



รายงานโครงการวิจัย

การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

The Utilization of Biotechnology to Develop Plant
Varieties Microorganism and Products.

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล

Mrs.Rungnapa Phitaktansakul

ปี พ.ศ. 2558

สารบัญ

	หน้า
ผู้วิจัย	1
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	11
บทคัดย่อ	13
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	16
บรรณานุกรม	19
เรื่องเต็มของกิจกรรมงานวิจัย	22

นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**การทดลองที่ 1.5 คัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอล
โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ**

หัวหน้าการทดลอง นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน นางสาวภรณ์ สว่างศรี สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางบุญเรือนรัตน์ เรื่องวิเศษ สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**การทดลองที่ 1.6 การศึกษาแบคทีเรียและเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายชีวมวล
เพื่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ**

**การทดลองย่อยที่ 1.6.1 การศึกษาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายเยื่อใยจาก
ชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ**

หัวหน้าการทดลอง นางสาวภรณ์ สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางบุญเรือนรัตน์ เรื่องวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวมัทนา ศรีหัตถกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**การทดลองย่อยที่ 1.6.2 การศึกษาเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอ็นไซม์ไฮไลเนสและการโคลนยีน
ไฮไลเนสเพื่อการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ**

หัวหน้าการทดลอง นางบุญเรือนรัตน์ เรื่องวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน นางสาวภรณ์ สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสุภาวดี จ้อเหรียญ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**การทดลองที่ 1.7 การศึกษาการโคลนยีน การแสดงออกของยีน และการผลิตโปรตีนด้านการเกิดผลึก
น้ำแข็งจากแบคทีเรีย**

หัวหน้าการทดลอง นางสาวมัทนา ศรีหัตถกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน นางสาวอรุณทัย ชาววา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นายศรีเมฆ ชาวโพพงพาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 1.8 การศึกษาเทคโนโลยีเบื้องต้นในการผลิตไบโอเอทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็ก
 หัวหน้าการทดลอง นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 ผู้ร่วมงาน นางสาวภรณ์ สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 1.9 การดัดแปลงพันธุกรรมของ ยีน YAP1 ในยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักเอทานอล

หัวหน้าการทดลอง นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 ผู้ร่วมงาน 1. นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 2. นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลอง 1.10 การจำแนกเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. จากยีนโคติเนสด้วยเทคนิคซีวโม่เลกุล
 หัวหน้าการทดลอง นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ. สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 ผู้ร่วมงาน นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 นางสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.
 นางสาวจีรภา ปัญญศิริ สังกัดศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
 แห่งชาติ

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาและพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม

ประกอบด้วย การทดลอง 1 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 2 การควบคุมการแสดงออกของยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัว

หัวหน้าการทดลอง นางสาวกุหลาบ คงทอง สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 ผู้ร่วมงาน นายประสาน สืบสุข สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 นางกัลยา เกาะกากลาง สังกัดศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง
 นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์ สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กิจกรรมที่ 3 การใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

ประกอบด้วยการทดลอง 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา

หัวหน้าการทดลอง	นายประสาน สืบสุข	สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวกุหลาบ คงทอง	สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวกรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข	สังกัดศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา
	นางสาวรัชณี รัตนวงศ์	สังกัดศูนย์วิจัยยางหนองคาย
	นางสาวจิราพร แก่นทรัพย์	สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 3.2 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

หัวหน้าการทดลอง	นายประสาน สืบสุข	สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวกุหลาบ คงทอง	สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายกิตติภพ วายุภาพ	ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท
	นางสาวจิราพร แก่นทรัพย์	สังกัดสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กิจกรรมที่ 4 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ประกอบด้วยการทดลอง 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดเรืองแสง

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาววรภาพร ไชยมา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 4.2 การประเมินลักษณะทางพันธุกรรมองุ่นโดยใช้เทคนิค DNA Fingerprint และการจัดทำฐานข้อมูล (Database)

หัวหน้าการทดลอง	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวภรณ์ สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางอัครชาพรรณ กวางแก้ว	ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร

**การทดลองที่ 4.3 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการประเมินลักษณะ และตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์
ของกล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย**

**การทดลองย่อยที่ 4.3.1 การรวบรวม อนุรักษ์ และตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารี
ในประเทศไทย**

หัวหน้าการทดลอง นายบุญกุล อ่อนน้อม	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก
ผู้ร่วมงาน นางสาวอรุณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางกุลธิดา ดอนอยู่ไพร	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก
นางเยาวภา เต้าชัยภูมิ	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์
นางวิลาวรรณ ไชยบุตร	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก

**การทดลองย่อยที่ 4.3.2 การจัดทำสายพิมพ์ดีเอ็นเอและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจ
เอกลักษณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย**

หัวหน้าการทดลอง นางสาวอรุณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน นางสาวศิริลักษณ์ อินทวงค์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นายบุญกุล อ่อนน้อม	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก
นางบุญเรือนรัตน์ แก้ววิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นายประสาน สืบสุข	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

- สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถนนรังสิต-นครนายก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110 โทร (02)9046885-95 โทรสาร (02)-9046885-95 ต่อ 555
- สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

