*, 2007) มีการเพาะปลูกมาแล้วกว่า 7000 ปี ลำต้นมีความสูงประมาณ 30 เมตร มีขนาดลำต้นประมาณ 30-50 เซนติเมตร มีใบติดอยู่บนต้นประมาณ 40-60 ก้าน ทางใบยาว 3-4 เมตร (Wrigley, 1995) เริ่มให้ผลผลิตได้เมื่อต้นมีอายุ 4-7 ปีขึ้นไป ต้นลักษณะเป็นต้นเดี่ยวและแตกหน่อทางด้านข้าง มีก้านใบห่อหุ้มต้น ลักษณะใบเป็นแบบขนนก ทางใบชี้ตรงขึ้นไป โคนโค้งลง ปลายใบแหลมคม ใบสีเขียวอ่อน ใต้ใบสีเทา ใบย่อยพุ่งออกหลายทิศทาง ก้านทางใบมีหนามแหลมยาวและแข็งมาก ช่อดอกออกเป็นจั่นทางโคนใบ ไม่สมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้และตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น ตัวผู้กลีบดอกเป็นแฉกๆ สีขาวคล้ายหางกระรอก ดอกตัวเมียเป็นช่อเมื่อดกกลมๆ สีเขียวอ่อน ผลมีลักษณะเป็นช่อผล มีหลายลักษณะทั้งรูปทรงกลม กลมรี และเรียวยาว ผลยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร สีผลมีหลายสีทั้งเหลือง น้ำตาล ส้ม แดง ไปจนถึงดำขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ผลสุกมีสีเหลืองจนถึงสีส้มและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้มเมื่อแก่จัด ผลสดมีรสหวาน ติดฝาดเล็กน้อย ผลสุกมักจะนำไปตากแห้ง สามารถเก็บไว้เป็นเวลาหลายปี มีรสชาติหวานฉ่ำ (จารุฉัตร, 2558) ผลผลิตอินทผลัมทั่วโลกในปี 2560 มีจำนวน 8,619,588 ตัน ปลูกมากที่สุดในประเทศอียิปต์ให้ผลผลิตถึง 1,694,813 ตัน รองลงมาได้แก่ อิหร่าน แอลจีเรีย ซาอุดีอาระเบีย ให้ผลผลิตอยู่ที่ 1,065,704 1,029,596 และ 964,536 ตัน ตามลำดับ (FAO, 2017)

การขยายพันธุ์อินทผลัมทำได้ 3 วิธี คือ เพาะจากเมล็ด แยกหน่อจากต้นแม่ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์จากการเพาะเมล็ดมีข้อดี คือ ขยายพันธุ์ปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว มีต้นทุนต่ำกว่าวิธีอื่น แต่มีโอกาสที่จะเป็นต้นตัวผู้และต้นตัวเมียอย่างละครึ่ง ไม่สามารถทราบเพศในระยะต้นกล้าได้ ต้องรอนกว่าจะออกดอกจึงจะทราบเพศ สำหรับต้นตัวเมียที่เกิดจากการผสมข้ามทำให้คุณภาพไม่เหมือนกับต้นแม่ ดังนั้นเมล็ดที่ได้จึงเป็นพันธุ์ลูกผสมไม่ใช่พันธุ์แท้ มีข้อดีคือทำให้ได้

พันธุ์ใหม่ขึ้นมา เหมาะสำหรับผู้สนใจปลูกแต่มีเงินลงทุนไม่มาก สามารถเก็บเมล็ดที่ซื้อมาจากตลาดทั่วไปทั้งแบบกินผลสดและผลแห้งนำไปเพาะเป็นต้นกล้าได้ วิธีที่สองคือการขยายพันธุ์โดยแยกหน่อ วิธีนี้เป็นการขยายพันธุ์ที่ได้พันธุ์แท้ มีคุณสมบัติเหมือนต้นพ่อแม่ทุกประการ แต่ต้นพันธุ์สามารถให้หน่อตลอดอายุได้เพียงเฉลี่ยประมาณ 20 หน่อ จึงไม่สามารถขยายพันธุ์ในปริมาณมากๆ อย่างรวดเร็วได้ และราคาหน่อพันธุ์มีราคาสูงกว่าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิธีการนี้จะมีการลงทุนสูงที่สุด วิธีการสุดท้ายคือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะได้ต้นที่มีคุณสมบัติเหมือนต้นแม่พันธุ์ทุกประการ ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพสูงและสม่ำเสมอ สามารถขยายพันธุ์ได้ปริมาณมากและรวดเร็วเหมาะสำหรับการปลูกในเชิงพาณิชย์ แต่ต้องใช้งบลงทุนมากกว่าการปลูกด้วยเมล็ด ปัจจุบันการปลูกในเชิงพาณิชย์ของต่างประเทศนิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถบริหารจัดการแปลงปลูกได้ดีกว่าผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอและให้ผลผลิตได้เร็ว สามารถปลูกได้ปริมาณมากตามต้องการ และทุกฤดูกาลให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูงในระยะเวลายาว แต่สำหรับในประเทศไทยยังอยู่ในขั้นตอนวิจัยและพัฒนา ยังไม่สามารถทำการค้าได้ ต้องสั่งจากต่างประเทศเท่านั้น สำหรับอินทผลัมสายพันธุ์ไทยมีชื่อว่า "พันธุ์KL1" ที่ได้เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์แอลเรตนิวของอิสราเอล กับพันธุ์บาไฮของจอร์แดน เป็นผลงานของนายศักดิ์ ลาจวน หรือที่รู้จักกันในนาม "โกหลัก" มีสถานปลูกแห่งแรกอยู่ที่อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นสวนแรกของประเทศไทยที่พัฒนาจนได้อินทผลัมคุณภาพดีส่งออกต่างประเทศ โดยสายพันธุ์นี้ให้ผลผลิตได้ในระยะเวลาเพียง 3 ปี แต่พันธุ์จากต่างประเทศจะใช้เวลาจนถึง 4-7 ปี (วีรพันธุ์, 2556) อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศไทยยังคงใช้ต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดเนื่องจากมีราคาถูก แต่ยังมีประสบปัญหาการทรานส์เพคอยู่ บางสวนอาจใช้วิธีการดูเพศจากเมล็ดด้วยตาเปล่า ซึ่งอาจไม่ถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้นเทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ใช้ในการคัดเลือกเพศของอินทผลัมให้แม่นยำได้ที่สุด

การแยกเพศอินทผลัมในการคัดเลือกหรือแยกตัวผู้ออกจากตัวเมีย ได้มีการศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเริ่มจากการวิเคราะห์และศึกษาความหลากหลายของพันธุ์อินทผลัมด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น amplified fragment length polymorphisms (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), inter simple sequence repeat (ISSR), simple sequence repeat (SSR) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคแต่ละเทคนิคมีข้อจำกัดเกี่ยวกับค่าใช้จ่ายที่แตกต่างกัน ระดับของแถบดีเอ็นเอต่าง (polymorphism) ที่ได้ หรือแม้แต่ลักษณะของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นแบบ dominance หรือ co-dominance สำหรับอินทผลัมแล้วเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นแบบ co-dominance เช่น เทคนิค SSR เป็นเทคนิคที่สามารถเติมเต็มความต้องการในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการทำ phylogeny มากที่สุด (Khanam *et al.*, 2012) ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลแบบ dominance เช่น ISSR และ RAPD พบว่าเทคนิค ISSR จะให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอต่างมากกว่าเทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอต่าง 95.67 และ 92.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Marsafari and Mehrabi, 2013) สำหรับการแยกเพศอินทผลัมนั้นต้องการเครื่องหมายโมเลกุลแบบ co-dominance เพราะเพศอินทผลัมเป็นแบบเฮเทอโรไซกัส

(heterozygous) ดังนั้นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้จึงได้แก่เทคนิค RFLP และ SSR มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลแบบไมโครแซทเทลไลท์ในการจำแนกเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับเพศอินทผลัมจากต้นตัวผู้ 52 ต้น และต้นตัวเมีย 55 ต้น พบว่ามี 3 ยีนที่แสดงลักษณะแบบเฮเทอโรไซกัสที่สัมพันธ์กับโครโมโซม Y หรือต้นตัวผู้แยกออกมาอย่างชัดเจน สามารถแยกเพศได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Cherif *et al.*, 2012) และมีการทดสอบไพรเมอร์แบบไมโครแซทเทลไลท์ 14 คู่สาย กับอินทผลัม 129 ตัวอย่างจาก 34 สายพันธุ์ พบว่า สามารถแยกต้นตัวผู้ออกจากต้นตัวเมียได้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอแบบเฮเทอโรไซกัสขนาด 160/190 เบส เมื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ mPdCIR048 (Elmeer and Mattat, 2012) นอกจากนี้การใช้เทคนิค RFLP ในการหาความแตกต่างของเพศอินทผลัม พบว่า ให้ความรวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการแยกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Al-Mahmoud *et al.*, 2012) ดังนั้นเพื่อพัฒนาการตรวจเพศให้เหมาะสมกับพันธุ์อินทผลัมในประเทศไทย การทดลองนี้จึงได้ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกเพศอินทผลัมและพัฒนาวิธีการตรวจให้เหมาะสมและรวดเร็วยิ่งขึ้น

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล โดยนำพันธุ์อินทผลัมที่รวบรวมไว้ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ซึ่งได้คัดแยกต้นตัวผู้และตัวเมียเรียบร้อยแล้ว มาศึกษาหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างต้นตัวผู้และตัวเมียแล้วนำไปพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศของอินทผลัม

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2558 - กันยายน 2560

วิธีดำเนินการ

1. การทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจเพศอินทผลัม

1.1 การสกัดดีเอ็นเอของใบอินทผลัม

นำใบอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอรุณทัย และคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% (W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ซังใบอินทผลัม 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5

มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้ว ละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

1.3 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ (UV Transilluminators, BIORAD) และทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัม

2.1 การตรวจสอบเพศอินทผลัมโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็กแล้วเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการตัดใบอินทผลัมด้วยใบมีดผ่าตัดให้ได้ตัวอย่างละ 1x1 เซนติเมตร ลงในหลอด 2 มิลลิลิตร ที่มีลูกเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 2 ลูก เติมน้ำยา Sol^{II} 1

ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วตีด้วยเครื่อง Precellys Evolution ยี่ห้อ Bertin technologies ที่ความเร็ว 4,500 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที แล้วนำมาเติมด้วยน้ำยา Sol¹ 2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติม Sol¹ 3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ 500 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพพานอลที่แช่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จำนวน 2 รอบ ปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี Electrophoresis บนเจลอะกาโรส (Agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยตัวชูดถ่ายภาพ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder)

2.2 การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีดีเรกท์พีซีอาร์

- การตรวจสอบเพศอินทผลัมโดยการบดใบในสารละลายแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

บดใบอินทผลัมขนาด 5x5 มิลลิเมตร ในสารละลาย Dilution buffer ของ Phire Plant Direct PCR Kit จากบริษัท Thermo scientific ปริมาตรตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วย Phire Plant Direct PCR Kit (2x Phire Plant PCR buffer, 10 uM primer, Phire Hot Start II DNA polymerase) โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 1 แล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ)

ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจด้วยวิธี Electrophoresis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยตัวชูดถ่ายภาพ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

- การตรวจสอบเพศอินทผลัมจากใบด้วยวิธีดีเรกท์พีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนไบอินทพลัมขนาด 1x1 มิลลิเมตร ในน้ำยาที่เตรียมทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วย Phire Plant Direct PCR Kit จาก Thermo scientific (2x Phire Plant PCR buffer, 10 uM primer, Phire Hot Start II DNA polymerase) โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 1 แล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ)

ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

แล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจด้วยวิธี Electrophoresis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยด้วยชุดถ่ายภาพ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.3 การตรวจสอบเพศด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM)

นำดีเอ็นเอของอินทพลัมเพศผู้และเพศเมียมาทดสอบปฏิกิริยา HRM ด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR โดยเตรียมน้ำยาการทำปฏิกิริยา ดังนี้ เติม Meltdoctor™ HRM master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร น้ำ Deionized ปริมาตร 6.6 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (QuantStudio5) โดยตั้งโปรแกรม HRM ดังนี้

สถานะ	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	Ramp rate
Holding	Enzyme activation	95 °C	10 นาที	100%
Cycling (40 cycles)	Denature	95 °C	15 วินาที	100%
	Anneal/extend	60 °C	1 นาที	100%
Melt Curve	Denature	95 °C	15 วินาที	100%
	Anneal	60 °C	1 นาที	100%
	High resolution melting	95 °C	15 วินาที	1%
	Anneal	60 °C	15 วินาที	100%

เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงแล้วนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1 ของ Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม

PDK_30s944511

นำดีเอ็นเออินทผลัมที่ทราบเพศแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับยีน MAD ด้วยไพรเมอร์ DPshellF และ DPshellR สำหรับชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ด้วยไพรเมอร์ PDK30sF และ PDK30sR โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Primer name	Primer Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Description	References
DpDOAF	TGCATACTAGTTGTATTGCGGCAATA	54.8	ใช้แยกเพศอินทผลัม	-
DpDOAR	CATACTTGGTGACGGATCTCTAA	55.7	ใช้แยกเพศอินทผลัม	-
PDK30sF	ACTTCTGCTACCTCTACTTGCATGT	56.0	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิง และใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	-
PDK30sR	CAAACCACCTCACAACAAGAAGGAA	56.0	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิง และใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	-
PH01F	GCATTAGCACCATAGTAAATTGT	49.9	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิง	นพรัตน์ และคณะ (2558)
PH01R	GTCCCAATCAGAGTGCACTCAA	54.8	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิง	นพรัตน์ และคณะ (2558)
PH02F	GCAATAGCACCATAGTAAATTGCCT	54.4	ใช้แยกเพศอินทผลัม	นพรัตน์ และคณะ (2558)
PH03R	CTAACTTGGTGACGGATCTCA	54.8	ใช้แยกเพศอินทผลัม	นพรัตน์ และคณะ (2558)

mPdCIR048F	CGAGACCTACCTTCAACAAA	49.7	ใช้แยกเพศอินทผลัมแบบเทคนิค SSR	Billotte และคณะ (2004)
mPdCIR048R	CCACCAACCAAATCAAACAC	49.7	ใช้แยกเพศอินทผลัมแบบเทคนิค SSR	Billotte และคณะ (2004)
Ubi_F	AAGGAGTGCCCCAACGCCGAGTG	62.2	ใช้เป็นยีนอ้างอิง	Yu และคณะ (2008)
Ubi_R	GCCTTCTGGTTGTAGACGTAGGTGAG	61.1	ใช้เป็นยีนอ้างอิง	Yu และคณะ (2008)
DPshellF	GTGAAGGTTTAGGTCATGTTGGTC	55.7	ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	หทัยรัตน์ และคณะ (2560)
DPshellR	TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC	56.0	ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	หทัยรัตน์ และคณะ (2560)
DpHRMF	ACTTCTGCTACCTCTACTTGATGT	56.0	ใช้วิเคราะห์ HRM	-
DpHRMR	GCTTGGGGTTGAGGTGATAA	51.8	ใช้วิเคราะห์ HRM	-

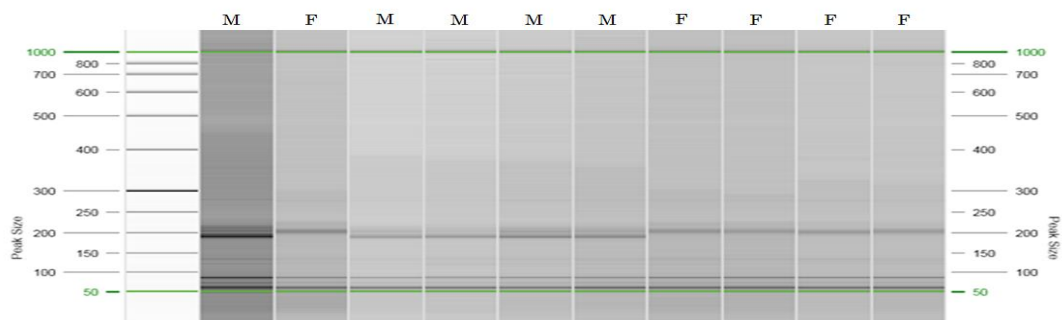
ผลการทดลองและอภิปราย

1. การทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจเพศอินทผลัม

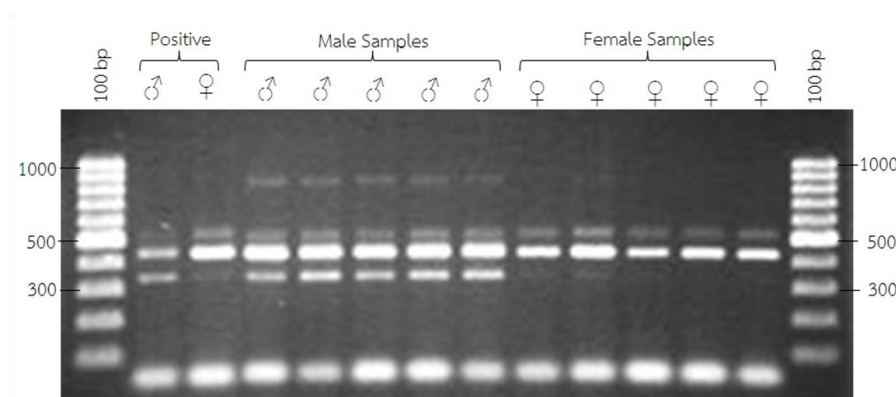
การทดสอบไพรเมอร์ตามที่ยังรายงานไว้ จำนวนทั้งสิ้น 39 คู่ กับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้ว และปลูกจากเมล็ดในประเทศไทย ซึ่งเป็นพันธุ์ KL1 หรือพันธุ์แม่ใจ 36 หรือเป็นลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ดังกล่าว จากการทดสอบ พบว่า ไพรเมอร์ SSR จากรายงานของ Billotte และคณะ (2004) จำนวน 16 คู่ Elmeer และ Mattat (2012) จำนวน 14 คู่ ไพรเมอร์ และ Cherif และคณะ (2013) จำนวน 1 คู่ รวมถึงไพรเมอร์ RAPD และ SCAR ของ Dhawan และคณะ (2013) จำนวน 2 คู่ ไม่สามารถแยกเพศตัวอย่างอินทผลัมได้เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งสอดคล้องกับนพรัตน์ และคณะ (2558) ที่รายงานว่าไพรเมอร์ RAPD และ SCAR ของ Dhawan และคณะ (2013) ไม่สามารถแยกเพศอินทผลัมสายพันธุ์ไทย (แม่ใจ 36) ได้ แต่ไพรเมอร์ mPdCIR04 ตามรายงานของ Elmeer และ Mattat (2012) สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System (ภาพที่ 1) ส่วนรายงานของนพรัตน์ และคณะ (2558) ใช้ไพรเมอร์แบบเฉพาะเจาะจงกับต้นอินทผลัมเพศผู้ ร่วมกับไพรเมอร์ของจีนส่วนดีเอ็นเออ้างอิงที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง เมื่อทำการเพิ่มปริมาณโดยการทำพีซีอาร์แบบรวม (multiplex PCR) จะได้ดีเอ็นเอสองแถบในต้นตัวผู้ และได้เพียงหนึ่งแถบในต้นตัวเมีย (ภาพที่ 2) และรายงานของ Al-Mahmoud และคณะ (2012) ใช้เทคนิค PCR-RFLP จำนวน 5 คู่ไพรเมอร์ เนื่องจากการตรวจสอบเพศโดยวิธีนี้มีความยุ่งยากหลายขั้นตอน ต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์หลังจากการได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ การทดลองนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะกับตำแหน่ง SNPs ที่สัมพันธ์กับเพศ