การถ่ายยีน, หน้าวัว, อนุ๋น, ข้าวโพดข้าวเหนียว, สาหร่าย, ยีนควบคุมสีดอก, เซลลูเลส, ซีวมวล, เห็ด, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, เชื้อแบคทีเรีย, ราเขียว, สันฐานวิทยา, ไลเปส, การแสดงออกของยีน, การแยกและการสกัดไลเปส, คุณลักษณะของไลเปส, ไบโอดีเซล, โคติเนส, ไบโเอทานอล, พืชพลังงาน, พลังงานทดแทน, ยางพารา, อนุ๋น, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ไชลานเนส, ซีวมวล, ไชแลน, เฮมิเซลลูโลส, เครื่องหมายโมเลกุล, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, กล้ายไม้ร่องเท้านารี

cellulases, cellulosic ethanol, biomass, lignocellulose, bioactive compounds, antifungal, edible mushrooms, purification, phytopathogenic fungi, plant disease control, straw mushroom, *Valvariella valvacea*, microalgae, ethanol, biomass, biofuel, SNP, CAPS, SSR, SSCP, HRB, xylanase, xylan, hemicelluloses, cellulosic ethanol, biomass, lignocellulose, Cellulose, Hemicellulose, Cellulolytic-Xylanolytic enzyme, antifreeze protein, gene cloning, over expression, antifreeze protein production, *Metharhizium*, *Paphiopedilum* sp., Morphology, Genetic diversity, Molecular markers, Cellulose, Cellulosic ethanol, Lignocellulosic biomass, Sugar, Ethanol, YAP, 5-(hydroxythyl)-2-furancarbaldehyde; 5-(hydroxymethyl)-2-furfural; HMF, HMF, Arming yeast . Cell surface display, Lignocellulase, DNA Fingerprint Microsatellite, Genetic diversity, Molecular markers

บทนำ

ปัจจุบันงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มีบทบาทสำคัญต่อการวิจัยและพัฒนาทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถลดระยะเวลาได้เร็วกว่าวิธีปกติ (conventional breeding) ดังนั้นจึงมีการนำเอาเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งให้ผลแม่นยำ และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อการปรับปรุงโครงสร้างภายในเซลล์ให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สายพันธุ์ใหม่ หรือที่เรียกว่าเทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) นอกจากนี้ เทคโนโลยีโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular markers) สามารถเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งจะช่วยให้ปรับปรุงพันธุ์ใหม่ได้ตามต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์

การรวบรวม พัฒนาสายพันธุ์ สารสำคัญ และผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย เนื่องจากปัจจุบันนี้พืชเป็นโรคซึ่งมีสาเหตุจากการเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรคพืช (ไวรัส, แบคทีเรีย และรา) ส่งผลกระทบต่อการเพาะปลูก ตลอดจนเกิดความเสียหายหรือการลดลงของคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตร การจัดการและควบคุมปัญหาที่เกิดขึ้นอาศัยการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเป็นหลัก (Agrios, 2005) สาร antifungal เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัว ที่ผลิตในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สามารถพบทั้งในพืช สัตว์ และรา ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันหรือต่อต้านการเข้าทำลายจากเชื้อสาเหตุของโรค (Ngai and Ng, 2003) ปัจจุบันมีรายงานมากมายถึงการศึกษเกี่ยวกับสาร antifungal ที่ได้มาจากพืช ในขณะที่พบรายงานการศึกษาถึงสารเหล่านี้มีน้อยมากในเห็ด (Wang and Ng, 2004) ดังนั้นการศึกษาและค้นหาสาร antifungal จากเห็ดกินได้ (edible mushrooms) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นสิ่งที่ควรให้ความสนใจเพื่อนำสารที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการจัดการเชื้อสาเหตุของโรคพืช ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกัน กำจัดหรือลดความเสียหายของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค อีกทั้งยังลดผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการใช้สารเคมีในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ โคตินเนสในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา เห็ด เอคติโนมายซีส แมลง พืช และสัตว์ (Tsuji et al., 1998) โคตินเนสแต่ละชนิดมี catalytic activity แตกต่างกันไป ไม่เท่ากัน (Wiseman, 1995; มัทนา และคณะ, 2548) ซึ่งถ้าได้โคตินเนสที่ย่อยสลายโคตินในผนังเซลล์ของราได้ดี จะเป็นประโยชน์ต่องานทางด้าน การป้องกันกำจัดโรคพืช จะช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชลงได้ทำให้สินค้าเกษตรปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และต้นทุนต่ำ สามารถแข่งขันได้ในเวทีการค้าต่างประเทศ ลดการพึ่งพาจากต่างประเทศ โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากรรมวิธีการผลิตโคตินเนสจากแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces* spp. โดยเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อศึกษาคุณลักษณะของโคตินเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces* และเพื่อศึกษาการใช้โคตินเนสในการกำจัดราโรคพืช ปัญหาอีกเรื่องที่สำคัญในประเทศไทย คือ ภาวะโลกร้อนได้ส่งผลกระทบต่อเนื่องในทุกประเทศทั่วโลก มีการคาดการณ์ว่า อุณหภูมิโลกที่สูงขึ้นจะเป็นเหตุให้ปริมาณผลผลิตเพื่อการบริโภคโดยรวมลดลง มีผลต่ออายุการ