ขึ้นมาใหม่ พบว่า สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ คือ ไพรมเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR จะได้แถบดีเอ็นเอประมาณ 450 เบส เมื่อทำพีซีอาร์แบบรวมร่วมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนอ้างอิง ผลที่ได้จะมองเห็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสองแถบในเพศผู้และหนึ่งแถบในเพศเมีย สามารถใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิงที่ใช้ไพรมเมอร์ PDK30sF และ PDK30sR ให้ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 700 เบส (ภาพที่ 3) หรือยีนอ้างอิงได้แก่ไพรมเมอร์ Ubi_F และ Ubi_R ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 200 เบส (ภาพที่ 4) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับไพรมเมอร์ของนพรัตน์ และคณะ (2558) เช่นกัน

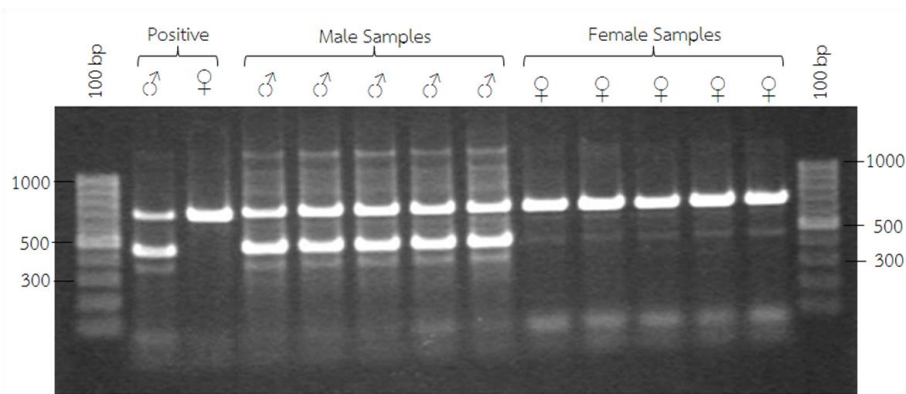
จากการทดสอบไพรมเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ จึงถูกนำมาตรวจสอบความแม่นยำกับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วจำนวน 169 ต้น โดยทำการตรวจสอบพร้อมกันกับไพรมเมอร์ของนพรัตน์ และคณะ (2558) พบว่า ผลการตรวจด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไม่ตรงกับเพศจำนวน 8 ต้น คิดเป็นร้อยละ 4.7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากไพรมเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR มีความแม่นยำตรงตามเพศคิดเป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์ ของการตรวจเพศอินทผลัมทั้งหมด (ตารางภาคผนวกที่ 1)



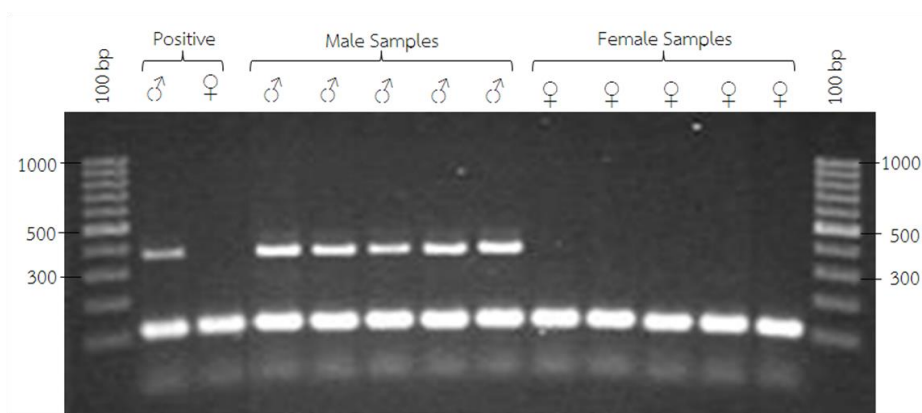
ภาพที่ 1 การทดสอบไพรมเมอร์ mPdCIR04 ตามรายงานของ Elmeer และ Mattat (2012)



ภาพที่ 2 การทดสอบไพรมเมอร์ PH01F PH01R PH02F และ PH03R โดยการทำให้พีซีอาร์แบบรวม ตามรายงานของนพรัตน์ และคณะ (2558)



ภาพที่ 3 การทดสอบไพรเมอร์ DpDOAF DpDOAR PDK30sF และ PDK30sR โดยการทำให้ซีอาร์แบบรวม



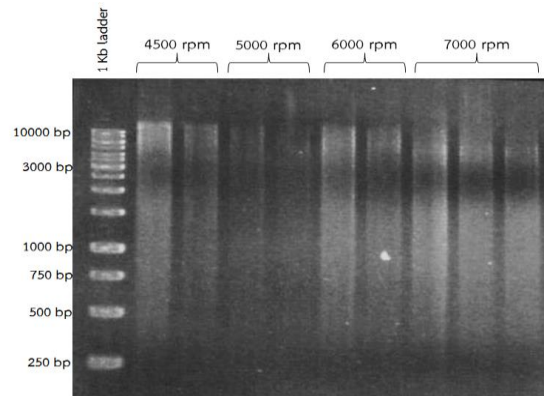
ภาพที่ 4 การทดสอบไพรเมอร์ DpDOAF DpDOAR Ubi_F และ Ubi_R โดยการทำให้ซีอาร์แบบรวม

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัม

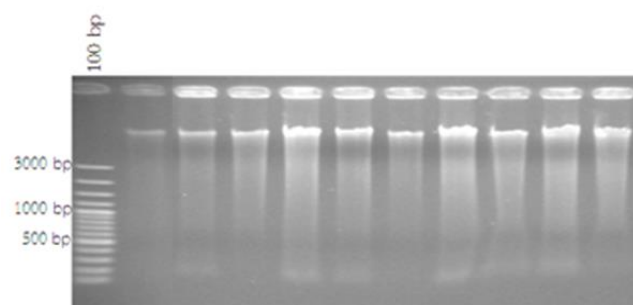
2.1 การตรวจสอบเพศอินทผลัมโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยลูกเหล็กแล้วเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมด้วยการตีลูกเหล็กที่ความเร็ว 4,500 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที พบว่า การตีที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เหมาะสมกับใบอินทผลัมที่สุด ส่วนความเร็วที่ 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที พบดีเอ็นเอมีการฉีกขาดมากขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 5) การเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีตีลูกเหล็กกับวิธี CTAB พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีตีลูกเหล็กมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 317.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.868 และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB มีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 2408 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.886 (ตารางที่ 2) จะเห็นว่าปริมาณดีเอ็นเอจากวิธี CTAB มีมากกว่าวิธีการตีด้วยลูกเหล็ก แต่มีความบริสุทธิ์ไม่แตกต่างกัน เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์จะเห็นว่า การสกัดด้วยวิธี CTAB (ภาพที่ 6) มีการฉีกขาดของดีเอ็นเอน้อยกว่าวิธีการตีลูกเหล็ก (ภาพที่ 7) แต่ยังคงได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

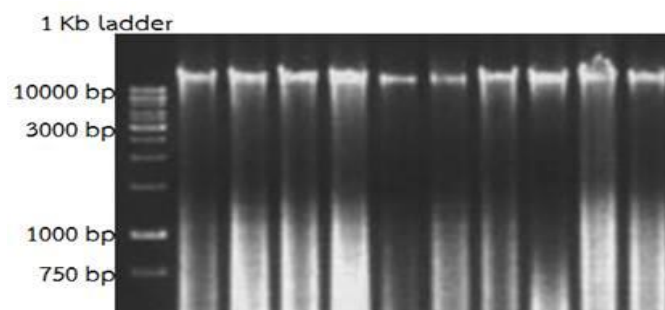
ปริมาณมาก ทั้งนี้การตรวจสอบเพศอินทผลัมใช้ดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณเพียงแค่ 50 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ซึ่งเพียงพอต่อการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการสกัดที่สั้น และได้จำนวนตัวอย่างต่อวันมากกว่า ดังนั้นวิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็กจึงเหมาะสมต่อการตรวจเพศอินทผลัมมากกว่าการสกัดด้วยวิธี CTAB



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอด้วยลูกเหล็กที่ความเร็วรอบ 4,500 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 ดีเอ็นเออินทผลัมที่สกัดด้วยวิธี CTAB ตัดแปลงจาก อรุโณทัย และคณะ (2552) บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์



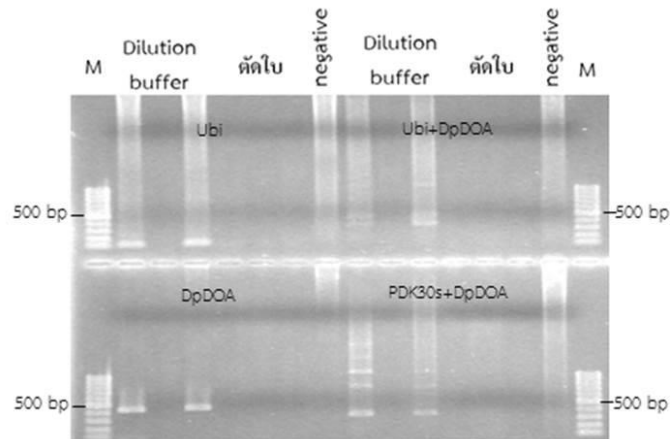
ภาพที่ 7 ดีเอ็นเออินทผลัมที่สกัดด้วยสกัดด้วยการตีลูกเหล็ก บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมที่สกัดด้วยวิธีทีลูกเหล็กและวิธี CTAB

No.	การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีทีลูกเหล็ก		การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB	
	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	ความบริสุทธิ์ (A260/A280)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	ความบริสุทธิ์ (A260/A280)
1	200	1.814	1187	1.921
2	451	2.014	1578	1.866
3	218	1.775	1783	1.822
4	478	1.817	2241	1.978
5	336	1.914	3132	1.926
6	103	1.794	1933	1.811
7	386	1.934	2806	1.886
8	285	1.883	2779	1.964
9	367	1.947	3420	1.881
10	353	1.786	3221	1.803
ค่าเฉลี่ย	317.7	1.868	2408	1.886

2.2 การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีไดเรกต์พีซีอาร์

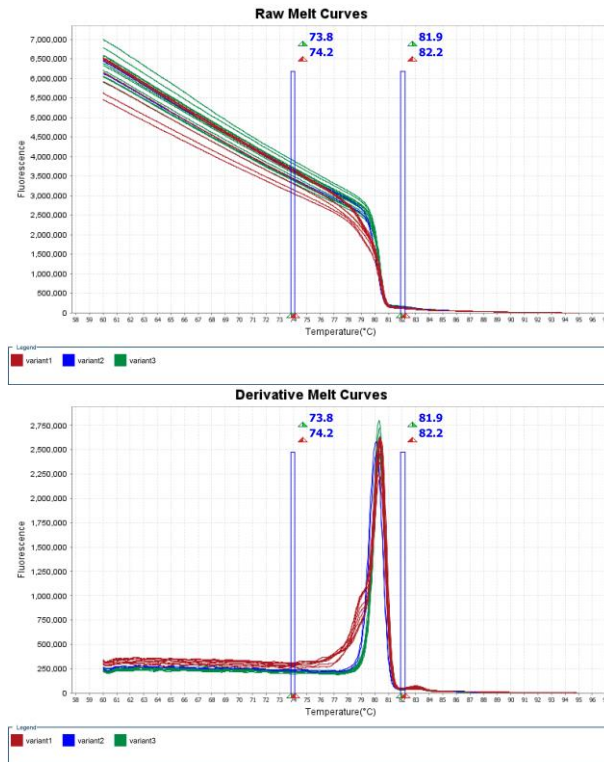
การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีไดเรกต์พีซีอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงจากใบอินทผลัมโดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอ เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจเพศ จากการבודตัวอย่างใบอินทผลัมกับ dilution buffer ของ Phire Plant Direct PCR Kit และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบขนาด 1x1 มิลลิเมตร พบว่า การตัดตัวอย่างใบอินทผลัมมาทำไดเรกต์พีซีอาร์ ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ สำหรับการבודตัวอย่างด้วย dilution buffer สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แบบไพรเมอร์คู่เดียว คือ ไพรเมอร์ Ubi หรือ DpDOA แต่ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบรวมไพรเมอร์ได้ (ภาพที่ 8) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุด Phire Plant Direct PCR Kit นั้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเรกต์พีซีอาร์ แต่ยังไม่เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์แบบรวมได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีการพัฒนาเอ็นไซม์อีกหลายยี่ห้อสำหรับการเพิ่มปริมาณไดเรกต์พีซีอาร์แบบรวม (multiplex direct PCR) ซึ่งอาจต้องทำการทดลองในส่วนของชนิดเอ็นไซม์ต่อไป



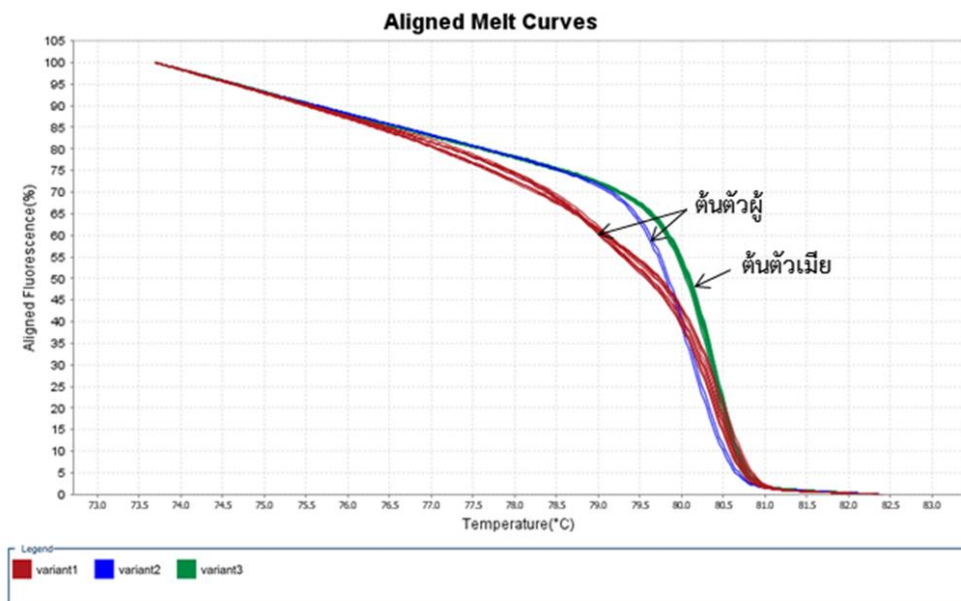
ภาพที่ 8 การเพิ่มการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการไคเรกพีซีอาร์ (Direct PCR)

2.3 การตรวจสอบเพศด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM)

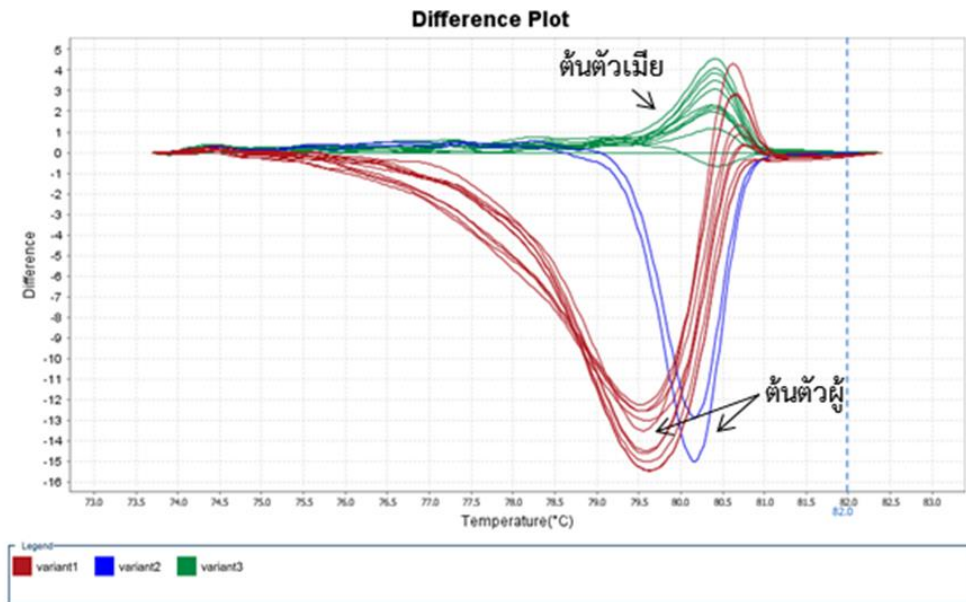
เทคนิค High Resolution Melting (HRM) เป็นวิธีการตรวจสอบอุณหภูมิในขณะที่มีการแยกสายกันของดีเอ็นเอสายคู่ (double strand DNA) เมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันก็จะได้ค่าอุณหภูมิที่ต่างกันด้วย ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบการกลายของลำดับสารพันธุกรรมได้ และนิยมใช้ตรวจสอบตัวอย่างที่มีจำนวนมากแบบ High Throughput (Lehmensick et al., 2008) จากการตรวจสอบเพศอินทผลัมจากตัวอย่างต้นตัวผู้และต้นตัวเมียอย่างละ 12 ต้น ผลที่ได้จากเครื่อง real-time PCR จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1 พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR มีค่าการหลอมละลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ในช่วง 74.2-82.2 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบเส้นกราฟ Aligned Melt Curves จะเห็นว่าต้นตัวผู้แสดงเส้นกราฟสองเส้น แต่ต้นตัวเมียสามารถแยกออกจากต้นตัวผู้ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10) เมื่อโปรแกรมคำนวณเส้นกราฟ Difference Plot พบว่า ต้นอินทผลัมตัวผู้มีความผิดปกติที่แตกต่างกับต้นตัวเมียอย่างชัดเจนเช่นกัน (ภาพที่ 11) เมื่อทำการวิเคราะห์ค่า variant พบว่า ไพรเมอร์ DpHRM สามารถแบ่งกลุ่ม variant ได้ 3 variant ต้นตัวผู้จะถูกแยกออกเป็น 2 variant โดยค่าอุณหภูมิกลุ่ม variant ที่ 1 อยู่ที่ 79.7-79.8 องศาเซลเซียส variant ที่ 2 มีค่า 80.2 องศาเซลเซียส มีค่า Difference อยู่ระหว่าง -12.1 ถึง -14.6 และ -12.5 ถึง -14.6 ตามลำดับ ส่วนต้นตัวเมียจะถูกแยกเป็น variant ที่ 3 ซึ่งแยกออกจากกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน โดยมีอุณหภูมิอยู่ที่ 80.5-80.6 องศาเซลเซียส และมีค่า Difference อยู่ระหว่าง -0.6 ถึง 4.2 (ตารางที่ 3) จะเห็นได้ว่าเทคนิค HRM สามารถแยกเพศอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมียออกจากกันได้อย่างชัดเจน ถึงแม้ว่าต้นตัวผู้จะแบ่งออกเป็น 2 variant ก็ตาม ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบเพศอินทผลัมที่มีจำนวนตัวอย่างมากได้โดยไม่ต้องเสียเวลาในการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบลงได้



ภาพที่ 9 แผนภาพ Raw Melt Curves และ Derivative Melt Curves ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1



ภาพที่ 10 แผนภาพ Aligned Melt Curves ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1



ภาพที่ 11 แผนภาพ Difference Plot ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ค่า Variant ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของอินทผลัมเพศผู้และเพศเมียด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1

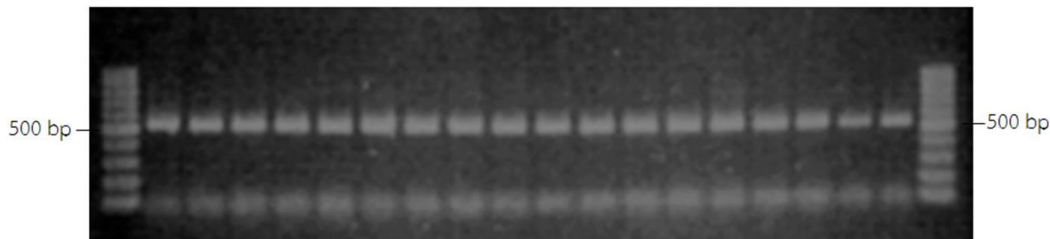
Variant	Sample No.	Sex	Temperature	Difference
1	1	Male	79.7	-13.0
1	2	Male	79.8	-14.8
1	3	Male	79.7	-14.3
1	4	Male	79.7	-14.3

1	5	Male	79.7	-12.1
1	6	Male	79.7	-15.3
1	8	Male	79.8	-12.3
1	9	Male	79.8	-15.2
1	10	Male	79.7	-12.7
2	11	Male	80.2	-12.5
2	12	Male	80.2	-14.6
3	1	Female	80.6	1.8
3	2	Female	80.6	2.7
3	3	Female	80.5	3.2
3	4	Female	80.5	-0.6
3	5	Female	80.6	1.0
3	6	Female	80.5	4.2
3	7	Female	80.5	3.8
3	8	Female	80.9	0.0
3	9	Female	80.5	1.8
3	10	Female	80.5	2.1
3	11	Female	80.6	3.4
3	12	Female	80.5	2.0

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม

PDK_30s944511

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ในอินทผลัมจากตัวอย่างต้นตัวผู้ 10 ตัวอย่าง และต้นตัวเมีย 10 ตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและข้อมูลเครื่องหมาย SNPs ที่สัมพันธ์กับต้นตัวผู้หรือต้นตัวเมีย พบว่า จากตัวอย่างยีน MAD ขนาดประมาณ 540 เบส (ภาพที่ 12) เมื่อนำไปวิเคราะห์



ภาพที่ 12 ภาพชิ้นส่วนยีน MAD ของอินทผลัม ขนาดประมาณ 540 เบส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

DPMALE2	CATTTATGTTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPMALE4	CATTTATGTTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE2	CATTTATGTTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE5	GATTTATATTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE6	GATTTATATTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPMALE3	GATTTATGTTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE7	CATTTATGTTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE1	CATTTATGTTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPMALE1	CATTTATGTTTTAGAAAACCTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG

DPMALE2	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPMALE4	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE2	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE5	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE6	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPMALE3	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE7	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE1	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPMALE1	CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA

DPMALE2	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPMALE4	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPFEMALE2	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPFEMALE5	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPFEMALE6	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPMALE3	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPFEMALE7	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPFEMALE1	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT
DPMALE1	ACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCT

DPMALE2	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPMALE4	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE2	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE5	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE6	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPMALE3	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE7	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE1	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPMALE1	ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC

DPMALE2	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPMALE4	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPFEMALE2	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPFEMALE5	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPFEMALE6	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPMALE3	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPFEMALE7	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPFEMALE1	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT
DPMALE1	GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTTCCCTAATT

```

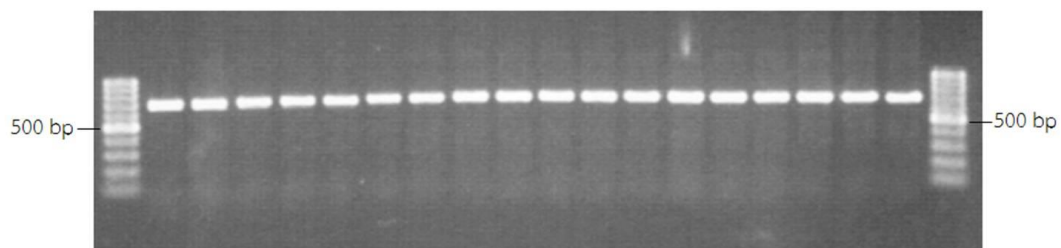
*****
DPMALE2      TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
ELAM4        TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE2    TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE5    TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE6    TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPMALE3      TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE7    TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE1    TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPMALE1      TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
*****

DPMALE2      CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPMALE4      CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE2    CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE5    CTTTTTAAGTTTCTAGCTTGTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE6    CTTTTTAAGTTTCTAGCTTGTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPMALE3      CTTTTTAAGTTTCTAGCTTGTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE7    CTTTTTAAGTTTCTAGCTTGTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE1    CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPMALE1      CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
*****

```

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MAD* ในอินทผลัมต้นตัวผู้และตัวเมีย โดยวิธีการ *Multiple Sequence Alignment* ด้วยเว็บไซต์ *Clustal Omega*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพภาคผนวก 1 และ 2) ด้วยเว็บไซต์ *Clustal Omega* ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่สัมพันธ์กับอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย (ภาพที่ 13) สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซมของอินทผลัม โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนโครโมโซม *PKD_30s944511* ของอินทผลัมเพศผู้และเพศเมียขนาดประมาณ 700 เบส (ภาพที่ 14) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพภาคผนวก 3 และ 4) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม *VectorNTI* (ภาพที่ 15) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าสนใจจากชิ้นส่วนนี้อยู่หลายตำแหน่งที่อาจสัมพันธ์กับการตรวจเพศอินทผลัม ซึ่งจากการทดสอบไพรเมอร์ *DpHRM* ในการทดลองที่ 2.3 พบว่าสามารถใช้แยกเพศด้วยเทคนิค *HRM* ได้



ภาพที่ 14 ภาพชิ้นส่วนโครโมโซม *PKD_30s944511* ของอินทผลัม ขนาดประมาณ 700 เบส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ในอินทผลั้ม ต้นตัวผู้และตัวเมีย โดยวิธีการ Multiple Sequence Alignment ด้วยโปรแกรม VectorNTI

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทดสอบไพรเมอร์ตามที่รายงานไว้ จำนวนทั้งสิ้น 39 คู่ กับต้นอินทผลั้มที่ทราบเพศแล้ว พบว่า ไพรเมอร์ SSR ของ Billotte และคณะ (2004) Elmeer และ Mattat (2012) และ Cherif และคณะ (2013) รวมถึงไพรเมอร์ RAPD และ SCAR ของ Dhawan และคณะ (2013) ไม่สามารถ แยกเพศอินทผลั้มได้ แต่ไพรเมอร์ mPdCIR04 สามารถแยกเพศอินทผลั้มได้ เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System เมื่อออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะกับตำแหน่ง SNPs ที่สัมพันธ์กับเพศตามรายงานของ Al-Mahmoud และคณะ (2012) สามารถแยกเพศอินทผลั้มได้ คือ ไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นตัวผู้ มีขนาดประมาณ 450 เบส เมื่อทำพีซีอาร์แบบรวมไพรเมอร์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสองแถบในเพศผู้ และหนึ่งแถบในเพศเมีย สำหรับการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับต้นอินทผลั้มที่ทราบเพศแล้วจำนวน 169 ต้น พบว่า ผลการตรวจด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไม่ตรงกับเพศจำนวน 8 ต้น คิดเป็นร้อยละ 4.7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR มีความแม่นยำตรงตามเพศคิดเป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลั้ม พบว่า การตรวจสอบเพศอินทผลั้มโดยการสกัดดีเอ็นเอที่ดีที่สุดด้วยลูกเหล็กที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เหมาะสมกับใบอินทผลั้มที่สุด ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยการตีลูกเหล็กมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 317.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.868 และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB มีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 2408 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.886 ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอจากวิธี CTAB มีมากกว่าวิธีการตีด้วยลูกเหล็ก แต่มีความบริสุทธิ์ไม่แตกต่างกัน การสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็กจึงเพียงพอต่อการตรวจสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ และยังใช้เวลาในการสกัดที่สั้นและได้จำนวน

ตัวอย่างต่อวันมากกว่า ดังนั้นวิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็กจึงเหมาะสมต่อการตรวจเพศอินทผลัมมากกว่าการสกัดด้วยวิธี CTAB สำหรับการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีไดเรกต์พีซีอาร์ พบว่า การตัดตัวอย่างใบอินทผลัมมาทำ direct PCR ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่การบดตัวอย่างด้วย dilution buffer สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แบบไพรมอร์คู่เดียว ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบรวมไพรมอร์คู่ได้ ส่วนการตรวจสอบเพศด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรมอร์คู่ DpHRMF และ DpHRMR มีค่าการหลอมละลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ในช่วง 74.2-82.2 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์ค่า variant สามารถแบ่งกลุ่ม variant ได้ 3 variant ต้นตัวเมียจะถูกแยกเป็น variant ที่ 3 ซึ่งแยกออกจากกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน โดยมีอุณหภูมิอยู่ที่ 80.5-80.6 องศาเซลเซียส และมีค่า Difference อยู่ระหว่าง -0.6 ถึง 4.2 ซึ่งเทคนิค HRM สามารถแยกเพศอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมียออกจากกันได้อย่างชัดเจน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 พบว่า ยีน MAD ขนาดประมาณ 540 เบส ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่สัมพันธ์กับอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัมขนาดประมาณ 700 เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าสนใจจากชิ้นส่วนนี้อยู่หลายตำแหน่งที่อาจสัมพันธ์กับการตรวจเพศอินทผลัม ซึ่งจากการทดสอบไพรมอร์คู่ พบว่า สามารถใช้แยกเพศด้วยเทคนิค HRM ได้

การทดลองที่ 3

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs

DNA fingerprinting of *Dendrobium* Orchids using SSR Markers

บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ อรุณทัตย์ ซาววา สุภาวดี ง้อเหรียญ

คำสำคัญ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ กล้วยไม้สกุลแวนดา กล้วยไม้สกุลหวาย ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ microsatellite markers Vanda orchids *Dendrobium* orchids DNA fingerprinting

บทคัดย่อ

จากการสุ่มนำไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมด จำนวน 70 คู่สาย มาทำ PCR กับตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์สกุลหวาย ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ 3 คู่สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ คือ ไพรเมอร์ Vandbirdo_022 Vandbirdo_026 และ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดแถบแบน จากไพรเมอร์ Vandbirdo_022 ประมาณ 240 คู่เบส เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ 3 ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอกล้วยไม้ 96 สายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR แล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์ Vandbirdo_026 สามารถเพิ่มปริมาณจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ 74 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 280 คู่เบส และไพรเมอร์ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 80 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่เบส แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายได้ จึงได้ปรับใช้เทคนิคอื่นได้แก่การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด จากการรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จากฟาร์มเกษตรกรที่นำพันธุ์พืชมาจดทะเบียนพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กล้วยไม้สกุลหวายพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 30 สายพันธุ์ เพื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดบาร์โค้ด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต่าง ๆ จำนวน 4 ยีน ได้แก่ matK, ITS, trnH-psbA และ rbcL แล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติโดยบริษัทเอกชนและเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ได้ชื่อกล้วยไม้พร้อมทั้งสามารถจัดกลุ่มชนิดของกล้วยไม้หวายได้ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล phylogenetic tree โดยใช้ ClustalWII Phylogeny ผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถจำแนก

ชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ rbcl และmatK ซึ่งจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ต่อไป

คำนำ

เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) หมายถึงดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive DNA) เรียงอยู่ต่อเนื่องกันบนจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยเบสซ้ำตั้งแต่ 1-6 เบส กระจายตัวทั้งจีโนมแต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดความหลากหลาย จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) การทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอ (อรรถัน, 2548) SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) โดยลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียว (unique sequence) ดังนั้นถ้าหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ได้ แล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลท์มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอตำแหน่งที่รวมเอาส่วนไมโครแซทเทลไลท์ไว้ภายใน จึงมีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic) เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน จึงพบพอลิมอร์ฟิซึมค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (สุรินทร์, 2552) การหาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น Restriction fragment length polymorphism (RFLP) , random amplified polymorphic DNA (RAPD) amplified fragment length polymorphism (AFLP) single nucleotide polymorphism (SNP) และ DNA repeat variation analysis ซึ่งรวมถึงไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออยู่ด้วย เครื่องหมายโมเลกุลที่จำแนกได้จากส่วนที่มีความผันแปรเหล่านี้ ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาไฟโลจีนิ อนุกรมวิธาน นิเวศน์วิทยา พันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ (McCouch และคณะ ,1997 ; Duborg และคณะ ,1999 ; Luo และคณะ , 2001 ; Bussell และคณะ , 2005 ; Wang และคณะ , 2006) อ้างอิงโดย Agyeman และคณะ (2008) เครื่องหมายเหล่านี้สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับความผันแปรของอัลลีลและให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจวิวัฒนาการของประชากรสิ่งมีชีวิตตามภูมิศาสตร์และสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ (Zwettler และคณะ , 2002)

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ในการพัฒนาครั้งแรกเพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมนุษย์ มิวส์ประกอบเบสซ้ำ 1-6 เบส กระจายอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต (Tautz และ Renze , 1984 ; Litt และ Luty, 1989) อ้างอิงโดย Agyeman และคณะ (2008)

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความสำคัญในการส่งออกไม้ดอกของไทยโดยสามารถส่งขายตัดดอกเป็นอันดับหนึ่งของโลก กล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด มีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกออกเป็นหมู่ประมาณ 20 หมู่ และรวบรวมกล้วยไม้ชนิดนี้ที่ค้นพบแล้วได้ประมาณ 1,000 ชนิดพันธุ์ กล้วยไม้สกุลหวาย มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพติเอล คือ มีลำลูกกล้วย เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งหนาสีเขียว ดอกมีลักษณะทั่วไปของกลีบชั้นนอกคู่บนและคู่ล่างขนาดยาวพองๆ กันโดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะมีส่วนโคน ซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอกประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่างและส่วนฐานของเส้าเกสรซึ่งประกอบกันจะปูดออกมา มีลักษณะคล้ายเดือยที่เรียกว่า “เดือยดอก” สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่างๆ กันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นๆ กล้วยไม้หวายป่าของไทย มีสีสวยงาม ก้านช่อดอก สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายที่เป็นกล้วยไม้อยู่ในป่าของไทย มีหลายชนิดอันได้แก่พวก “เอื้อง” ต่างๆ เช่น เอื้องผึ้ง เอื้องคำ เอื้องเงินหลวง เอื้องปากนกแก้ว เอื้องเค้าแก้ว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีพวกที่มีลำเป็นสายห้อยลงมา เช่นเอื้องสายน้ำผึ้ง เอื้องสายหลวง เอื้องสายมรกต เอื้องสายนกระฉิบ เป็นต้น สำหรับหวายที่พัฒนาจนสามารถตัดดอกได้นั้น มีมากมายในเมืองไทย เช่น แอนนา ทับทิมสยาม โซเนีย ไดมอนสตาร์ เป็นต้น โดยกรมวิชาการเกษตรได้เก็บรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนต่าง ๆ การคุ้มครองพันธุ์พืชเหล่านี้จึงนับมีความสำคัญ

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นการศึกษาเพื่อคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลอื่นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่นแคทลียาที่สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชประกาศให้มีการจดทะเบียนและส่งออกได้ โดยนำมาคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนดาที่เหมาะสมสำหรับแต่ละสกุลเพื่อใช้เป็นข้อมูลประจำพันธุ์และคุ้มครองพันธุ์พืชของไทยที่มีการส่งออก

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2558 -กันยายน 2560

วิธีดำเนินการ

1. การรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้และการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายจากแหล่งต่าง ๆ เช่นฟาร์มเกษตรกรรมศูนย์วิจัยพืชสวน เชียงราย และศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ จำนวนอย่างน้อย 100 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*, (1994) หรือการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป วัดคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ค่าดูดกลืนแสง 260/280 nm นำมาเจือจางให้มีปริมาณเหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์

2. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนดาและรองเท้านารีมาใช้กับกล้วยไม้สกุลหวาย

2.1 นำไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนดาจำนวน 100 คู่สาย และรองเท้านารี จำนวน 100 คู่สาย มาทดสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวาย

2.2 ทำพีซีอาร์โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ หรือการใช้พีซีอาร์มาสเตอร์มิกซ์คิท

2.3 ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) และนำผลผลิตพีซีอาร์อีก 4 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบและบันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System และการนำไปอ่านค่าแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ

3. การติดฉลากสีฟลูออเรสซินและการอ่านแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ

3.1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวนอย่างน้อย 10 คู่ มาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ดังกล่าว ด้วยการนำไปติดสีฟลูออเรสซิน ทำพีซีอาร์ แล้วตามอ่านขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ

3.2 อ่านค่าอัลลิลที่ได้และตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ปรากฏ

4. การทดสอบและค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะสำหรับการทำบาร์โค้ด และการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดตั้ง โดยการใส่ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนต่าง ๆ

เช่นนิวเคลียร์เมมเบรน แล้วคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและ นำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลบาร์โคดใน GenBank และนำไปหาความสัมพันธ์แบบวงศ์วานวานเครือต่อไป

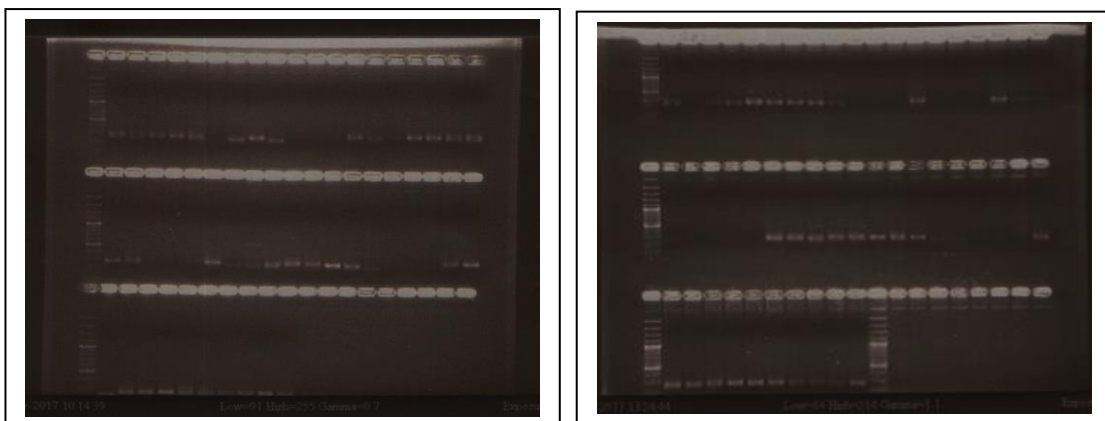
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้แต่ละสกุลและการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