เก็บรักษาผลผลิต ทำให้เสื่อมคุณภาพ เสียรสชาติ เน่าเสีย มีโรคและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย นอกจากนี้ผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด ไม่สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำได้ เช่น มะเขือเทศ สตอเบอร์รี่ เป็นต้น (Thenmozhi, 2005-2006) แนวทางแก้ไขอาจจะดำเนินการ โดยการเติมโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง (antifreeze protein) ลงไป ซึ่งแบคทีเรียที่เก็บไว้ในตู้เย็น -20°ซ เป็นเวลา 1-2 ปี ในสภาพที่มีอาหารน้อยมากในหลอดทดลอง ยังคงมีชีวิตอยู่ และสามารถเจริญได้ปกติเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร จึงเป็นไปได้ที่แบคทีเรียเหล่านี้ จะสร้างโปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อคงความมีชีวิต หากได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตรทั้งในและนอกฤดูปลูก อุตสาหกรรมอาหาร เทคโนโลยีชีวภาพของประเทศไทยในอนาคตได้ นอกจากนี้ จุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมแมลงได้ เช่น เชื้อ *Metarhizium* spp. หรือเชื้อราเขียว (green muscardine fungus) เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงหลายชนิด (Tangthirasunun *et al.*, 2010) อีกทั้งเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายและพบทั่วไปในดิน จึงได้รับความนิยมนำไปใช้ในควบคุมแมลงแบบชีววิธี (Biological Control) (Zimmermann, 1993) ทั้งนี้เชื้อราเขียวที่ทางกลุ่มงานปราบศัตรูทางชีวภาพนำมาศึกษาตัววงแรดมะพร้าว ยังขาดข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีวโมกุล หากมีข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอและลำดับเบส ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่ยีนนี้จะมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว การศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเขียวโดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีนโคตินเอสอาจจะนำมาใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายในหาตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราเขียวที่มีประสิทธิภาพได้

พลังงานจัดเป็นปัจจัยสำคัญและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ ปัจจุบันมีปริมาณการใช้พลังงานที่เพิ่มมากขึ้นตามความต้องการของมนุษย์ ทั้งภาคเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และการคมนาคมขนส่ง ซึ่งแหล่งพลังงานเหล่านี้ล้วนได้มาจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด หลายประเทศจึงมีความพยายามอย่างยิ่งที่จะหาพลังงานทางเลือกอื่น ในรูปแบบต่างๆ เช่น ก๊าซธรรมชาติ ไบโอดีเซล พลังงานลม น้ำ แสงอาทิตย์ เพื่อที่จะนำมาทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงานจากชีวมวล ซึ่งนับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจมาก ในส่วนของประเทศไทยสัญญาณที่เห็นได้ชัดเจน คือ บริษัทการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย จำกัด (มหาชน) (ปตท.) ซึ่งเป็นบริษัทน้ำมันแห่งชาติ ได้ทุ่มเงินไม่น้อยกว่าปีละ 1,000 ล้านบาท ทำการวิจัยพลังงานทดแทนโดยใช้วัตถุดิบที่ไม่ใช่พืชอาหาร การเพราะไม่ต้องการสร้างปัญหาการแย่งชิงทรัพยากร ซึ่งจะเกิดปัญหาต่างๆตามมามากมาย โดยเฉพาะจะทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนพืชอาหาร ส่งผลให้ราคาผันผวนมาก การวิจัยพลังงานทดแทนโดยใช้วัตถุดิบที่ไม่ใช่พืชอาหาร พบว่าสาหร่ายมีศักยภาพสูงกว่า เนื่องจากไม่ใช่พืชอาหาร ตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง แต่ปัญหาสำคัญของการผลิตพลังงานทดแทนจากสาหร่ายให้มีคุณภาพดีและปริมาณมาก คือ สายพันธุ์สาหร่ายที่เหมาะสมต่อการผลิต การเพาะเลี้ยง และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Patrick *et al.*, 2015) ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายให้มีแป้งสูงโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อนำมาผลิตเอทานอล การเก็บเกี่ยว และวิธีการย่อยสลายเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีแป้งสูงตลอดจนวิธีการหมักเพื่อนำมาผลิตเอทานอลและใช้เป็นพลังงานทดแทน เป็นเทคโนโลยีเบื้องต้นในการผลิตไบโอเอทานอลจากสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของพืชพลังงานทดแทนที่เตรียมพร้อมไว้ใช้ในอนาคตต่อไป

นอกจากนี้ชีวมวลจากแหล่งต่างๆ สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเป็นพลังงานเอทานอล หรือ ก๊าซชีวภาพ อาทิเช่น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และอุตสาหกรรม อาทิเช่น เปลือกหรือแกนสับปะรด ทลาย ปาล์ม น้ำกากสำจากโรงงานสุรา เศษไม้ที่เหลือจากโรงงานทำไม้ ของเสียจากโรงงานทำกระดาษ ของเหลือใช้ หลังจากการเก็บเกี่ยว เช่น กากถั่วเหลือง ฟางข้าว รำข้าว ชานอ้อย ชังและเปลือกข้าวโพด ซี้เลื่อย เป็นต้น ชีวมวลพืชทางการเกษตรมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยเฉพาะเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีมากในผนังเซลล์ของพืชทุกชนิด การย่อยสลายวัสดุชีวมวลจึงจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส เช่น เชื้อรา แอคติโนมัยซีส โปรโตซัว และแบคทีเรีย นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นไซแลน ซึ่งข้อดีของการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารเหล่านี้เมื่อเทียบกับวิธีทางเคมี คือ การเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์มีความจำเพาะกับสับสเตรทมากกว่า เอนไซม์ทำงานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่รุนแรง และไม่มีการสูญเสียสับสเตรทในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ดังนั้นในด้านอุตสาหกรรมจึงได้มีการนำเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) และไซแลนเนส (Xylanase) มาใช้อย่างกว้างขวาง ในเซลล์พืชประกอบด้วยเซลลูโลส 40 - 60 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสหรือไซแลน 30 - 40 เปอร์เซ็นต์ ในการย่อยสลายมวลชีวภาพให้สมบูรณ์จะต้องย่อยทั้งสองส่วนคือเซลลูโลสและไซแลนจึงจะสามารถใช้ประโยชน์สูงสุดจากมวลชีวภาพได้ ในการย่อยจะต้องใช้เอนไซม์ 2 กลุ่มคือ กลุ่มเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส ประกอบด้วย เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ cellobiohydrolases, Endoglucanases และ beta-glucosidases ส่วนเอนไซม์กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ Endo-beta-xylanase, beta-D-xylosidase และ alpha-l-Arabinofuranosidase ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกควบคุมด้วยยีนต่างชนิดกัน ในโครงการนี้จะเน้นการศึกษาเอนไซม์กลุ่มที่ 2 เป็นหลัก เนื่องจากได้ดำเนินการศึกษาเอนไซม์กลุ่มแรกแล้ว โดยหวังว่าจะสามารถผลิตน้ำตาลจากลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ คำนวณค่าต่อการลงทุนในการผลิตเอทานอลและการผลิตเอนไซม์ได้ในระดับอุตสาหกรรมได้ในที่สุด

กระบวนการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรจำพวก Lignocellulose โดยใช้ Enzyme อุณหภูมิสูง และกรดเข้มข้น สามารถก่อให้เกิดตรงควัตถุและสารต่างๆที่ยับยั้งการเจริญเติบโตและขัดขวางกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนในการผลิต พลังงานชีวมวลจากวัสดุทางการเกษตรเหล่านี้มีมูลค่าสูง นอกจากนี้กระบวนการกำจัดสารพิษเหล่านี้ทั้งด้วยวิธีทางกายภาพ เคมี เป็นกระบวนการที่มีต้นทุนสูงเกินไป (Liu and Blaschek 2010) มีความเป็นไปได้ในการดัดแปรพันธุกรรมยีสต์เพื่อใช้ในการย่อยสลาย Cellulose และ Lignocellulose มีรายงานว่า ยีสต์ซึ่งมีการดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์สามารถเปลี่ยน Amorphous cellulose เป็นเอทานอลได้ (F. Yasuya et al. 2013) โปรตีน Esterase ซึ่งเป็น carboxylesterase ในแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สามารถแสดงออกได้บนผนังเซลล์ยีสต์และสามารถทำให้ยีสต์เจริญเติบโตบน Carbon source คือ glycerol triacetate (Triacetin) ได้ (B. Frank et al. 2006) นอกจากนี้ยีสต์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมเซลล์ยังสามารถใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้อีกด้วย โดยดัดแปรพันธุกรรมให้ยีสต์แสดงออกเอนไซม์ amylases cellulases และ β -glucosidase (Waraporn A. et al. 2011) การนำ Enzyme ซึ่งสามารถย่อย Lignocellulose มาใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมยีสต์อาจจะช่วยให้

ยีสต์มีความสามารถในการย่อยสลาย วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งเป็น Biomass และมีส่วนผสมของ Lignocellulose เป็นส่วนใหญ่ได้ซึ่งจะเป็นงานวิจัยในการทดลองนี้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ด้วยยีน YAP1 นอกจากนี้เรื่องการผลิตไบโอเอทานอลแล้ว เอนไซม์ที่ช่วยในเรื่องการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส ทำให้โมเลกุลไขมันขนาดใหญ่ถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กลง อย่างเฉพาะเจาะจง และแบบไม่เฉพาะเจาะจง อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลาสั้น ไลเปสที่เหมาะสมต่อการใช้เพื่อผลิตไบโอดีเซล และในอุตสาหกรรมแปรรูปต่างๆ จำเป็นต้องเร่งศึกษาเพื่อสนองต่อความต้องการใช้ในปัจจุบันและอนาคต โดยการศึกษากรรมวิธีการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียและราโดยเทคโนโลยีชีวภาพ และเพื่อศึกษาการใช้ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล

การศึกษาและพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม ในโครงการนี้ได้มีการปรับปรุงหน้าวัวซึ่งเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในอนาคตหน้าวัวจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ เพื่อสร้างหน้าวัวพันธุ์ใหม่ให้มีสีสันโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ดอกในอนาคต โดยการใช้ ยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* เป็นยีนยีนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ซึ่งจัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน(ปิยะศักดิ์ 2542, Brugliera et al.1999, Eric et al.2001) การควบคุมการแสดงออกของยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัวจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญและมีความจำเป็น เพื่อปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว ให้มีสีสรรหลากหลาย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกในอนาคต

การใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ ยางพาราซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย สามารถสร้างรายได้ให้เกษตรกรทั้งในรูปของน้ำยางและไม้ยาง การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต้องใช้เวลาอันยาวนาน การนำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์เป็นการช่วยย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNP ซึ่งสามารถเริ่มต้นพัฒนาจากลำดับเบส EST ของยางพารา ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยวิธีการตรวจสอบการเกิด SNP สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบส นอกจากนี้ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเมินความหลากหลาย ซึ่งข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays ceratina*) จัดเป็นข้าวโพดฝักสดที่ได้รับความนิยมบริโภคในหลายประเทศของภาคพื้นเอเชีย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สำหรับใช้ประกอบการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้แก่ เห็ดเรืองแสง เป็นเห็ดที่สามารถพบได้ในประเทศไทย แต่ยังมี การศึกษากันน้อยมาก เนื่องจากเป็นเห็ดที่ไม่สามารถนำมากินได้และหายาก มีรายงานการนำสารพิษจากเห็ดเรืองแสงมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศ (สุรียพร และวีระศักดิ์, 2552) ในทางการแพทย์