- 4.1 การคัดเลือกกล้วยไม้สายพันธุ์ที่มีความสำคัญ
- 4.2 การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์
- 4.3 วิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยใช้โปรแกรม SPSS หรือ NTSys หรือ TREECON เพื่อหา ความสัมพันธ์แบบวงวนวานเครือหรือแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree)

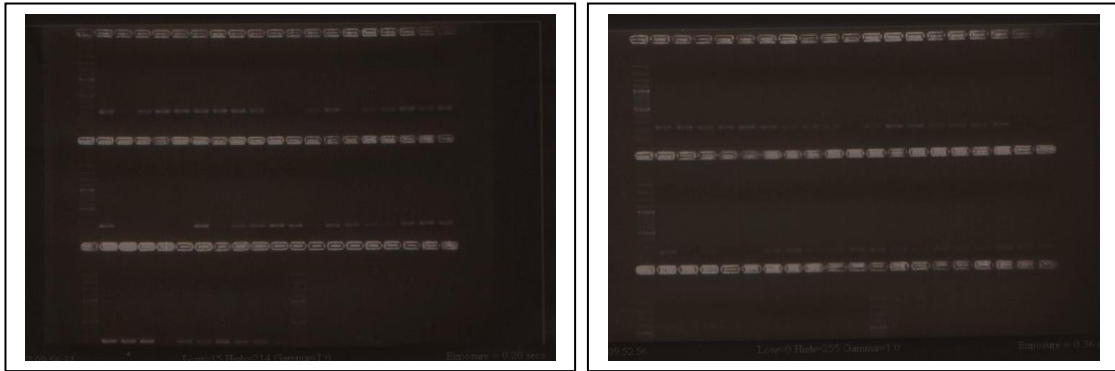
ผลการทดลองและอภิปราย

ผลการสุ่มนำไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 70 คู่สาย มาทำ PCR กับตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์สกุลหวาย 5 สายพันธุ์ โดยพบว่ามีเพียงไพรเมอร์ 3 คู่สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ คือ Vandbirdo_022, Vandbirdo_026, และ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดแถบแบน จากไพรเมอร์ Vandbirdo_022 ประมาณ 200 คู่เบส Vandbirdo_026 ประมาณ 280 คู่เบส และ Vandbirdo_094 ประมาณ 240 คู่เบส

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ 3 ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอกล้วยไม้ 96 สายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR แล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่า ไพรเมอร์ Vandbirdo_026 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 74 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 280 คู่เบส และไพรเมอร์ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 80 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่เบส



รูปภาพที่ 1 แสดง ผลการรัน PCR product 1 % agarose gel electrophoresis ของไพรเมอร์ Vandbirdo_026 กับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 97 สายพันธุ์ , lane(1) = 100 bp dna ladder marker



รูปภาพที่ 2 แสดง ผลการรัน PCR product 1 % agarose gel electrophoresis ของไพรเมอร์ Vandbirdo_094 กับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 97 สายพันธุ์ , lane(1) = 100 bp dna ladder marke

การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด

จากการรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จากฟาร์มเกษตรกรที่นำพันธุ์พืชมาจดทะเบียนพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กล้วยไม้สกุลหวายพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 30 สายพันธุ์เพื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดบาร์โค้ด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Dream Taq PCR Green Master mix kit ไพรเมอร์ 10 พิกโตโมล โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะได้แก่ matK, ITS, trnH-psbA และ rbcL หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ในข้างต้นแล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 800-1000 คู่เบส ดังภาพที่ 2

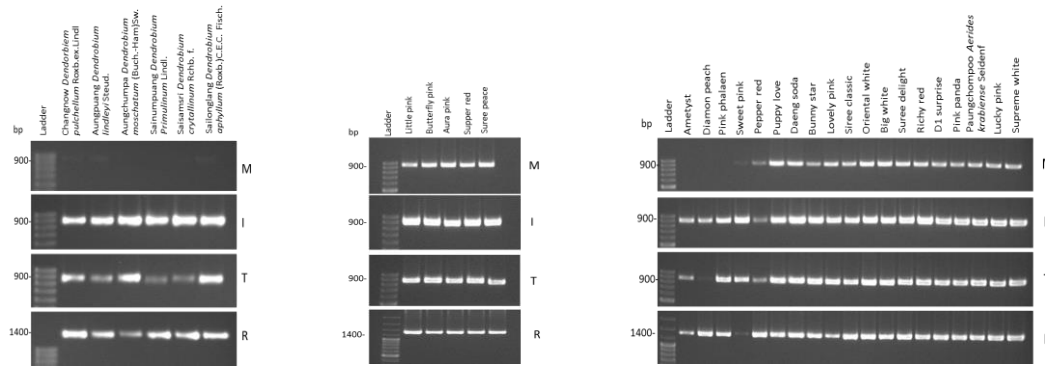


Figure 1. DNA barcode fragments of all 30 *Dendrobium* spp. In standard Regions M ; *matK*, I ; ITS, T; *trnH-psbA* and R ; *rbcL* .

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติโดยบริษัทเอกชนและเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ได้ชื่อกล้วยไม้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	Primer	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
1	2125515_1M_M	<i>Dendrobium pulchellum</i> voucher	1334	1334	89%	0.0	97%	KF1437121
2	2125516_2M_M	<i>Dendrobium aggregatum</i> voucher	1585	1585	96%	0.0	99%	KF143639.1
3	2125517_3M_M	<i>Dendrobium pendulum</i> voucher	723	723	96%	0.0	87%	KF143705.1
4	2125518_4M_M	<i>Dendrobium williamsonii</i>	268	268	77%	8e-68	77%	KP762104.1
5	2125519_5M_M	<i>Dendrobium crystallinum</i>	1177	1177	96%	0.0	99%	AB847735.1
6	2125520_6M_M	<i>Dendrobium aphyllum</i>	1280	1280	95%	0.0	98%	AB847736.1
7	2125521_7M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1177	1177	95%	0.0	97%	EF079344.1
8	2125522_8M_M							
9	2125523_9M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	867	867	95%	0.0	94%	EF079344.1
10	2125524_10M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1572	1572	97%	0.0	99%	EF079344.1
11	2125525_11M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1609	1609	99%	0.0	99%	EF079344.1
12	2125526_12M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1594	1594	97%	0.0	99%	EF079344.1
13	2125527_13M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1568	1568	97%	0.0	99%	EF079344.1
14	2125528_14M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1587	1587	97%	0.0	99%	EF079344.1
15	2125529_15M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1594	1594	97%	0.0	99%	EF079344.1
16	2125530_16M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1596	1596	98%	0.0	99%	EF079344.1
17	2125531_17M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1594	1594	99%	0.0	99%	EF079344.1
18	2125532_18M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1594	1594	97%	0.0	99%	EF079344.1

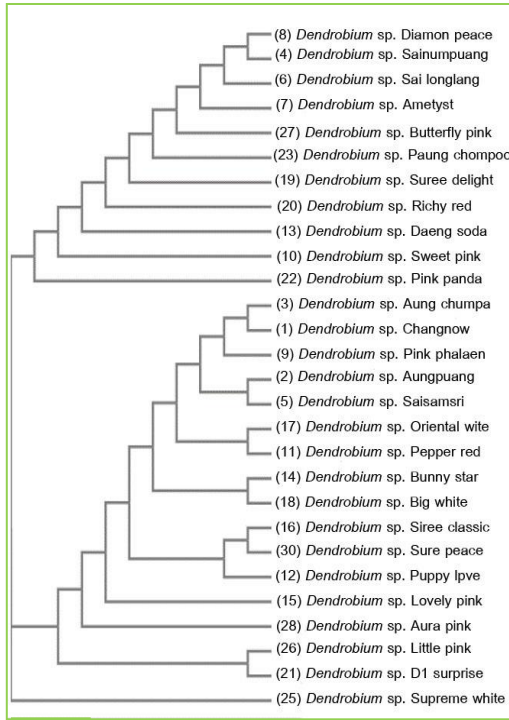
ลำดับ	Primer	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
19	2125533_19M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1570	1570	97%	0.0	99%	EF079344.1
20	2125534_20M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1572	1572	97%	0.0	99%	EF079344.1
21	2125535_21M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1572	1572	97%	0.0	99%	EF079344.1
22	2125536_22M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1546	1546	98%	0.0	98%	EF079344.1
23	2125537_23M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1572	1572	98%	0.0	98%	EF079344.1
24	2125538_24M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1592	1592	97%	0.0	99%	EF079344.1
25	2125539_25M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1576	1576	99%	0.0	98%	EF079344.1
26	2125540_26M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1567	1567	97%	0.0	99%	EF079344.1
27	2125541_27M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1570	1570	97%	0.0	99%	EF079344.1
28	2125542_28M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1572	1572	98%	0.0	98%	EF079344.1
29	2125543_29M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1576	1576	99%	0.0	98%	EF079344.1
30	2125544_30M_M	<i>Diplocaulobium aureicolor</i>	1607	1607	99%	0.0	99%	EF079344.1

การวิเคราะห์ phylo-genetic tree

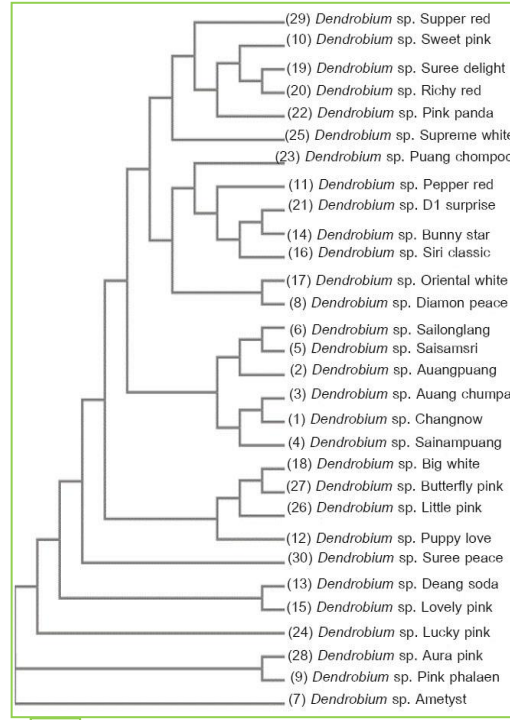
นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาจัดเรียงตามรูปแบบของโปรแกรมในรูปแบบ FASTA Format เรียงลำดับโดยมีชื่อสายพันธุ์แทรก นำไฟล์ที่ได้ส่งเข้าไปวิเคราะห์ข้อมูล phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม ClustalWII Phylogeny ในเว็บไซต์ www.ebi.ac.uk ดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4



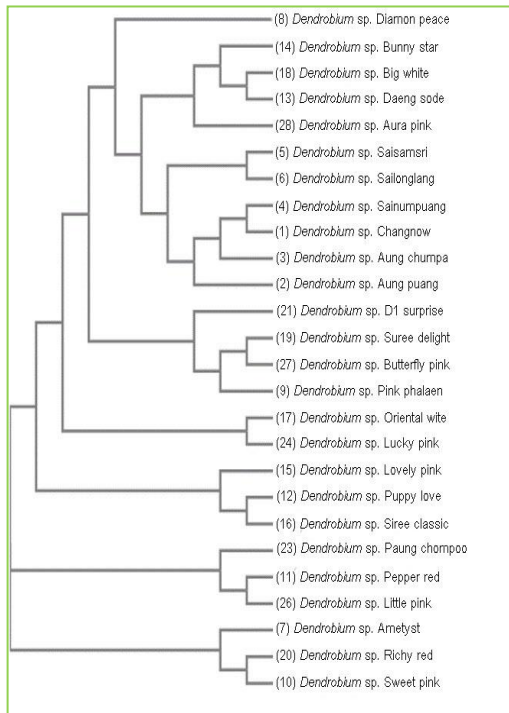
ภาพที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W II Phylogeny



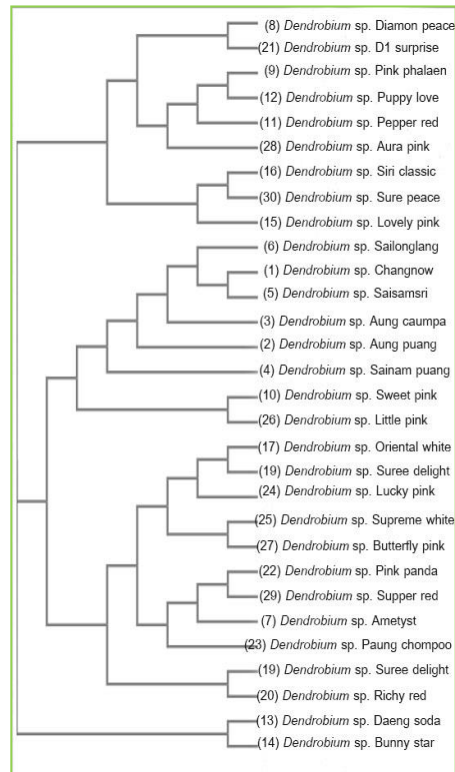
m



l



trnH



r

ภาพที่ 4 แสดงผลการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนจากยีนต่าง ๆ ในการสร้าง Phylogenetic tree กับกล้วยไม้ 30 สายพันธุ์

ผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ *rbcL* + *matK* ซึ่งจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลการสุ่มนำไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 70 คู่สายมาทำ PCR กับตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์สกุลหวาย 5 สายพันธุ์ โดยพบว่ามีเพียงไพรเมอร์ 3 คู่สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ คือ *Vandbirdo_022*, *Vandbirdo_026*, และ *Vandbirdo_094* สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดแถบแบน จากไพรเมอร์ *Vandbirdo_022* ประมาณ 200 คู่เบส *Vandbirdo_026* ประมาณ 280 คู่เบส และ *Vandbirdo_094* ประมาณ 240 คู่เบส ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ดีดีสี่ฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ 3 ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอกล้วยไม้ 96 สายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR แล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่า ไพรเมอร์ *Vandbirdo_026* สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 74 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 280 คู่เบส และไพรเมอร์ *Vandbirdo_094* สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 80 ตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 240 คู่เบส

การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากการรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จากฟาร์มเกษตรกรที่นำพันธุ์พืชมาจดทะเบียนพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กล้วยไม้สกุลหวายพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 30 สายพันธุ์เพื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดบาร์โค้ด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Dream Taq PCR Green Master mix kit ไพรเมอร์ 10 พิคโมล โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะได้แก่ *matK*, *ITS*, *trnH-psbA* และ *rbcL* หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ในข้างต้นแล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 800-1000 คู่เบส นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติโดยบริษัทเอกชนและเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ได้ชื่อกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาจัดเรียงตามรูปแบบของโปรแกรมในรูปแบบ FASTA Format เรียงลำดับโดยมีชื่อสายพันธุ์แทรก นำไฟล์ที่ได้ส่งเข้าไปวิเคราะห์ข้อมูล phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม ClustalWII Phylogeny ผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ *rbcL* + *matK* ซึ่งจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ต่อไป

การทดลองที่ 4

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่
ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด

Using of SSR and SCAR markers for detection on Northern corn leaf blight
resistance in maize germplasm

ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง จีราพร แก่นทรัพย์ ศิวีไล ลาภบรรจบ สุริพัฒน์ ไทยเทศ

คำสำคัญ เครื่องหมายโมเลกุล โรคใบไหม้แผลใหญ่ ข้าวโพด molecular markers SSR SCAR
Northern corn leaf blight maize

บทคัดย่อ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight, NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ที่ทำความเสียหายให้กับข้าวโพด ส่งผลกระทบต่อผลผลิตลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด การป้องกันความเสียหายจากโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่มีประสิทธิภาพและประหยัดมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ 12 คู่ไพรเมอร์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในพันธุ์ข้าวโพดที่พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค พบว่าไพรเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอต่อโรคและข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสการ์ SCA07496 SCA16420 SCB09464 และ SCE20429 ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลสการ์ทั้ง 4 เครื่องหมายให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กับการต้านทานต่อโรคกับพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ได้ทำการศึกษา

Abstract

Northern Corn Leaf Blight (NCLB) is a destructive foliar disease of maize that results from infection of the fungal pathogen, *Exserohilum turcicum*. The yield losses incurred from NCLB in Thailand may exceed 30-40 % when environmental conditions were optimal for disease development. Using the cultivars resistance to reduce the detrimental effects of NCLB on maize productivity is the most cost-effective. However, this study was use of SSR and SCAR markers for detection on NCLB resistance in maize germplasm. After detecting 12 simple sequence repeat (SSR) markers for polymorphisms between resistant and susceptible cultivars of maize, three markers may be linked to NCLB resistance cultivars; umc2037, bnlgl233 and bnlgl1607 were identified. The use of sequence characterized amplified region (SCAR) markers; SCA07₄₉₆ SCA16₄₂₀ SCB09₄₆₄ and SCE20₄₂₉ for polymorphisms between resistant and susceptible cultivars of maize, all of the SCAR markers were not related to the disease resistance of the studied maize cultivars.

คำนำ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight; NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ที่ทำความเสียหายให้กับข้าวโพด ส่งผลกระทบต่อผลผลิตลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด พบว่าถ้าเกิดโรคก่อนระยะออกไหมจะทำให้ผลผลิตลดลงมาก หากมีการระบาดเกิดขึ้นหลังจากข้าวโพดออกไหมแล้ว 6-8 สัปดาห์ ความเสียหายจะลดน้อยลง (Degefu, 2003) ซึ่งการป้องกันความเสียหายจากโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค (Lipps and Mills, 2002; Pataky *et al.*, 1998) ซึ่งสามารถลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรคได้ เป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ นอกจากให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูงแล้วจะต้องมีความต้านทานต่อโรคของข้าวโพดด้วย การพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานโรคในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมความเสียหายของผลผลิต ปัจจุบันการศึกษาด้านเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถนำมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ได้มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ เช่น ได้มีการค้นพบเครื่องหมายดีเอ็นเอสการ์ (Sequence Characterized Amplified Region; SCAR) ของชิ้นดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อพันธุ์ข้าวโพดที่มีความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Juthaporn *et al.*, 2008) นักวิจัยหลายคณะได้ใช้

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ศึกษาตำแหน่งของชุดยีนที่ทำให้เกิดลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณ (Quantitative Trait Loci: QTL) ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ บนโครโมโซม ทั้ง 10 คู่ ของข้าวโพด พบว่ามีตำแหน่งของชุดยีน จำนวน 5 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ การต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด วางตัวอยู่บนโครโมโซม 1.01 (mmc0031), 5.05 (bnlg1118), 6.05 (nc009), 7.03 (phi114-bmc1666) และ 8.05 (bmc1812) (จุฑาพร., 2551; Freymark et al., 1994; Dingerdissen et al., 1996; Simcox and Bennetzen, 1993) และได้มี รายงานลำดับเบสของยีนที่ในพืชที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความต้านทานต่อโรคของข้าวโพด จากองค์ ความรู้เกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถนำไปใช้ ตรวจสอบและจำแนกข้าวโพดสายพันธุ์ที่ต้านทาน และไม่ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ได้ และซึ่ง สามารถนำมาใช้คัดเลือกข้าวโพดต้นที่ต้านทาน และต้นไม่ต้านทานโรคได้อย่างรวดเร็วและมีความ แม่นยำถึงระดับดีเอ็นเอ เป็นการลดเวลาในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีความ ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ให้สั้นลงได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับ ลักษณะการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ ตรวจสอบและจำแนกข้าวโพดในประชากรของเชื้อพันธุ์กรรม ข้าวโพด เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ และสการ์ ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ ความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด รวมทั้งเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่วางตัวอยู่ใกล้กับ ตำแหน่งของยีนควบคุมความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (ht1, ht2, ht3, และ htn1) นำ เครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ทดสอบหาทราบรูปแบบการปรากฏของเครื่องหมายโมเลกุลในดีเอ็นเอของ ข้าวโพดที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2558 -กันยายน 2560

วิธีดำเนินการ

1. เก็บตัวอย่างข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ จำนวน 18 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ ประกอบด้วย

1.1 พันธุ์ต้านทาน (R) ได้แก่ Nei452015 (R) Nei462013 (R) Nei542011 (R) Nei542013 (R) และKi56 (R)

1.2 พันธุ์อ่อนแอ (S) ได้แก่ Nei9202 (S) Nei9202(T) (S) และ Ki59 (S)

1.3 พันธุ์ต้านทานต่อโรคปานกลาง ได้แก่ (MR) Ki58(MR) Nei452008 (MR) Nei452006 (MR) Nei452009 (MR) KI48 (MR) KI60 (MR)

1.4 พันธุ์อ่อนแอต่อโรคปานกลาง ได้แก่ (MS) Ki101 (MS) Nei40211 (MS) Nei532005 (MS) Nei542017 (MS)

2. สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพดโดยใช้ชุดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพืช ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตรวจสอบและบันทึกภาพ จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องไบโอทรอป (BioDrop) ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3. สังเคราะห์ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (SSR) และสการ์ (SCAR) ในข้าวโพดที่เคยรายงานว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด และเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่วางตัวอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน ht1, ht2, ht3, และ htn1 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ และ เครื่องหมายโมเลกุลสการ์ จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์

4. ทดสอบหาอุณหภูมิและปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์เอสเอสอาร์ และสการ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพด และตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบและบันทึกภาพ

5. ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรค ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบและบันทึกภาพ

6. บันทึกข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่ได้จากการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสการ์

7. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบและบันทึกภาพ

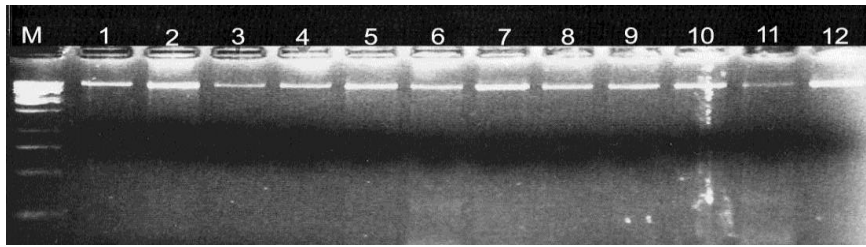
8. นำผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวโพดพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเออย่างละเอียด โดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ ABI PRISM™ 310 DNA Sequencer ที่มีตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเออยู่ทุกตัวอย่าง (Internal Size Standard) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ

9. บันทึกข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่ได้จากการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

ผลการทดลองและอภิปราย

1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

จากการเก็บตัวอย่างพร้อมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับพืช สามารถสกัดจากใบข้าวโพดได้ในปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการทดลองเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ดังแสดงผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในภาพที่ 1



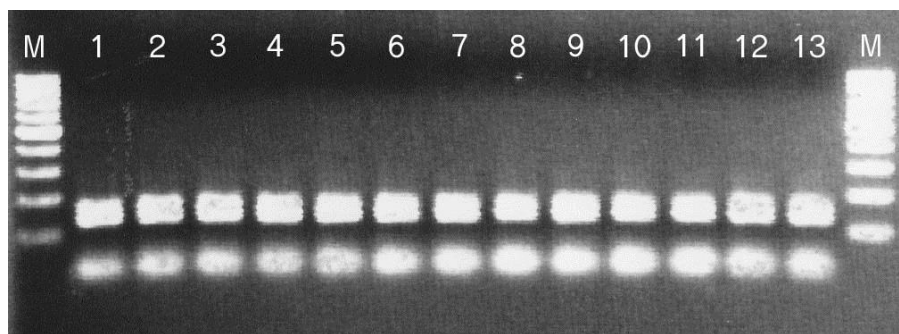
ภาพที่ 1 แสดงดีเอ็นเอของข้าวโพด (1-12) ที่สกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช และตรวจสอบด้วยอะกาโรส M= 1 Kb DNA Ladder

จากการสังเคราะห์ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (SSR) ในข้าวโพดที่เคยรายงานว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด และเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่วางตัวอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน ht1, ht2, ht3, และ htn1 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ ผลการทดสอบหาค่า Annealing Temperature (Ta) ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยแต่ละเครื่องหมาย SSR มีค่า Ta ที่เหมาะสม ชนิดของสารเรืองแสงที่ติดฉลาก และขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ดังตาราง 1 และตัวอย่างการตรวจสอบผลด้วยด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3

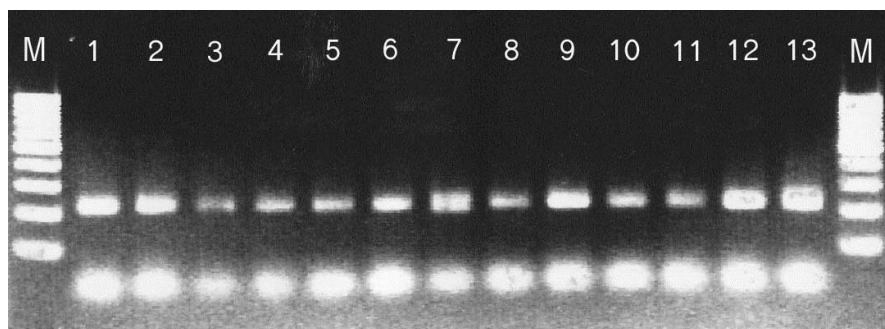
ตารางที่ 1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยไพรเมอร์ที่ติดฉลากสารเรืองแสง

ลำดับที่	เครื่องหมาย SSR	สารเรืองแสงที่ติดฉลาก	ค่า Ta (°C)	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (bp)
1	umc1745	VIC	67	137
2	bnlg162	NED	65	223
3	bnlg1607	PET	64	235
4	umc1342	FAM	60	86

5	umc1526	VIC	60	109
6	bnlg666	NED	55	122
7	bnlg2356	PET	55	211
8	umc1049	FAM	50	129
9	bnlg1233	VIC	55	132
10	umc1712	NED	55	109
11	umc2037	PET	55	98
12	umc2562	FAM	55	164



ภาพที่ 2 แสดงขนาดซันดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวโพด (1-12) ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมาย *bnlg666* และตรวจสอบด้วยอะกาโรส $M= 100$ pb DNA Ladder



ภาพที่ 3 แสดงขนาดซันดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวโพด (1-12) ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมาย *umc2356* และตรวจสอบด้วยอะกาโรส $M= 100$ pb DNA Ladder

ผลจากการหาแบบแผนการเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จำนวน 12 คู่ กับข้าวโพดพันธุ์ต้านและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบว่าเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ทดสอบให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

ไพรมเมอร์ umc2037 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 98 คู่เบส ในข้าวโพดพันธุ์ Nei9202(S) Nei9202(T)(S) Ki95 (S) และ Nei532005 (MS) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สำหรับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 90 และ 94 คู่เบส การปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 98 คู่เบสของไพรมเมอร์ umc2037 อาจมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด

ไพรมเมอร์ bnlg1233 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 79 คู่เบส ในข้าวโพดพันธุ์ Nei9202(S) Nei9202(T)(S) Ki95 (S) และ Ki101 (MS) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สำหรับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 235 209 227 234 และ 245 คู่เบส การปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 79 คู่เบสของไพรมเมอร์ bnlg1233 อาจมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด

ไพรมเมอร์ bnlg1607 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 219 คู่เบส ในข้าวโพดพันธุ์ Nei9202(S) และ Ki95 (S) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สำหรับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 76 83 และ 85 คู่เบส การปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 219 คู่เบสของไพรมเมอร์ bnlg1607 อาจมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด

สำหรับไพรมเมอร์อื่น ๆ การปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันนั้น ยังไม่สามารถแยกกลุ่มพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอออกจากกันอย่างชัดเจน เนื่องจากบางไพรมเมอร์ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบได้บ่อยในพันธุ์ต้านทาน แต่ก็ยังพบแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันบ้างในพันธุ์อ่อนแอ ดังแสดงในตารางที่ 2

การปรากฏแถบดีเอ็นเอของไพรมเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 97 79 และ 219 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งพบได้ในข้าวโพดพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ นั้น หากต้องการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดให้ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรมเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ซึ่งต้องไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ได้มีรายงานมาก่อนว่ามีความเกี่ยวข้องหรือสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานและอ่อนแอโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งมีความจำเพาะกับประชากรข้าวโพดที่ศึกษา ซึ่งอาจจะใช้ไม่ได้กับประชากรข้าวโพดอื่น ๆ ดังนั้นการนำเครื่องหมายโมเลกุลไปใช้คัดเลือกพันธุ์จะต้องมีการทดสอบหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ได้ดีกับประชากรนั้น ๆ

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของซินดีเอ็นเอที่ตรวจพบในข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เอสเอสอาร์ ไพรมเมอร์ umc1342 umc1526 bnlg666 umc2356 umc1560 และ umc2562

ลำดับ ที่	ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	ขนาดของซินดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)					
		umc1342	umc1526	bnlg666	umc2356	umc1560	umc2562
1	Nei9202 (S)	87	109	116, 122	212	169	148
2	Nei452015 (R)	87	109, 118	116, 122	212	152	166
3	Nei9202(T) (S)	87	109	116, 122	212	152	164
4	Nei462013 (R)	87	109	116, 122	212	152	166
5	Nei542011 (R)	87	109	116, 122	208	169	159
6	Nei542013 (R)	87	109	116, 122	212	152	166
7	Ki56 (R)	87	109	116, 122	208, 212	152	166
8	Ki58 (MR)	87	109	116, 122	212	152	166
9	Ki59 (S)	87	109	116, 122	212	169	148
10	Ki101 (MS)	87	109	116, 122	212	169	166
11	Nei40211 (MS)	81	107	116	210	169	149
12	Nei452008 (MR)	87	116	122	212	152	166
13	Nei452006 (MR)	76	119	116, 122	214	152	166
14	Nei452009 (MR)	76	98, 109	116	214	169	159
15	Nei532005 (MS)	76	116	122	207, 212	152	166
16	Nei542017 (MS)	76	98	116	214	152	159
17	Ki48 (MR)	76	116	122	212	152	165
18	Ki60 (MR)	76	107	116, 122	202	169	156

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงขนาดของซินดีเอ็นเอที่ตรวจพบในข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ไพรมเมอร์ umc1712 umc2037 bnlg1233 bnlg162 bnlg1607 และ umc1049

ลำดับ ที่	ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	ขนาดของซินดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)					
		umc1712	umc2037	bnlg1233	bnlg162	bnlg1607	umc1049
1	Nei9202 (S)	110	98	79	219	219	87
2	Nei452015 (R)	107	90	76	233	235	88
3	Nei9202(T) (S)	110	98	79	222	209	91

ลำดับ ที่	ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	ขนาดของซันดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)					
		umc1712	umc2037	bnlg1233	bnlg162	bnlg1607	umc1049
4	Nei462013 (R)	107	90	-	227	207, 227	86
5	Nei542011 (R)	107	94	76	227	209, 227	86
6	Nei542013 (R)	107	90	-	-	227	86
7	Ki56 (R)	110	90	76	219	234	86
8	Ki58 (MR)	110	90	-	215	245	86
9	Ki59 (S)	110	98	79	219	219	87
10	Ki101 (MS)	110	90	-	219	219	86
11	Nei40211 (MS)	110	94	76, 85	219	227	84
12	Nei452008 (MR)	107	90	83	227	227	-
13	Nei452006 (MR)	107	90	76, 85	233	234	96
14	Nei452009 (MR)	110	90	76, 85	219	234	86
15	Nei532005 (MS)	107	90, 98	85	227	227	86
16	Nei542017 (MS)	110	90	76, 85	227	234	86
17	Ki48 (MR)	110	90	85	227	234	-
18	Ki60 (MR)	110	90	85	247	227	112

2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสกราร์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสกราร์ (SCAR) จำนวน SCAR 4 คู่ ในข้าวโพดที่เคยรายงาน ว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ได้แก่ SCA07₄₉₆ SCA16₄₂₀ SCB09₄₆₄ และ SCE20₄₂₉ ตรวจสอบกับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ผลการทดลองไม่พบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ แล้วให้ความเกี่ยวข้องกับพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่ผลจากการทดลองของ Juthaporn *et al.* (2008) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดข้าวเหนียว โดยการสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ 241W (ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) และพันธุ์ 209W (อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) ทดสอบความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในประชากรชั่วที่ 2 และวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SCAR จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่เครื่องหมาย SCA07₄₉₆ SCA16₄₂₀ SCB09₄₆₄ และ SCE20₄₂₉ มีพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ทั้ง 4 ตำแหน่ง ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาดที่พบเฉพาะในประชากรชั่วที่ 2 ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ เท่านั้น ซึ่งได้ทดลองดังกล่าวได้ทดสอบกับข้าวโพดข้าวเหนียว แต่ในการทดลองนี้เมื่อนำเครื่องหมาย

โมเลกุล SCAR ชนิดเดียวกันมาทดสอบกับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้นั้นมีความจำเพาะและใช้คัดเลือกการต้านทานต่อโรคได้กับประชากรข้าวโพดข้าวเหนียวที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ 241W และพันธุ์ 209W เท่านั้น ซึ่งไม่มีความจำเพาะหรือไม่สามารถใช้คัดเลือกการต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ของประชากรข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

ตารางที่ 3 แสดงความแตกต่างของขนาดแถบดีเอ็นเอในข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค SCAR

ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	SCA07496		SCA16420	SCA09464		SCA20429
	496 bp	800 bp	420 bp	170 bp	464 bp	429 bp
1. Nei 9202 (S)	-	/	/	/	-	/
2. Nei 452006 (MR)	-	/	/	/	-	/
3. Nei 452009 (MR)	/	-	/	/	-	/
4. Nei 462013	-	/	/	/	-	/
5. Nei 532005 (MS)	-	/	/	/	-	/
6. Nei 542011 (R)	-	/	/	/	-	/
7. Nei 542017 (MS)	-	/	/	/	-	/

หมายเหตุ : / = ปรากฏแถบดีเอ็นเอ, - = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด พบว่าแบบแผนการเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จำนวน 12 คู่ กับข้าวโพดพันธุ์ต้านและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ทำให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค โดยไพรเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 พบรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอต่อโรค กับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลของเครื่องหมายโมเลกุลนี้กับประชากรข้าวโพดที่ต้องการนำมาศึกษา ก่อนที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลนี้ไปใช้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

การทดลองที่ 5

การศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรอง

ของกรมวิชาการเกษตรโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Study of Flooding Tolerance and Drought Tolerance in DOA recommended Soybean Cultivars using Biotechnology

จีราพร แก่นทรัพย์ ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ประสาน สืบสุข รัชนิ โสภา

คำสำคัญ ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) ความทนทานต่อสภาพน้ำท่วม (Flooding tolerance) ความทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง (Drought tolerance) เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ยีนในระบบทนทานต่อสภาพน้ำท่วม (Flooding-related gene) ยีนในระบบทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง (Drought-related gene)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม จำนวน 20 พันธุ์ ประกอบด้วยถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร 18 พันธุ์ และถั่วเหลืองที่ใช้เป็นพันธุ์ควบคุม (control) 2 พันธุ์ ได้แก่ อุตสาหะ-เอ และ Williams ในส่วนของลักษณะทางสรีรวิทยาได้ทำการทดสอบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอก และการทดสอบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรกงอกโดยใช้สาร Polyethylene glycol (PEG) แต่ผลการทดลองวางแผนแบบ 2 x 20 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance พบว่า ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมแตกต่างกัน พันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 พันธุ์เชียงใหม่ 2 และพันธุ์สุโขทัย 1 พันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 พันธุ์เชียงใหม่ 5 และพันธุ์ สจ.4 สำหรับสภาพแห้งแล้ง พันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 พันธุ์เชียงใหม่ 2 และพันธุ์สุโขทัย 1 พันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 พันธุ์เชียงใหม่ 84-2 และพันธุ์เชียงใหม่ 6 เมื่อคำนวณหาค่าความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างความทนทานต่อสภาพ

แห้งแล้งกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอกในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีความสัมพันธ์(Correlation) เชิงบวกระหว่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าถั่วเหลืองพันธุ์รับรองพันธุ์ใดเหมาะสมต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งที่เกิดขึ้นในช่วงปลูกถั่วเหลืองรวมถึงระยะแรกงอก สามารถนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรให้ปลูกในพื้นที่ที่ประสบปัญหา ดังกล่าวได้

อย่างไรก็ตาม การต่อ ยอดงานวิจัยนี้โดยการศึกษาสารพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรด้วยเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมหรือสภาพแห้งแล้ง คาดว่าจะเป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองในระดับยีน รวมถึงสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งไปใช้ในการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในอนาคต

Abstract

The objective of this research was to study flooding tolerance and drought tolerance of DOA recommended soybean cultivars both physiologically and genetically. Twenty soybean cultivars consisting of 18 DOA recommended cultivars and 2 control cultivars, namely Utsaha-A and Williams, were examined. In physiological test, germination percentage after soaking treatment and germination percentage under drought stress that induced by Polyethylene glycol (PEG) were measured to investigate seed-flooding tolerance and drought tolerance, respectively. Each experiment was performed as Factorial based on Completely Randomized Design (CRD) with four replications. Analysis of variance (ANOVA) was conducted for germination percentage. The result of seed-flooding tolerance test showed that the germination percentage was affected by different cultivars suggesting the presence of genetic control of seed-flooding tolerance. The three most tolerant cultivars in flooding were Srisamrong1, CM 2, and Sukothai1. The three most susceptible ones were CM1, CM5, and SJ4. In seed-drought tolerance test, the result showed that the three most tolerant cultivars were Srisamrong1, CM 2, and Sukothai1. The three most susceptible cultivars in drought stress were CM1, CM84-2, and CM6. Correlation between germination percentage after soaking treatment as seed-flooding tolerance and germination percentage under drought stress as seed-drought tolerance of the examined cultivars were calculated. And the result showed that there was a

significant positive correlation between them, indicating that cultivars having tolerance to seed-flooding tended to show tolerance to seed-drought stress as well. From this research, the seed-flooding tolerance and drought tolerance of DOA recommended soybean cultivars was studied. The information will be useful for selecting soybean cultivars to plant in area with much rainfall or flooding and area facing drought problem at sowing time.