พบว่ามีการ illudine S และ illudine M ที่เป็นสารต่อต้านการเกิดมะเร็ง (Van, 2006) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงความหลากหลายของสายพันธุ์เห็ดเรืองแสงที่พบในประเทศไทย โดยมีการศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว จึงสามารถใช้จำแนกเห็ดเรืองแสงออกจากเห็ดชนิดอื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน นอกจากนี้พืชบางชนิดซึ่งประเทศไทยนำเข้าเป็นมูลค่าถึง 1,242.47 ล้านบาทต่อปี คือองุ่น ได้แก่ พันธุ์ไวน์มาละกาและพันธุ์คาร์ดินัล มีคุณภาพผลดีต่อกว่าองุ่นจากต่างประเทศซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้รับการผสมพันธุ์ขึ้นมาใหม่ เช่น องุ่นไม่มีเมล็ด หรือองุ่นมีเมล็ดแต่ผลโต รสชาติหวานกรอบ เป็นต้น เนื่องจากองุ่นไม่ใช่พืชพื้นเมืองของไทย มีการนำเข้ามาปลูกขยายพันธุ์จากส่วนของลำต้น (Vegetative Propagation) ทำให้ฐานพันธุกรรมขององุ่นเชิงการค้าในประเทศไทยค่อนข้างจำกัด หรืออาจนำเข้าพันธุ์องุ่นมาปลูกแล้วเรียกชื่อต่างกันไป ดังนั้นเพื่อให้มีการผลิตองุ่นอุตสาหกรรมเป็นไปอย่างมีระบบและยั่งยืนโครงการนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะจัดทำลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นเพื่อประเมินลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล และจัดทำฐานข้อมูลทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของพันธุ์องุ่นเพื่อการสืบค้น ในการจำแนกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์อย่างเป็นระบบ และไม่ตอกอีกหนึ่งชนิดของไทยที่ควรอนุรักษ์ ได้แก่ กล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งมีจำนวนประชากรในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว จัดเป็นพืชที่มีสถานภาพที่ใกล้สูญพันธุ์อีกชนิดของโลก ความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรมและเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละสายพันธุ์มีความจำเป็นมากในการบ่งชี้สายพันธุ์และความหลากหลาย งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของกล้วยไม้รองเท้านารีที่เก็บรวบรวมไว้ โดยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้ากับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี และนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีในประเทศไทย

จากข้อมูลดังกล่าวในเรื่องของจุลินทรีย์และพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งการรวบรวม การพัฒนาสายพันธุ์ การค้นหาสารสำคัญที่มีประโยชน์ทางการเกษตร การศึกษาและพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม การใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช และการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ปัจจุบันมีเทคนิคทางชีวโมเลกุลใหม่ๆเข้ามาอย่างต่อเนื่อง ทำให้การศึกษาและค้นคว้าได้ง่าย รวดเร็วขึ้น เชื่อถือได้ และสามารถปรับปรุงให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อรวบรวม พัฒนา และค้นหาสารสำคัญของจุลินทรีย์เพื่อไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่ายขนาดเล็ก นอกจากนี้ค้นหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืช
2. เพื่อผลิตและทดสอบเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการผลิตเอทานอล และไบโอดีเซล
3. เพื่อการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัว

4. เพื่อค้นหาตำแหน่งการเกิดเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ในจีโนมยางพารา โดยการหาลำดับของสารพันธุกรรม เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ในยางพาราจากตำแหน่งการเกิด SNP ที่มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้เทคนิค CAPS เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ในยางพาราจากตำแหน่งการเกิด SNP ที่ไม่มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้เทคนิค SSCP และ HRM และเพื่อระบุตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP บนโครโมโซมยางพารา และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สำหรับใช้ประกอบการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์
5. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ที่ได้จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเห็นร่อง และกล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย

บทคัดย่อ

การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ เป็นโครงการที่เริ่มดำเนินการตั้งแต่ ปี 2554-2558 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ รวบรวม พัฒนา และค้นหาสารสำคัญของจุลินทรีย์เพื่อไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ และสาหร่ายขนาดเล็ก นอกจากนี้ค้นหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืช เพื่อการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัว เพื่อค้นหาตำแหน่งการเกิดเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ในจีโนมยางพารา และใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สำหรับใช้ประกอบการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว และเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ที่ได้จากการทำลายพื้ดีเอ็นเอเห็ด ฮ่องกง และกล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์และพืชที่นำมาศึกษาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย วิธีการศึกษาโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยปรับปรุงและพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่นำมาใช้ได้แก่ การจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่ายขนาดเล็ก โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วนของ rDNA sequence การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์เซลลูโลส ไซแลน ไลเปส waxy gene เข้าสู่เวกเตอร์ และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย ยีสต์ สาหร่าย และ ยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในรูป antisense ในดอกหน้าวัว นอกจากนี้การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP และการประเมินลักษณะทางพันธุกรรมข้าวโพด ฮ่องกงและกล้วยไม้รองเท้านารี โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR หรือ Microsatellite และจัดกลุ่มเพื่อแยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ต่อไป ซึ่งผลการทดลอง พบว่า สามารถโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายชีวมวลจำนวน 3 ยีนได้แก่ endo glucanase, cellobiohydrolase และ beta-D- glucosidase ใส่ในเวกเตอร์ pPICZA pPICZB และ pPICZC ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่มีคุณสมบัติ เหมาะสมในการถ่ายลงเซลล์แบคทีเรียได้แก่ *E. coli* และยีสต์ *Pichia pastoris* นำยีสต์ที่มียีนนั้นไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหาร YPD + Zeocin และเลี้ยงกระตุ้นการแสดงออกของยีนในอาหาร MGYH และกระตุ้นโดยการเติมเมทานอล พบว่ายีสต์ที่ได้สามารถผลิตโปรตีนได้มีขนาด 45 , 25 และ 15 กิโลดาลตันตามลำดับ สามารถถ่ายฝากยีนไลเปส 4 ยีน ได้แก่ lip ของ *P. aeruginosa*, lip A ของ *S. marcescens*, lip A ของ *B. subtilis* และ alkaline lip ของ *B. cepacia* เข้าใน pET TOPO เวกเตอร์ และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนใน BL21 ได้ไลเปสของ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์มอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด เมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซลได้ไบโอดีเซล B100 สามารถโคลนยีนและถ่ายฝากยีนโคติเนสของแบคทีเรียเข้าใน pET 100/D-TOPO vector ได้ 6 ยีน และโคลนยีนราได้ 1 ยีน และพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืช 3 เชื้อ ได้แก่ *Botryodiplodia theobromae*, *Pyricularia oryzae* และ *Fusarium oxysporum* และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชได้อย่างสมบูรณ์ การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเห็ด 6 ชนิด 10