Further research in genetics such as study of molecular markers and genes related to flooding tolerance and drought tolerance using the DOA recommended soybean cultivars will help us to understand the tolerance mechanisms at gene level more clearly. Furthermore, identification of candidate molecular markers or genes applicable for marker-assisted selection for flooding tolerance and drought tolerance will be highly beneficial.

คำนำ

การเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศโลกเป็นผลสืบเนื่องมาจากปรากฏการณ์จากภาวะโลกร้อนซึ่งมีสาเหตุจากการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกอย่างต่อเนื่อง นับตั้งแต่ยุคปฏิวัติอุตสาหกรรมช่วงปี ค.ศ. 1750 ถึง ค.ศ. 1850 และเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนถึงปัจจุบัน ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลกนับวันทวีความรุนแรงมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นด้านสิ่งแวดล้อม สุขภาพ ความมั่นคงและเศรษฐกิจ รวมถึงการเกษตร การเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศส่งผลกระทบต่อเกษตรทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น ปริมาณผลผลิตต่อพื้นที่ คุณภาพของผลผลิต การบำรุงรักษาพืช และการป้องกันศัตรูพืช เป็นต้น (ศูนย์จัดการความรู้ด้านการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ, 2555) เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อผลผลิตการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศกำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทยที่การเกษตรพึ่งพาน้ำฝนและฤดูกาลตามธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น ความแปรปรวนของฤดูกาล ปัญหาภัยแล้งและน้ำท่วมที่เกิดบ่อยครั้งขึ้น ส่งผลกระทบต่อผลผลิตการเกษตรเป็นอย่างมาก

ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาอุทกภัยบ่อยครั้งและมีความรุนแรงมากขึ้น ผลการสำรวจความเสียหายจากมหาอุทกภัยในประเทศไทย พ.ศ. 2554 ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2554 พบว่าผลกระทบในด้านพืช เกษตรกรได้รับความเสียหายทั้งหมด 1,284,106 ราย พื้นที่การเกษตรเสียหายทั้งหมด 12.61 ล้านไร่ แบ่งเป็นข้าว 9.99 ล้านไร่ พืชไร่ 1.87 ล้านไร่ พืชสวนและอื่นๆ 0.75 ล้านไร่ (ศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554) ในส่วนสถิติความเสียหายจากภัยแล้งระหว่างปี พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2550 พบว่าโดยส่วนใหญ่จังหวัดที่ประสบภัยแล้งอยู่ระหว่าง 51 - 60 จังหวัด ซึ่งภาวะภัยแล้งในปี พ.ศ.

2548 มีมูลค่าความเสียหายสูงสุดถึง 7,565.9 ล้านบาท สำหรับในปี พ.ศ. 2550 มีมูลค่าความช่วยเหลือ 554.9 ล้านบาท (ศูนย์ป้องกันวิกฤตน้ำ ศูนย์เมขลา, 2553) ปัญหาน้ำท่วมและปัญหาภัยแล้งสร้างความเสียหายแก่เศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ดังนั้นการปรับตัวของภาคการเกษตรต่อการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง แนวทางในการปรับตัวของภาคการเกษตรวิธีการหนึ่ง ได้แก่ การปรับเปลี่ยนสายพันธุ์พืชให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เช่น พันธุ์ทนอุณหภูมิต่ำ พันธุ์ทนแล้ง และพันธุ์ทนน้ำท่วม เป็นต้น ซึ่งการค้นคว้าวิจัยเพื่อค้นหาและปรับปรุงพันธุ์ให้เหมาะสมดังกล่าว เป็นสิ่งที่มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมน้ำมันพืช อาหารมนุษย์ และอาหารสัตว์ นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นพืชที่มีประโยชน์ทางการเกษตรคือพืชหมุนเวียนอีกด้วย จนถึงปัจจุบันนี้ ถั่วเหลืองที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์และรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรมีจำนวน 18 พันธุ์ ได้แก่ เชียงใหม่ 1 เชียงใหม่ 2 เชียงใหม่ 3 เชียงใหม่ 4 เชียงใหม่ 5 เชียงใหม่ 6 เชียงใหม่ 60 สจ.1 สจ.2 สจ.3 สจ.4 สจ.5 สุโขทัย 1 สุโขทัย 2 สุโขทัย 3 ศรีสำโรง 1 นครสวรรค์ 1 และขอนแก่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547 และ http://www.doa.go.th/fcrc/chiangmai/index.php?option=com_content&view=category&id=39&Itemid=103) การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของถั่วเหลืองดังกล่าวมีการดำเนินการไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น ลักษณะของต้น ใบ ดอก ฝัก และเมล็ด รวมถึงลักษณะทางการเกษตร เช่น อายุถึงวันออกดอก อายุเก็บเกี่ยว ปริมาณโปรตีนและน้ำมันในเมล็ด เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2547) แต่ไม่มีการศึกษาถึงความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ รวมถึงความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้ง นอกจากนี้การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์โดยใช้ข้อมูลในระดับดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมของถั่วเหลืองสายพันธุ์ไทยมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม การศึกษาถึงความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรทำให้ทราบว่าพันธุ์รับรองใดเหมาะสมต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งที่สุด (ดำเนินงานในปีงบประมาณ 2559 และ 2560) สามารถนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรให้ปลูกในพื้นที่ที่ประสบปัญหาดังกล่าวได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลือง ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาทดสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมหรือสภาพแห้งแล้ง (แผนดำเนินงานในปีงบประมาณ 2561 ซึ่งถูกพิจารณาขยับการทดลอง) และการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมหรือสภาพแห้งแล้ง (แผนดำเนินงานในปีงบประมาณ 2562 ซึ่งถูกพิจารณาขยับการทดลอง) จะเป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองในระดับยีน รวมถึงสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่มี

ประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้ง ไปใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในอนาคต

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นการศึกษาความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร ทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2558 -กันยายน 2560

วิธีดำเนินการ

1. รวบรวมและจัดเตรียมถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 18 พันธุ์ ได้แก่ เชียงใหม่ 1 เชียงใหม่ 2 เชียงใหม่ 3 เชียงใหม่ 4 เชียงใหม่ 5 เชียงใหม่ 6 เชียงใหม่ 60 สจ.1 สจ.2 สจ.3 สจ.4 สจ.5 สุโขทัย 1 สุโขทัย 2 สุโขทัย 3 ศรีสำโรง 1 นครสวรรค์ 1 และขอนแก่น รวมถึงพันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์ควบคุม (control) จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ อุตสาหะ-เอ และ Williams รวมทั้งสิ้น 20 พันธุ์ โดยขอความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ ประมาณ พันธุ์ละ 2,000 เมล็ด ซึ่งทำการปลูกถั่วเหลืองเมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2558

2. ทดสอบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอก ประยุกต์จากวิธีของ Sayama *et al.* (2009) โดยทำให้เกิดสภาพน้ำท่วมเมล็ดถั่วเหลืองเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเพาะทดสอบในกระดาษ (Between paper) และตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสพภาวะน้ำท่วม (อัตราการงอกหลังประสพภาวะน้ำท่วม) 5 วันหลังปลูก วางแผนการทดลองแบบ 2 x 20 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัยดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือถั่วเหลือง 20 พันธุ์ ปัจจัยที่ 2 คือ สภาวะของน้ำ 2 สภาวะ ได้แก่ สภาพปกติและสภาพน้ำท่วม ทำการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3. ทดสอบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรกงอก ตามวิธีของ Rasaei *et al.* (2013) โดยใช้ Polyethylene glycol (PEG) เป็นสารดูดความชื้นหรือสารชักน้ำให้เกิดสภาพแห้งแล้งในกระดาษเพาะ ตรวจสอบและเก็บข้อมูลอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสพภาวะแห้งแล้ง (อัตราการงอกหลังประสพภาวะแห้งแล้ง) 5 วันหลังปลูก และ 8 วันหลังปลูก วางแผนการทดลองแบบ 2 x 20 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัยดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ ถั่วเหลือง 20 พันธุ์ ปัจจัยที่ 2 สภาวะความแห้งแล้ง 2 สภาวะ ได้แก่ PEG 0% และ PEG 15% ทำการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองและอภิปราย

1. การรวบรวมและจัดเตรียมถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ

ขอความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ สำหรับนำมาใช้ในการทดสอบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้ง โดยทำการปลูกถั่วเหลืองจำนวน 20 พันธุ์ เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2558 จากนั้นในเดือนกุมภาพันธ์ 2559 ไปสำรวจต้นถั่วเหลืองที่ทำการปลูก (ภาคผนวก ภาพที่ 1 และ 2) พบว่าพันธุ์ถั่วเหลืองส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตที่ดี แต่มีบางพันธุ์ที่การเจริญเติบโตไม่ค่อยดี ซึ่งมีสาเหตุจากสภาพอากาศแปรปรวนที่มีอุณหภูมิต่ำลงอย่างมากช่วงกลางเดือนมกราคม 2559 อย่างไรก็ตามสามารถเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วเหลืองได้ตามจำนวนที่ต้องการ คือ ประมาณพันธุ์ละ 2,000 เมล็ด ซึ่งได้รับเมล็ดถั่วเหลืองที่กะเทาะเปลือกเรียบร้อยแล้วในช่วงต้นเดือนมิถุนายน 2559 ตรวจสอบสภาพเมล็ดถั่วเหลืองพบว่าเมล็ดถั่วเหลืองมีสภาพดี ไม่มีสิ่งปนเปื้อน นอกจากนี้ทำการชั่งน้ำหนักเมล็ดถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ จำนวน 100 เมล็ด 3 ซ้ำและเก็บข้อมูล (ตารางที่ 1) เนื่องจากต้องการศึกษาว่าขนาดของเมล็ดมีผลต่อความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองหรือไม่

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเมล็ดถั่วเหลือง 100 เมล็ด

พันธุ์	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	พันธุ์	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)
ชม.1	23.63	สจ.4	15.44
ชม.2	13.03	สจ.5	13.96
ชม.3	10.72	สท.1	12.70
ชม.5	10.48	สท.2	14.41
ชม.6	12.86	สท.3	10.91
ชม.60	11.00	ศรีสำโรง 1	14.97
ชม.84-2	23.46	ขอนแก่น	12.63
สจ.1	13.85	นครสวรรค์ 1	20.26
สจ.2	12.44	อุดรสะหะ-เอ	8.00
สจ.3	10.65	Williams	15.30

2. การทดสอบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกออก

สำหรับสภาวะน้ำท่วม คณะผู้วิจัยได้สร้างสภาวะให้เมล็ดถั่วเหลืองจมอยู่ในน้ำเป็นเวลา 2 วัน ดังภาพที่ 1 จากนั้นเพาะทดสอบในกระดาษ (Between paper) และตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสบภาวะน้ำท่วม (อัตราการงอกหลังประสบภาวะน้ำท่วม) 5 วันหลังปลูกโดยเปรียบเทียบกับสภาพปกติที่ไม่มีน้ำท่วม (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 1 การทดสอบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกออก



ภาพที่ 2 การเพาะทดสอบในกระดาดเพื่อตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสบภาวะน้ำท่วม (5 วันหลังปลูก)

สภาพปกติ พันธุ์ ชม.6



น้ำท่วม 2 วัน พันธุ์ ชม.6



ถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 เมล็ดไม่ออกทั้งในสภาพปกติและสภาพน้ำท่วม รวมถึงในการทดสอบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรกออก สภาวะ PEG 0% และ PEG 15% ก็ไม่ออกเช่นกัน ซึ่งคาดว่าเมล็ดถั่วเหลืองของพันธุ์นครสวรรค์ 1 ที่เก็บเกี่ยวมานั้นเสื่อมสภาพ จึงดำเนินการวิเคราะห์ผลอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสบภาวะน้ำท่วมของถั่วเหลืองจำนวน 19 พันธุ์ทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance ด้วยโปรแกรม IRRI Stat ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่สภาวะน้ำท่วม 0 วัน และ 2 วัน

VARIETY (V)	FLOOD (F)		V-MEAN	DIFF
	0 day	2 days		
CM1	99 a	47 g	73	52 **
CM2	100 a	95 ab	97	5 **
CM3	66 d	75 de	71	-9 ns
CM5	99 a	50 g	74	49 **
CM6	99 a	81 d	90	17 **
CM60	88 bc	84 cd	86	4 ns
CM84-2	99 a	79 d	89	20 **
SJ1	82 c	85 cd	83	-4 ns
SJ2	94 b	77 d	85	17 **
SJ3	82 c	76 de	79	6 ns
SJ4	93 b	52 g	72	42 **
SJ5	99 a	66 ef	82	34 **
Sukothai1	100 a	84 cd	92	16 **
Sukothai2	99 a	64 f	82	35 **
Sukothai3	99 a	65 ef	82	33 **
Srisamrong1	100 a	98 a	99	2 **
Konkaen	92 b	91 bc	91	1 ns
Utsaha-A	88 bc	82 d	85	6 ns
Williams	99 a	58 fg	79	41 **
F-MEAN	93	74	84	19

** = significant at 1% level, ns = not significant

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

CV = 6.45%

จากตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่สภาวะน้ำท่วม 0 วัน และ 2 วัน (ตารางที่ 2) พบว่าถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วมแตกต่างกัน โดยสภาวะน้ำท่วม 0 วันซึ่งเป็นกรณีควบคุมนั้น เมล็ดถั่วเหลืองไม่ถูกน้ำท่วมก่อนการเพาะ ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกในช่วง 66-100 เปอร์เซ็นต์โดยถั่วเหลืองที่มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกในช่วง 91-100 เปอร์เซ็นต์มีจำนวน 14 พันธุ์ และถั่วเหลืองที่มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์มีจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 60 (CM60) พันธุ์อุตสาหะ-เอ (Utsaha-A) พันธุ์ สจ.1 (SJ1) พันธุ์ สจ.3 (SJ3) และ พันธุ์เชียงใหม่ 3 (CM3) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก 88, 88, 82, 82 และ 66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พันธุ์เหล่านี้พบว่ามี hard seed อยู่จำนวนมาก ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ

สำหรับสภาวะน้ำท่วม ซึ่งคณะผู้วิจัยได้สร้างสภาวะให้เมล็ดถั่วเหลืองจมอยู่ในน้ำเป็นเวลา 2 วันจากนั้นนำมาเพาะทดสอบ จากตารางที่ 2 พบว่า พันธุ์ถั่วเหลืองส่วนใหญ่ตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วม กล่าวคือ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงจากกรณีควบคุม (สภาวะน้ำท่วม 0 วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นถั่วเหลือง 6 พันธุ์ ดังนี้ พันธุ์เชียงใหม่ 3 (CM3) พันธุ์เชียงใหม่ 60 (CM60) พันธุ์ สจ.1 (SJ1) พันธุ์ สจ.3 (SJ3) พันธุ์ขอนแก่น (Konkaen) และพันธุ์อุตสาหะ-เอ (Utsaha-A)

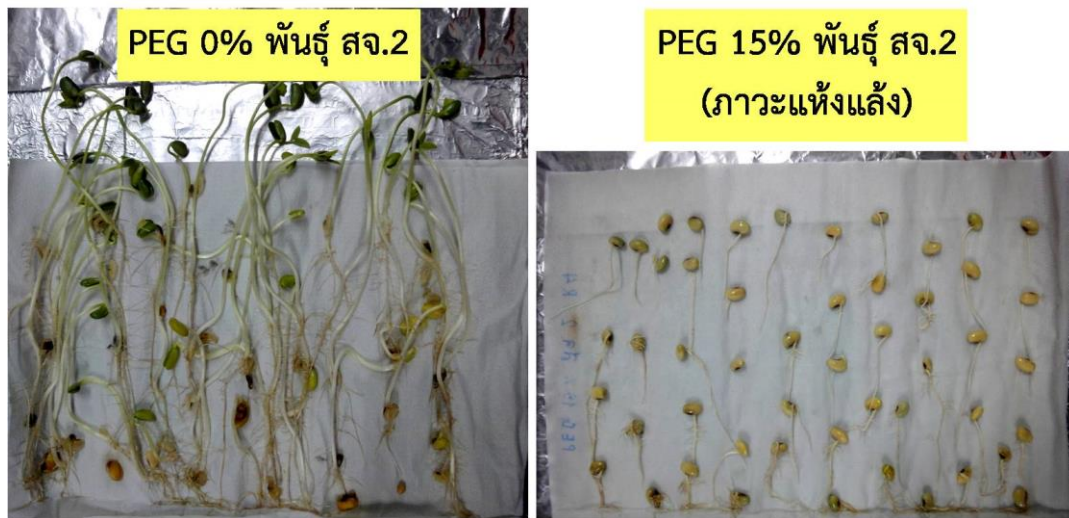
นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วมแตกต่างกัน กล่าวคือ ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกในช่วง 47-98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุด ใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 (Srisamrong1) พันธุ์เชียงใหม่ 2 (CM2) และพันธุ์สุโขทัย 1 (Sukothai1) มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก 98, 95 และ 84 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุด ใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 (CM1) พันธุ์เชียงใหม่ 5 (CM5) และพันธุ์ สจ.4 (SJ4) มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก 47, 50 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่ไม่ต้องการน้ำมาก การได้รับน้ำปริมาณมากเกินไปจนความจำเป็นทั้งก่อน หลัง หรือขณะที่เมล็ดกำลังงอกจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเมล็ดและต้นอ่อน เช่น เมล็ดไม่งอก การสลายตัวของเมล็ด (seed decay) และการเจริญเติบโตที่ไม่สมบูรณ์ของต้นอ่อน (unhealthy seedling development) ซึ่งจะส่งผลต่อเนื่องทำให้ผลผลิตลดลงในที่สุด (Sayama *et al.*, 2009) การศึกษาพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมในระยะแรกงอกจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในพื้นที่ที่มีฝนตกมากในช่วงปลูกถั่วเหลือง รวมถึงเป็นการรองรับปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลกอีกด้วย

3. การทดสอบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรกงอก

ดำเนินการตามวิธีของ Rasaei *et al.* (2013) โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) เป็นสารดูดความชื้นหรือสารชักนำให้เกิดสภาพแห้งแล้งในกระตาดเพาะ ตรวจสอบและเก็บข้อมูลอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสพภาวะแห้งแล้ง (อัตราการงอกหลังประสพภาวะแห้งแล้ง) 5 วันหลังปลูกและ 8 วันหลังปลูก (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 การทดสอบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรงอกโดยใช้ PEG (8 วัน หลังปลูก)



เมื่อวิเคราะห์ผลอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสบการณ์แห้งแล้ง 5 วันหลังปลูกของถั่วเหลืองจำนวน 19 พันธุ์ ทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance ด้วยโปรแกรม IRRI Stat ได้ผลดังตารางที่ 3 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่ระดับ PEG 0% และ 15% พบว่า ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อ PEG แตกต่างกันในแต่ละระดับ โดย PEG 0% เป็นกรณีควบคุมซึ่งไม่มี PEG ในกระดาดเพาะ ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกในช่วง 70-100 เปอร์เซ็นต์ โดยถั่วเหลืองที่มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกในช่วง 91-100 เปอร์เซ็นต์มีจำนวน 14 พันธุ์ และถั่วเหลืองที่มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์มีจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ สจ.1 (SJ1) พันธุ์อุตสาหะ-เอ (Utsaha-A) พันธุ์ เชียงใหม่ 60 (CM60) พันธุ์ สจ.3 (SJ3) และพันธุ์เชียงใหม่ 3 (CM3) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก 86, 78, 73, 72 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกของถั่วเหลืองที่สภาวะน้ำท่วม 0 วันซึ่งเป็นกรณีควบคุมในการทดสอบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วม

สำหรับ PEG 15% เป็นการสร้างสภาพแห้งแล้งให้แก่พืช เนื่องจาก PEG ทำให้เกิดการดูดน้ำออกจากเซลล์พืช จากตารางที่ 3 พบว่า พันธุ์ถั่วเหลืองส่วนใหญ่ตอบสนองต่อ PEG 15% และมีเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกลดลงจากกรณีควบคุม PEG 0% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถกล่าวได้ว่าสภาพแห้งแล้งส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของถั่วเหลืองลดลง ยกเว้นถั่วเหลือง 3 พันธุ์ ดังนี้ พันธุ์เชียงใหม่ 60 (CM60) พันธุ์ สจ.3 (SJ3) และพันธุ์ขอนแก่น (Konkaen) นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อ PEG 15% แตกต่างกัน กล่าวคือ ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกในช่วง 14-96 เปอร์เซ็นต์ซึ่งพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุดใน 3 อันดับแรก

ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 (Srisamrong1) พันธุ์เชียงใหม่ 2 (CM2) และพันธุ์สุโขทัย 1 (Sukothai1) มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก 96, 92 และ 91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุดใน 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 (CM1) พันธุ์เชียงใหม่ 84-2 (CM84-2) และพันธุ์เชียงใหม่ 6 (CM6) มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก 14, 45 และ 48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 5 วันหลังปลูกของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่ระดับ PEG 0% และ 15%

VARIETY (V)	PEG (P)		V-MEAN	DIFF
	0%	15%		
CM1	97 bc	14 h	55	83 **
CM2	100 ab	92 ab	96	8 **
CM3	70 f	50 fg	60	20 **
CM5	98 abc	54 fg	76	44 **
CM6	100 ab	48 fg	74	51 **
CM60	73 f	63 ef	68	10 ns
CM84-2	99 ab	45 g	72	54 **
SJ1	86 de	61 ef	73	25 **
SJ2	93 cd	80 d	86	12 **
SJ3	72 f	63 ef	68	9 ns
SJ4	91 cd	74 de	82	17 **
SJ5	96 bc	80 d	88	16 **
Sukothai1	99 ab	91 abc	95	8 **
Sukothai2	99 ab	82 cd	90	17 **
Sukothai3	96 bc	73 de	85	23 **
Srisamrong1	100 a	96 a	98	4 **
Konkaen	91 cd	83 bcd	87	8 ns
Utsaha-A	78 ef	64 ef	71	14 *
Williams	100 a	50 fg	75	50 **
P-MEAN	91	66	79	25

** = significant at 1% level, * = significant at 5% level
ns = not significant

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

CV = 8.72%

เมื่อวิเคราะห์ผลอัตราการมีชีวิตรอดหลังประสบการณ์แห้งแล้ง 8 วันหลังปลูกของถั่วเหลืองจำนวน 19 พันธุ์ ทางสถิติโดยใช้วิธี Analysis of variance ด้วยโปรแกรม IRRI Stat ได้ผลดังภาคผนวกตารางที่ 1 พบว่า ความแตกต่างระหว่างเปอร์เซ็นต์ความงอกของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่ระดับ PEG 0% และ 15% ณ 8 วันหลังปลูกมีน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างที่พบ ณ 5 วันหลังปลูก (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามจากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่า แม้ถั่วเหลืองงอกได้เมื่ออยู่ในสภาวะ PEG 15% ณ 8 วันหลังปลูก แต่การเจริญเติบโตช้ากว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในสภาวะ PEG 0% สามารถกล่าวได้ว่า นอกจากสภาพแห้งแล้งจะส่งผลทางลบต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของถั่วเหลืองแล้ว ยังส่งผลทางลบต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองอีกด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Rasaei *et al.* (2013) ที่ความยาวของรากที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกในสภาวะ PEG 13.8% (Osmotic potential -3 bar) สั้นกว่าความยาวของรากที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกในสภาวะ PEG 0% (Osmotic potential 0 bar)

เมื่อคำนวณหาค่าความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอกในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า $R = 0.53^*$ และค่า $R^2 = 0.28^*$ กล่าวคือ พันธุ์ถั่วเหลือง

ที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมีแนวโน้มที่จะมีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมด้วย ขณะเดียวกัน พันธุ์ถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อสภาพแห้งแล้งมีแนวโน้มที่จะอ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมเช่นกัน ดังผลการทดลองที่พันธุ์ศรีสำโรง 1 (Srisamrong1) พันธุ์เชียงใหม่ 2 (CM2) และพันธุ์สุโขทัย 1 (Sukothai1) เป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุด ใน 3 อันดับแรก รวมถึงเป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุด ใน 3 อันดับแรกด้วย สำหรับพันธุ์เชียงใหม่ 1 (CM1) นั้นเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุดและเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุดด้วย Fukao *et al.* (2011) รายงานความเชื่อมโยงระหว่างระบบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งและระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วม โดยมียีน *SUBMERGENCE1A (SUB1A)* เป็นจุดเชื่อมระหว่าง 2 ระบบดังกล่าว ยีน *SUB1A* เป็น Transcription factor ชนิดหนึ่งที่ควบคุมปริมาณฮอร์โมนเอทิลีนซึ่งส่งผลต่อการยืดยาวของลำต้นพืชในสภาพน้ำท่วม นอกจากนี้ยีน *SUB1A* ยังทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ทำงานในระบบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งอีกด้วย กล่าวได้ว่าระบบความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งและระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมีสัญญาณแทรกข้ามระหว่างกัน (crosstalk) ในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลของน้ำภายในเซลล์

ความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองกับความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของ ถั่วเหลืองระยะแรกงอก และความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอก ณ 5 วันหลังปลูกนั้น เมื่อคำนวณหาค่าความสัมพันธ์แล้วพบว่า ขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองไม่มีความสัมพันธ์กับความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรกงอกหรือความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่าความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองกับความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองระยะแรกงอก ณ 5 วันหลังปลูก ค่า $R = -0.44$ และค่า $R^2 = 0.20$ สำหรับค่าความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอก ณ 5 วันหลังปลูก ค่า $R = -0.27$ และค่า $R^2 = 0.07$ อย่างไรก็ตาม Sayama *et al.* (2009) รายงานความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอก ณ 3 วันหลังปลูก โดยค่า $R = -0.62^{***}$ (Significant at 0.1% level) กล่าวคือ เมล็ดถั่วเหลืองที่มีขนาดเล็กมีแนวโน้มที่จะมีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมในระยะแรกงอกสูง แม้ว่าในงานวิจัยนี้ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอก ณ 5 วันหลังปลูก ปรากฏผลว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่า R ที่ได้เป็นค่าลบเช่นเดียวกับรายงานของ Sayama *et al.* (2009) นอกจากนี้ Duke *et al.* (1986) รายงานว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่มีขนาดใหญ่จะมีเปลือกที่ไม่แข็งแรง ซึ่งส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ จากเมล็ดถั่วเหลือง (seed substance leakage) ได้ง่ายเมื่อเมล็ดถั่วเหลืองดูดซึมน้ำเข้าไป (water imbibition) เมล็ดถั่วเหลืองดังกล่าวจึงขาดสารอาหารหรือสารที่จำเป็นต่างๆที่จะใช้ในการงอกและเจริญเติบโต

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมแตกต่างกัน พันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 (Srisamrong1) พันธุ์เชียงใหม่ 2 (CM2) และพันธุ์สุโขทัย 1 (Sukothai1) และพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 (CM1) พันธุ์เชียงใหม่ 5 (CM5) และพันธุ์ สจ.4 (SJ4) การศึกษาพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมในระยะแรกงอกจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในพื้นที่ที่มีฝนตกมากในช่วงปลูกถั่วเหลือง รวมถึงเป็นการรองรับปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลกอีกด้วย

2. ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งแตกต่างกัน พันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 (Srisamrong1) พันธุ์เชียงใหม่ 2 (CM2) และพันธุ์สุโขทัย 1 (Sukothai1) และพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 (CM1) พันธุ์เชียงใหม่ 84-2 (CM84-2) และพันธุ์เชียงใหม่ 6 (CM6)

3. ความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งกับความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองระยะแรกงอกมีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ พันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมีแนวโน้มที่จะมีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมด้วย ขณะเดียวกันพันธุ์ถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อสภาพแห้งแล้งมีแนวโน้มที่จะอ่อนแอต่อสภาพน้ำท่วมเช่นกัน

4. ผลจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าถั่วเหลืองพันธุ์รับรองพันธุ์ที่เหมาะสมต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งที่เกิดขึ้นในช่วงปลูกถั่วเหลืองรวมถึงระยะแรกงอก สามารถนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรให้ปลูกในพื้นที่ที่ประสบปัญหาดังกล่าวได้

5. การต่อยอดงานวิจัยนี้โดยการศึกษาสารพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมหรือสภาพแห้งแล้ง (ภาคผนวกตารางที่ 2) และการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมหรือสภาพแห้งแล้ง จะเป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งของถั่วเหลืองในระดับยีน รวมถึงสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งไปใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในอนาคต

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยของโครงการ (output) ประกอบด้วย

1. ได้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ในทุเรียนที่พัฒนาจากเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (NGS) จำนวน 11,156 คู่ไพรเมอร์ และ มีจำนวน 17 คู่ ที่ได้ผ่านการทดสอบแล้วว่าให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และใช้เป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ทุเรียน
2. ได้วิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล พบว่า ไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยแสดงแถบดีเอ็นเอเฉพาะในต้นตัวผู้มีขนาด 450 เบส
3. ได้ไพรเมอร์ *rbcl* และ *matK* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 30 สายพันธุ์
4. ได้ไพรเมอร์ *umc2037* *bnlg1233* และ *bnlg1607* ที่ทำให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอต่อโรคและข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด
5. ได้ข้อมูลความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ โดยพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 พันธุ์เชียงใหม่ 2 และพันธุ์สุโขทัย 1 สำหรับสภาพแห้งแล้งโดยใช้สาร Polyethylene glycol (PEG) พันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ พันธุ์ศรีสำโรง 1 พันธุ์เชียงใหม่ 2 และพันธุ์สุโขทัย 1

ข้อเสนอแนะ (outcome) ที่นำผลผลิตไปใช้

1. นำเครื่องหมายโมเลกุล SSR ของทุเรียนที่พัฒนาได้สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของทุเรียนที่เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่ปลูกในพื้นที่ต่างกัน และแต่มีชื่อเรียกต่างกันได้ และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน อีกทั้งยังประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์
2. นำวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ไปใช้ตรวจต้นกล้าอินทผลัมในประเทศไทย ให้รวดเร็วยิ่งขึ้น เพื่อแยกเพศเมียออกจากเพศผู้ และตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการตรวจเพศอินทผลัมในระดับต้นกล้า
3. นำไพรเมอร์ *rbcl* และ *matK* ไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ได้
4. นำโดยเครื่องหมายโมเลกุล *umc2037* *bnlg1233* และ *bnlg1607* ไปตรวจสอบกับข้าวโพดพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการทดสอบเพื่อ

ยืนยันผลของเครื่องหมายโมเลกุลนี้กับประชากรข้าวโพดที่ต้องการนำมาศึกษาก่อนที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลนี้ไปใช้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

5. นำข้อมูลการทนต่อสภาพน้ำท่วมและสภาพแห้งแล้งโดยใช้สาร Polyethylene glycol (PEG) ที่เกิดขึ้นในช่วงปลูกถั่วเหลืองรวมถึงระยะแรกกอก ไปเผยแพร่แก่เกษตรกรให้ปลูกในพื้นที่ที่ประสบปัญหาดังกล่าวได้

บรรณานุกรม

การทดลองที่ 1

กรมวิชาการเกษตร. 2556. การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ทุเรียนพื้นเมือง จังหวัดนนทบุรี. 2556.

กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง อลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2556. การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำแนกพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองจังหวัดนนทบุรี. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ ประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เรื่อง การบริหารงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออาหาร พลังงาน และการอนุรักษ์ วันที่ 28-30 สิงหาคม 2556 ณ โรงแรม ชารามันตรา ชะอำ รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

ประสาน สืบสุข ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ กุหลาบ คงทอง กิ่งกาญจน์ พิษณุกุล และพิเชษฐ์ ฤกษ์ดลยอมมา. 2554. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดทนแล้ง. หน้า 454-459. ใน: การประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35 วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554. ณ โรงแรมมารวย การ์เด็น กรุงเทพฯ.

ปิรัชฎ์ เจริญทรัพย์ ฐิตาภรณ์ ภูมิชัย อินทิรา จารุเพ็ง อรชร โชติญาณวงษ์ ประไพ โมจรินทร์ พรชัย จุฑามาศ. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนโดยใช้เทคนิคโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์. การประชุมพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16, 12-16.

ศศิวิมล แสวงผล สมศรี เจริญเกียรติกุล และจตติ โตยิ้ม. 2555. รายงานการวิจัยการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมทุเรียนและภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวสวนทุเรียนในประเทศไทยตามแนวทางของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี: กรณีศึกษาจังหวัดนนทบุรี สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 311 หน้า.

ฤทัยชนก กิตติวิโรดม. 2554. การตรวจสอบพันธุ์ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อลิษา วิลันโท อรณัฐ ประดิษฐ์ทรัพย์ วรณวิสาข์ เจริญฉิม ศุภศักดิ์ กุลวงศ์อนันชัย อนันต์ชัย อัครเมฆิน และศิษณุศ ทองสีมา. 2012. เทคโนโลยีเอ็นจีเอสและการประยุกต์ในงานวิจัยโอมิกส์. Thai J. Genet. 5(2): 104-129.

- โองการ วณิชาชีวะ และ ศรีสมร วนกรกุล. 2554. การจำแนกทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรีโดยเทคนิคอาร์เอฟดี. วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์บัณฑิต, มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร.
- Santoso, P. J. 2004. Morphological and molecular assessment of durian germplasm in Malaysia. Master's Thesis, University of Putra Malaysia, Malaysia.
- Tautz, D. and Renz, M. 1984. Simple sequence repeats are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucl. Acids Res 12: 4127-4138.

การทดลองที่ 2

- จารุฉัตร เชนยทิพย์. 2558. วิจัยและพัฒนาพันธุ์อินทผลัม. รายงานโครงการวิจัย กรมวิชาการเกษตร. 26 หน้า.
- นพรัตน์ อินตา, กวี สุจิตฺติ, ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์ และ พีระศักดิ์ ฉายประสาธ. 2558. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกเพศอินทผลัมไทย (แม่โจ้36). วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 33 ฉบับพิเศษ 1 การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 14 “พืชสวนไทยไร้พรมแดน”. หน้า 68-73.
- วีรพันธ์ นิลวัตร. 2556. การปลูกอินทผลัม สไตล์ไทยไทย. ศูนย์ปฏิบัติการชาวเกษตร สำนักงานเกษตรจังหวัดนราธิวาส ศูนย์ราชการ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส. 3 หน้า.
- หทัยรัตน์ อุไรรงค์, อรรรัตน์ วงศ์ศรี และนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. 2560. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 35 ฉบับที่ 2. หน้า 1-8.
- อรุณทัย ชาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.
- Al-Mohmoud M.E., E.K. Al-Dous. E.K. Al-Azwani and J.A. Malek. 2012. DNA-based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender. American Journal of Botany. e7-e10
- Billotte, N., N. Marseillac, P. Brottier, J.L. Noyer, J.P. Jacquemoud-Collet, C. Moreau, T. Couvreur, M.H. Chevallier, J.C. Pintaud and A.M. Risterucci. 2004. Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.):

- characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Molecular Ecology Notes* 4: 256-256.
- Cherif E., S. Zehdi, K. Castillo, N. Chabrilange, S. Abdoukader, J.C. Pintaud, S. Santoni, A. Salhi-Hannachi, S. Glemin and F. Aberlenc-Bertossi. 2012. Male-specific DNA markers provide genetic evidence of XY chromosome system, a recombination arrest and allow the tracing of paternal lineages in date palm. *New Phytologist* 197: 409-415.
- Elmeer K. and I. Mattat. 2012. Marker-assisted sex differentiation in date palm using simple sequence repeats. *Biotech* 2: 241-247.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Worldwide dates production statistics. Last update 15 December 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Khanam S., A. Sham, J.L. Bennetzen and M.A.M. Aly. 2012. Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Australian Journal of Crop Science* 6(8): 1236-1244.
- Lehmensick, A., M.W. Sutherland and R.B. McNamora. 2008. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 117:721–728.
- Marsafari M. and A.A. Mehrabi. 2013. Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR and RAPD markers. *Australian Journal of Crop Science* 7(8): 1160-1166.
- Wellmann A.P., A.H. Escobar and D.V. Johnson. 2007. Date palm cultivation in Chile and Peru (South America): current status and future prospects for development. *Acta Hort* 736: 71-85.
- Wrigley G. 1995. Date palm, *Phoenix dactylifera*. In: Smartt J, Simmonds NW (eds), *Evolution of crop plants*, 2nd ed. Longman, London: pp. 399-403.
- Yu, F., H. Harada, K. Yamasaki, S. Okamoto, S. Hirase, Y. Tanaka, N. Misaw and R. Utsumi. 2008. Isolation and functional characterization of a β -eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *FEBS Letters* 582(5): 565-572.

- Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM (2003). Identification of Pistachio (*Pistachio vera* L.) Nuts with microsatellite markers. Amer Soc Hort Sci. 128: 898-903.
- Edwards KJ, Barker JH, Daly A, Jones C, Karp A (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. Biotechniques. 20: 758-760.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: A Review Mol Ecol.
- Zhao w, Miao X, Jia S, Pan Y, Huang Y (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus L.* Plant Sci. 168: 51-525.

การทดลองที่ 4

- กัญญณ์ช ศิริธัญญา และ พิมพ์พรรณ เมืองมา. 2557. เทคนิคการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้ แผลใหญ่ และการจำแนกตำแหน่งยีนต้านทานด้วยโมเลกุลเครื่องหมายในข้าวโพด. วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร. 8(1) : 229-240.
- จุฑาพร คำพิลา. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและศึกษาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays* var *ceratina*). วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 207 หน้า.
- อนันต์ชัย อัครเมธิน. 2548. สารน่ารู้เรื่องพันธุศาสตร์ : ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์. สำนักพิมพ์เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1.
- Dingerdissen. A.L., Geiger. H.H., Lee. M., Schecherta. A. and Welz. H.G. 1996. Interval mapping of genes for quantitative resistance of maize to *Setosphaeria turcica*, cause of northern leaf blight, in a tropical environment. Mol. Breed. 2: 143-156.
- Freymark. P.J., Lee. M., Martinson. C.A. and Woodman. W.L. 1994. Molecular marker-facilitated investigation of host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.) Theor. Appl. Genet. 88: 305-313.
- Juthaporn K., Piyada T., Kamol L., Weerasak S., Jirawat S. and Nooduan M. 2008. Identification of RAPD markers for northern corn leaf blight resistance in waxy corn (*Zea mays* var. *ceratina*). Asian Journal of Plant Sciences. 7(1): 18-21.

- Juthaporn K., Kamol L., Weerasak S., Jirawat S., Nooduan M. and Piyada T. 2008. Identification of RAPD and SCAR markers linked to northern leaf blight resistance in waxy corn (*Zea mays* var. *ceratina*). *Euphytica*. 164: 615–625.
- Simcox. K.D. and Bennetzen. J.L. 1993. Mapping the *HtN* resistance gene to the long arm of chromosome 8. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 56: 118-119.
- Wu. B., Yang. E., Khalid. H., Lin.F., Wang. B.Y. and Shi. Z.S. 2010. The analysis of the genotype segregation at SSR loci among double-cross F1 population resistant to northern corn leaf blight and head smut in maize. *Am-Euras J. Agric. & Environ. Sci.* 8(1): 35-39.

การทดลองที่ 5

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุพืช : ถั่วเหลือง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 156 หน้า.
- ศูนย์จัดการความรู้ด้านการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ (Center of Excellence for Climate Change Knowledge Management: CCKM). สภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงกระทบผลผลิตการเกษตร...ปัจจัยต้นทุนราคาอาหารพุ่ง ณ วันที่ 18 พฤษภาคม พ.ศ.2555. (ออนไลน์ <http://www.cckm.or.th/drupal/2012/05/186>) Accessed on April 10, 2014.
- ศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. รายงานสถานการณ์ภัยพิบัติด้านการเกษตร ณ วันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ.2554. (ออนไลน์ http://www.moac.go.th/ewt_dl_link.php?nid=7701&filename=index) Accessed on April 10, 2014.
- ศูนย์ป้องกันวิกฤตน้ำ ศูนย์เมขลา. 2553. รายงานสถานการณ์และคาดการณ์ภัยแล้งของประเทศไทย ประจำปี พ.ศ. 2550. (ออนไลน์ <http://mekhala.dwr.go.yh/main/index.php/2010-04-07-07-00-38/35-2010-09-18-11-55-36/1868--2550>) Posted on September 18, 2010. Accessed on April 10, 2014.
- Duke, S.H., G. Kakefuda, C.A. Henson, N.L. Loeffler and N.M. Van Hulle. 1986. Role of the testa epidermis in the leakage of intracellular substance from imbibing soybean seeds and implications for seedling survival. *Physiol. Plant.* 68: 625–631.
- Fukao, T., E. Yeung and J. Bailey-Serres. 2011. The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *The Plant Cell.* 23: 412–427.

http://www.doa.go.th/fcrc/chiangmai/index.php?option=com_content&view=category&id=39&Itemid=103 Accessed on May 9, 2014.

Rasaei, B., M.E. Ghobadi, M. Khas-Amiri and M. Ghobadi. 2013. Effect of osmotic potential on germination and seedling characteristic of soybean seeds. *Intl J Agri Crop Sci.* 5: 1265-1268.

Sayama, T., T. Nakazaki, G. Ishikawa, K. Yagasaki, N. Yamada, N. Hirota, K. Hirota, T. Yoshigawa, H. Saito, M. Teraishi, Y. Okumoto, T. Tsukiyama and T. Tanisaka. 2009. QTL analysis of seed-flooding tolerance in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Science.* 176: 514–521.

ภาคผนวก

การทดลองที่ 2

การเตรียมสารละลายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็ก

Solⁿ1

30 mM	Tris-HCl pH 8.0
0.1 M	NaCl
0.2 M	Sucrose
10 mM	EDTA

Solⁿ2

400 mM	Tris-HCl pH 9.2
250 mM	EDTA
2.5%	SDS

Solⁿ3 (ปริมาตร 400 ml)

240 ml	(5M KOAC)
46 ml	(96% Acetic acid)
114 ml	(ddH ₂ O)

>DpMale1

AGGTCATGTTGGTCCCGTTATTTTCATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATC
TAGATCAACTTCAGCAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAAGATTGAGATCAAGAGGAT
CGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAGCCTATGA
ATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGCGCCTCTATGAGTA
CGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTCCTAATTTGCTCATCCCTTCTGATATCGA
GTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATTCCTTTTAAAGGTTCTAGCATGTTAGTGATTGA
AGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCTTTTATCCCTGATCCAAAA

ภาพภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MAD ในอินทผลัมต้นตัวผู้

>DpFemale1

AAACATGTCATATGTGCAGGTTTATGTCATGTTGGTCCCGTTATTTTCATTTATGTTTTAGAAAACTTTT
TTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAGCAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGG
GGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACCTTCTGCAAGCGCCGAAAT
GGACTGCTGAAAAAGCCTATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCC
AGCCGGGGCCGCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTCCTAAT
TTGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATTCCTTTTAA
GGTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCTTTTATCCCTGATCCAAA
AA

ภาพภาคผนวกที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MAD ในอินทผลัมต้นตัวเมีย

TGTTATTTTTTTTAAATCATGTCTTTTAGGACTACGTTTTGTGCTACTACTGGCACTATTGGTAGGTCT
 CTCTTTTAAATGATGCATACTAGTTGTATTGAGGCATTAGCACCATAGTAAATTGTCTGAAGAACTTCAT
 TCCTGCCACCACATCGAAGTCATCAACGAGCATTATCTTGAAATCAACCTTACAACCTCCAATTGCCTAG
 GTGCAACTCTACTCCATGAGCTACATCATTAAGGGCTGGGCTTGAGCATTCACTGTCTTCATCTAGCC
 CTTCTCCTTTATCACCTCAACCCCAAGCCATTTTGCCTCATTCAGCTTGATAAAGTTGTATGTTGCACT
 TATGTTGACCATCACATGAGTAGACTTTCCATTGATTTGGGCTTGCCATATATCAAGGTCCTATCTTT
 TGGAGATCCGTGCACCAAGTTAGCCCTCAAGGCATTTAAGTGTGAAGACGACTCATTTGGGTAGCATCC
 TAGTTCTCTCACTCCTCTATTATAGTACTGAGTGCCTCTGATTGGGACAACCCCTTGCCATATGTGGAC
 TATCATATAGAAAGCGGTTACCTCAAGGGTTCTTTTTTCTGTCCAACCTATTTATCTTTTTTGGTGGT
 TTTTTCTCCCACCTTAAGAGTTGTTCCACCCCTTGGGTGTGGCTTTCCCTTCTTGGTTGTTGAGGGT
 GGTTTTGCCAA

ภาพภาคผนวกที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัมต้นตัว

ผู้

CTTCCGTAATTCTTTTTTAAACAGTTATTATGACTCATTTTGCCCTACTACTGGCACTATGGTAGGTCCCTC
 TTTTAAATGATGCATACTAGTTGTATTGAGGCATTACCACCATAGTAAATTGTCTGAAGAACTTCATTC
 CTGCCACCACATCGAAGTCATCAACGAGCATTATCTTGAAATCAACCTTACAACCTCCAATTGCCTAGGT
 GCAACTCTACTCCATGAGCTACATCATTAAGGGCTGGGCTTGAGCATTCACTGTCTTCATCTAGCCCT
 TCTCCTTTATCACCTCAACCCCAAGCCATTTTGCCTCATTCAGCTTGATAAAGTTGTATGTTGCACTTA
 TGTTGACCATCACATGAGTAGACTTTCCATTGATTTGGGCTTGCCATATATCAAGGTCCTATCTTTTTG
 GAGATCCGCACACCAAGTTAGCCCTCAAGGCATTTAAGTGTGAAGACGACTCATTTGGGTAGCATCCCTA
 GTTCTCTCACTCCTCTATTATAGTATTGAGTGCCTCTGATTGGGACAACCCCTTGCCATATGTGGACTA
 TCATATACGAAGCGGTTACCTCAAGGGTTCTTTTTTCTATCCAATCTTATATCTTATGGAGGTTTTTCT
 CCA

ภาพภาคผนวกที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัมต้นตัว

เมีย

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
1	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 2	ผู้*			
2	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 3	ผู้*			
3	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 4	ผู้			
4	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 5	ผู้			
5	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 6	ผู้			
6	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 7	ผู้			
7	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 8	ผู้			
8	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 9	ผู้			
9	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 10	ผู้			
10	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 11	ผู้			
11	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 12	เมีย*			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
12	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 13	เมีย			
13	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 14	เมีย			
14	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 15	เมีย			
15	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 16	เมีย			
16	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 17	เมีย			
17	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 18	เมีย			
18	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 19	เมีย			
19	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 20	เมีย			
20	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 21	ผู้			
21	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 22	เมีย			
22	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 1	ผู้			
23	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 2	ผู้			
24	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 3	ผู้			
25	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 4	ผู้			
26	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 5	ผู้			
27	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 6	ผู้*			
28	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 7	ผู้			
29	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 8	ผู้			
30	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 9	ผู้			
31	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 10	ผู้			
32	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 11	ผู้			
33	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 12	ผู้*			
34	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 13	ผู้			
35	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 14	ผู้			
36	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 15	ผู้			
37	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 16	ผู้*			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพคอินทพลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
38	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 17	ผู้			
39	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 18	ผู้			
40	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 19	ผู้			
41	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 20	ผู้			
42	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 21	เมีย			
43	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 22	เมีย			
44	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 23	เมีย			
45	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 24	เมีย			
46	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 25	เมีย			
47	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 26	เมีย			
48	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 27	เมีย			
49	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 28	เมีย			
50	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 29	เมีย			
51	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 30	เมีย			
52	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 31	เมีย			
53	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 32	เมีย			
54	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 33	เมีย			
55	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 34	เมีย			
56	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 35	เมีย			
57	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 36	เมีย			
58	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 37	เมีย			
59	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 38	เมีย			
60	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 39	เมีย			
61	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 40	เมีย			
62	สวนคุณอนูรัักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 1	ผู้			
63	สวนคุณอนูรัักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 2	เมีย			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพคอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
64	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 3	ผู้			
65	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 4	เมีย			
66	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 5	เมีย			
67	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 6	เมีย			
68	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 7	ผู้			
69	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 8	เมีย			
70	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 9	ผู้			
71	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 10	ผู้			
72	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 11	ผู้			
73	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 12	ผู้			
74	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 13	ผู้			
75	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 14	เมีย			
76	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 15	เมีย			
77	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 16	เมีย			
78	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 17	เมีย			
79	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 18	เมีย			
80	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 19	ผู้			
81	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 20	เมีย			
82	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 21	เมีย			
83	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 22	เมีย			
84	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 23	เมีย			
85	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 24	เมีย			
86	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 25	เมีย			
87	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 26	เมีย			
88	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 27	เมีย			
89	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 28	ผู้			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพคอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
90	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 29	เมีย			
91	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 30	เมีย			
92	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 31	ผู้			
93	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 32	ผู้			
94	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 33	เมีย			
95	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 34	เมีย			
96	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 35	เมีย			
97	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 36	เมีย			
98	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 37	เมีย			
99	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 38	เมีย			
100	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 39	เมีย			
101	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 40	เมีย			
102	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 41	เมีย			
103	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 1	ผู้			
104	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 2	ผู้			
105	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 3	ผู้			
106	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 4	ผู้			
107	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 7	ผู้			
108	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 8	ผู้			
109	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 9	ผู้			
110	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 10	ผู้			
111	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 11	ผู้			
112	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 12	ผู้			
113	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 13	ผู้			
114	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 14	ผู้			
115	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 15	ผู้			







ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพคอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
116	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 16	ผู้			
117	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 17	ผู้			
118	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 18	ผู้			
119	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 19	ผู้			
120	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 20	ผู้			
121	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 21	ผู้			
122	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 22	ผู้			
123	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 23	ผู้			
124	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 24	ผู้			
125	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 25	ผู้			
126	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 26	ผู้			
127	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 27	ผู้			
128	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 28	ผู้*			
129	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 29	ผู้*			
130	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 36	เมีย			
131	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 37	เมีย			
132	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 38	เมีย			
133	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 39	เมีย			
134	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 40	เมีย			
135	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 41	เมีย			
136	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 42	เมีย			
137	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 43	เมีย			
138	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 44	เมีย			
139	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 45	เมีย			
140	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 46	เมีย			
141	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 49	เมีย			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพคอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
142	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 50	เมีย			
143	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 51	เมีย			
144	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 52	เมีย			
145	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 53	เมีย			
146	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 54	เมีย			
147	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 55	เมีย			
148	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 57	เมีย			
149	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 58	เมีย			
150	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 60	เมีย			
151	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 61	เมีย			
152	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 62	เมีย			
153	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 63	เมีย			
154	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 64	เมีย			
155	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 65	เมีย			
156	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 66	เมีย			
157	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 67	เมีย			
158	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 68	เมีย			
159	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 69	เมีย			
160	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 70	เมีย			
161	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 71	เมีย			
162	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 72	เมีย			
163	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 74	เมีย			
164	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 75	เมีย			
165	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 76	เมีย			
166	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 77	เมีย			
167	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 78	เมีย			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพรเมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
168	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 79	เมีย			
169	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 80	เมีย			

หมายเหตุ: *เพศกับเครื่องหมายโมเลกุลไม่ตรงกัน

การทดลองที่ 3

ไพรเมอร์ SSR Vandbido ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า

Primer	Forward primer	Reverse primer	Tm (°c)
Vandbirdo_002	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	55
Vandbirdo_003	TGCACTCCCCCTTAGGTGAT	CGAGGCATTTTTGTCCTGGC	60
Vandbirdo_005	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	ACGAACCGAACAGGCTTATG	55
Vandbirdo_006	ATTCGAAGCTTGGGGTCTCT	GATTTTAGACACGGGCCAGA	55
Vandbirdo_007	CAAGCTTCGGATCAACCCTA	GAGGTGCTTGGCATATTCGT	60
Vandbirdo_008	CTGGGTCCAAAACCTTTGA	CTTGGCTTCCCAATAAACCA	59
Vandbirdo_011	CCCAGTGGACATAAGCCTGT	CCAGGGAGTAACGAGCTTGA	60
Vandbirdo_013	TACTCGAAGCTTGGGGTCTC	TAGAGACACGGGCCAGAGAT	59
Vandbirdo_015	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60
Vandbirdo_016	TTGGAATCAGAGCCTGCATA	CCAAGAAACCTGCGACAAAT	60
Vandbirdo_020	AGAGTGTGGGGCAAGAGAGA	CTTCGGATCCTCATCACACA	60
Vandbirdo_022	GCAACTGGTCCAGAACCTTG	CTTTGTTTTAGGGCGACTGC	60
Vandbirdo_023	CGAAGAGATCCTCCTGTTGC	TTTGTCCGGTCATTAGTCA	60
Vandbirdo_026	TCGCCGAGCTTTAGGTAGAA	TCATCACCTCCATCCTCCTC	60
Vandbirdo_030	TCTCAAATCCTGCGACTCC	CCTGGCAGCAGAAAAGGTTA	60
Vandbirdo_031	GAGAGAGAAAGGGAGCAGGAG	GGTCCCAACCTCTTCCAATC	60
Vandbirdo_041	CATGCTTTGAGTTGGGAGGT	ACCTGGACGGCAAATAATGA	60
Vandbirdo_046	TGTTGCAACGAACAGGTCAC	TGTCCTGGCTGGTTTAGAGG	60
Vandbirdo_049	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60
Vandbirdo_055	CTCATATGCAAGGGGAGAA	CCAAGCTTCGATCGTCTCTC	60
Vandbirdo_059	ATTTGGCGTCCAGGTGATAG	ATCCGTTTCCACGGTATGAG	60

Vandbirdo_063	GGTTGTTTGGGAGACACCAC	CATCCCCATCAGCTCATTCT	60
Vandbirdo_064	ATGGCCATAGCTGTTTCCTG	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60
Vandbirdo_094	TCGAACCGTAGACCTTCTCG	CCAAGCTTCGGATCAGGATA	60

ไพรเมอร์ SSR Vandbido ตัดสีฟลูออเรสเซนซ์

Primer	Forward primer	Reverse primer	Tm (°c)
Vandbirdo_022	GCAACTGGTCCAGAACCTTG	CTTTGTTTTAGGGCGACTGC	60
Vandbirdo_026	TCGCCGAGCTTTAGGTAGAA	TCATCACCTCCATCCTCCTC	60
Vandbirdo_094	TCGAACCGTAGACCTTCTCG	CCAAGCTTCGGATCAGGATA	60

การทดลองที่ 5

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอก ณ 8 วันหลังปลูกของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่ระดับ PEG 0% และ 15%

VARIETY (V)	PEG (P)		V-MEAN	DIFF
	0%	15%		
CM1	99 ab	74 f	86	65 **
CM2	100 ab	99 ab	100	0 ns
CM3	79 ef	65 gh	72	24 **
CM5	100 ab	73 fgh	86	27 **
CM6	100 a	61 h	80	39 **
CM60	80 ef	78 efg	79	2 ns
CM64-2	100 ab	73 fgh	87	26 **
SSJ1	89 de	74 fgh	81	15 **
SSJ2	93 cd	91 cd	92	1 ns
SSJ3	77 f	75 fgh	76	2 ns
SSJ4	91 cd	90 cd	91	1 ns
SSJ5	97 bc	91 cd	94	6 ns
Sukothai1	95 ab	96 bc	98	3 ns
Sukothai2	100 ab	92 cd	96	18 **
Sukothai3	98 abc	85 def	91	12 **
Srisamrong1	100 a	100 a	100	0 ns
Konkaen	93 cd	89 cde	91	4 ns
Utsaha-A	84 def	79 efg	82	5 ns
Williams	100 a	66 gh	83	34 **
P-MEAN	94	80	87	14

ns = not significant
 * = significant at 5% level, ** = significant at 1% level
 In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.
 CV = 7.97%