ตัวอย่าง ทดสอบด้วยวิธี Dual cultures พบว่าเห็ดแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โรคพืชในแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ จำแนกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลใน ส่วนของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 11 คู่ พบว่า สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีการเจริญเติบโต ได้รวดเร็วที่สุด ที่ pH 7-8 สามารถขยายและเลี้ยงในสภาพกลางแจ้งได้ในอ่างพลาสติกขนาด 600 ลิตร เก็บ เกี่ยวเซลล์ได้ในวันที่ 4-8 ได้น้ำหนักเฉลี่ย 1.65 กก. น้ำหนักแห้ง/ลบ.ม. และสามารถคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณแป้งสูงจากการโคลนยีน waxy (*Wx* gene) เข้าสู่ pChlamy_3 vector และถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ได้จึงเป็นชนิดที่เหมาะสมในการคัดเลือกไปเพิ่มปริมาณและศึกษา เทคโนโลยีการผลิตเป็นไบโอเอทานอลต่อไป สามารถรวบรวมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพใน การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานเนส บนอาหาร screening medium ซึ่งมี CMC-Na และ Xylan เป็น องค์ประกอบ จำนวนทั้งสิ้น 488 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ดี คือ ไอโซเลท AC-10 ให้ ค่า reducing sugar สูงที่สุด เท่ากับ 1,350 ug/ml ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเฮมิ เซลลูโลสได้ดี คือ ไอโซเลท PV4-15x ให้ค่า reducing sugar สูงที่สุด เท่ากับ 3,360 ug/ml จำแนกชนิด แบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces* sp. และ *Bacillus amyloliquefaciens* การโคลนยีนไซลานเนส (endo-1,4-beta-xylanase gene) ทำการเชื่อมต่อกับยีนไซ ลานเนสเข้ากับ Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) แล้วถ่ายฝากพ ลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนไซลานเนส เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) พบว่า รีคอมบิแนนท์ เอนไซม์มีกิจกรรมที่ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม *E. coli* BL21 (DE3) ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน สำหรับการศึกษา เอนไซม์เซลลูเลส ได้เก็บรวบรวมเชื้อราทั้งหมด 32 สายพันธุ์นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเฮมิ เซลลูเลส พบว่ามี 10 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีบนอาหารทั้ง 4 ชนิดได้แก่ CMC เปลือก ข้าวโพด เปลือกมัน และอากาศ ด้านการโคลนยีน เมื่อมีการเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ที่พลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO มียีน B-D - xylosidase ได้แก่ XldC1, Xld2C1 และ XldC4 ที่กระตุ้นให้มีการ แสดงออกของโปรตีนที่ 4 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบบเติมและแบบไม่เติม IPTG พบว่า มีการย่อยบนอาหาร ไซเลน ข้าวโพดและอากาศได้ดี ในขณะที่มีการย่อยได้น้อยมากบนอาหารที่ผสมเปลือกมัน และไม่เกิดการย่อย บนอาหาร CMC เลย ซึ่งผลจากการเลี้ยงเชื้อ แบบเติมและแบบไม่เติม IPTG พบว่า ให้ผลการย่อยเคลียร์ไซน บนอาหารที่มีส่วนผสมของไซเลน อากาศและข้าวโพดที่ไม่แตกต่างกัน ในเรื่องของกระบวนการหมักไบโอเอ ทานอล สามารถคัดเลือกยีสต์ที่ได้รับการถ่ายยีน *yap1* ซึ่งเป็นยีนที่มีส่วนสำคัญในการกำจัดสารพิษของยีสต์เข้าสู่จีโนมของยีสต์และได้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเร็วกว่ายีสต์ WT นอกจากนี้ ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ Cycloheximide และทนทานต่อสารมีพิษ HMF และสร้างชุดการสังเคราะห์ Over expression vector สำหรับ Cellulase Enzymes พร้อมใช้เพื่อถ่ายเข้าสู่ ยีสต์ในการนำไปใช้ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้ นอกจากนี้ได้คัดเลือกและเก็บรักษาแบคทีเรียทน เย็นได้ 5 สกุล สามารถโคลนยีนแบคทีเรียได้ 3 ยีน คือ Neub family protein with antifreeze-like domains จาก *Bacillus cereus* ขนาด 984 nucleotides และ antifreeze glycopeptide AFGP

related protein จาก *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* ขนาด 1887 nucleotides และ *afpIII* จากปลาน้ำลึก *Macrozoarces americanus* clone15typeIII 1 ยีน ขนาด 267 nucleotides และ *X. campestris* ขนาด 8, 30.4 และ 58.3 KDa ตามลำดับ โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ สามารถลดความเสียหายเนื่องจากการแช่แข็งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับเชื้อราเหี่ยวที่ป้องกันแมลง สามารถจำแนกเชื้อราเหี่ยวที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีทั้งหมด 14 ตัวอย่าง ซึ่งจากการจำแนกเบื้องต้นพบว่าเป็น *Metarhizium anisopliae* 11 ตัวอย่าง *M. flavoride* 1 ตัวอย่าง และ *Metarhizium spp.* 2 ตัวอย่าง สามารถจำแนกและวิเคราะห์ข้อมูลหัตถ์เรื่องแสงโดยวิธีหาลำดับเบสบริเวณ ITS ของหัตถ์เรื่องแสง 4 ชนิด พบว่าเป็นชนิด *Mycena chlorophos* และ *Neonothopanus nimbi* อีก 2 ชนิด สามารถจำแนกได้เพียง genus คือ *Favolaschia spp.* และ *Mycena spp.* สามารถนำไปถ่ายฝากสู่หน้าวัวพันธุ์ไซเนตและพันธุ์ราบีโต จากการคัดเลือกต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารที่เติม hygromycin และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าการถ่ายฝากยีน *DFRAS* เข้าสู่หน้าวัวประสบความสำเร็จ ได้ทำการค้นหาตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีนในยางพารา 12 พันธุ์ เพิ่มปริมาณซันตีเอ็นเอของยีน 9 ยีน นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสนิปรวม 90 ตำแหน่ง สามารถวิเคราะห์การจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวนชุดจีโนมของยางพารา การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว 186 สายพันธุ์ ทำให้การจัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 5 กลุ่ม ความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวโพดด้วยผลของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จึงเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด และเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพด ทำประเมินลักษณะพันธุกรรมขององุ่น 63 พันธุ์ การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Microsatellite primer 28 คู่ พบว่าสามารถแบ่งพันธุ์องุ่นออกเป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ กลุ่ม A เป็นองุ่นรับประทานสดทั้งหมด กลุ่ม B เป็นองุ่นทำไวน์และองุ่นป่ารวมถึงองุ่นรับประทานสดอีก 6 พันธุ์ นอกจากนั้น การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้มีการเขียนโปรแกรมจัดทำฐานข้อมูลพันธุ์ดีเอ็นเอของพันธุ์องุ่นขึ้น เครื่องมือที่ใช้ในการพัฒนาระบบหรือเขียนโปรแกรมใช้ Microsoft Visual Studio 2005 และโปรแกรมฐานข้อมูล MS-SQL Server Express ASP.Net 2.0 ติดตั้งบน Internet คำนำ Information Service ภาษาที่ใช้ในโปรแกรมนี้คือ ASP.Net 2.0 ส่วนกล้วยไม้รองเท้านารีที่เก็บรวบรวมไว้ โดยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้ากับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี เพื่อลดค่าใช้จ่าย ศึกษาไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 25 ตัวอย่าง จาก 12 สายพันธุ์ พบว่ามี 61 คู่สายไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังกา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเกรย์ และรองเท้านารีฝายหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ และไม้ป่าเกาะพนัก นอกจากนี้ได้มีการทำฐานข้อมูลของกล้วยไม้รองเท้านารี จัดเก็บในรูปแบบ

สื่ออิเล็กทรอนิกส์ออนไลน์เพื่อให้ง่ายต่อการใช้งานของบุคคลทั่วไป และมีการออกแบบไว้เพื่อให้ผู้นำไปใช้ สามารถปรับปรุงข้อมูลให้เป็นปัจจุบันได้อย่างง่าย โดยมีการเปิดให้ทดลองใช้ผ่านทาง <http://www.plc.rmutl.ac.th/Database/result.php>

กิจกรรมที่ 2 วิจัยชีวโมเลกุล(Molecular Biology)ในการปรับปรุงพันธุ์

การทดลองที่ 2.1 การควบคุมการแสดงออกของยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัว

Gene Regulation of Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) Antisense on Flower color control in Anthurium.

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง:	กุหลาบ คงทอง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน:	ประสาน สืบสุข	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	กัลยา เกาะกลาง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	จีราพร แก่นทรัพย์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ (keywords)

ดอกหน้าวัว ยีน dihydroflavonol 4-reductase gene

บทคัดย่อ (Abstracts)

ยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ซึ่งจัดเป็นฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างชุดยีน *pMDC32-DFRAS* จากยีน *DFR* ที่โคลนได้จาก cDNA ของดอกหน้าวัวให้อยู่ในรูปควบคุมการแสดงออกของยีนแบบกลับทิศ (*DFRAS*) โดยการนำยีน *DFR* ที่โคลนได้เข้าสู่ระบบการตัดต่อยีนแบบ Gateway โดยใช้เวกเตอร์ pDONR 221 เป็นตัวรับยีนและย้ายยีนต่อไปยัง ไบนารีเวกเตอร์ pMDC32 และสามารถนำไบนารีเวกเตอร์ที่มียีน *DFR* เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ทำให้ได้ชุดยีน *pMDC32-DFRAS* ที่อยู่ใน *Agrobacterium tumefaciens* ที่สามารถนำไปถ่ายฝากสู่หน้าวัวพันธุ์ไซเนตและพันธุ์ราปิโต จากการคัดเลือกต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารที่เติม hygromycin และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าการถ่ายฝากยีน *DFRAS* เข้าสู่หน้าวัวประสบความสำเร็จ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DFRAS* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนนี้สามารถนำออกปลูกเพื่อตรวจสอบผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของดอกหน้าวัวในโอกาสต่อไป

dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene is involved in flavonoid pathway leading to the production of the orange , red , blue or purple-colored anthocyanins. In this study, antisense *DFR* (*DFRAS*.) was cloned from *Anthurium* into binary vector, pMDC32, generating pMDC32- *DFRAS*. The pMDC32- *DFRAS*. was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain *EHA105*. *Anthurium spp.* cv. Sonate and cv. Rahpido transformation were performed using the *A. tumefaciens*. The transformed *Anthurium spp.* were selected on media containing hygromycin. The transgenic *Anthurium* plants were subjected to PCR analysis using specific primers. The results showed that the transformation of *DFRAS* into *Anthurium spp* was successful

บทนำ (Introduction)

ในแต่ละปีประเทศไทยได้ผลิตไม้ดอกสำหรับใช้ทั้งภายในประเทศ และส่งออก แม้การผลิตเพื่อป้อนตลาดภายในประเทศจะมีอยู่มาก แต่การผลิตเพื่อส่งออกให้มูลค่าที่สูงกว่า ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น เนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพเพื่อการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกเป็นความจำเป็นที่ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่ และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้ เป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิต และการส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในฐานะที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลากหลายชนิด การเร่งรัดศึกษาพัฒนาเทคนิคและวิธีการเพิ่มความหลากหลายของดอกโดยเฉพาะเรื่องสี ด้วยการปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย เป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มศักยภาพให้กับไม้ดอกส่งออก ในธรรมชาติไม้ดอกบางชนิดจะมีโทนสีจำกัด ไม่สามารถผสมพันธุ์ให้เกิดสีสรรที่นอกเหนือจากโทนสีเดิมที่มีอยู่ได้ แต่การนำเอาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ร่วมกับเทคนิคการถ่ายยีนสู่พืช โดยถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีจากไม้ดอกชนิดหนึ่งไปสู่อีกชนิดหนึ่ง จึงเป็นการพัฒนาให้เกิดความแปลกใหม่ด้านสีของดอกไม้

หน้าวัวเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้รับความนิยมนำมาประดับบ้านเรือน ทั่วประเทศ ไทยมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการผลิตดอกหน้าวัว ปัจจุบันมีพื้นที่การปลูกประมาณ 120 ไร่ กระจายไปทั่วประเทศ ได้แก่ กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี เลย กระบี่ ภูเก็ต ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย มีผลผลิตทั่วประเทศ ประมาณ 4,800,000 ดอกต่อปี และเพิ่มปริมาณขึ้นทุกปี แต่ประเทศไทยมี

เทคโนโลยีการขยายพันธุ์หน้าวัวต่ำ จึงมีการสั่งต้นพันธุ์หน้าวัวเข้ามาจากต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศ เนเธอร์แลนด์ เมื่อปี 2544 สั่งเข้ามา ประมาณ 140,000 ต้น

ในอนาคตหน้าวัวจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ ปัจจุบันภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการผลิตหน้าวัว ซึ่งได้พัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา แนวทางการสร้างหน้าวัวสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏ ในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช สมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่ หน้าวัว หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างหน้าวัวพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ ดอกในอนาคต ยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* เป็นยีนยีนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏ จักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ซึ่งจัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้ หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน(ปิยะศักดิ์ 2542, Brugliera et al.1999, Eric et al.2001)

ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัวจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญและมีความจำเป็น เพื่อ ปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว ให้มีสีสรรหลากหลาย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกใน อนาคต

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. หน้าวัวพันธุ์ราปีโต้ และพันธุ์โซเนต (ดอกชมพู)
2. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
3. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
4. BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Appliedbiosystems)
5. สารปฏิชีวนะ เช่น ampicillin cefotaxime hygromycin
6. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
7. เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ JM109
8. เวกเตอร์ pDONR 221 (invitrogen)
9. pMDC32 binary vector
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)

11. เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เครื่อง spectrophotometer
12. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation (BIORAD)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
14. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)
15. เครื่องมือสำหรับงานถ่ายยีน BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 ,Electroporation cuvette ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
16. เครื่องมือ และสารเคมีอื่น ๆ สำหรับงานชีวโมเลกุล

วิธีการทดลอง

การสร้างชุดยีน *DFR* ในรูป antisense (*pMDC32-DFRAS*).

โดยการนำยีน *DFR* ที่โคลนโดย กุหลาบและคณะ (2553) มาสร้างชุดยีน มีขั้นตอนดังนี้

1. นำยีน *DFRAS* เข้าสู่ Plant Expression Vector โดยใช้เทคโนโลยี Gateway

เทคโนโลยี Gateway ที่ใช้ในการโคลนยีน เป็นการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนของยีนจากเวกเตอร์หนึ่ง ไปสู่อีกเวกเตอร์หนึ่ง โดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนซึ่งกันและกัน ซึ่งไม่ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ขั้นตอนการดำเนินงานประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

1.1 การนำยีน *DFR* เข้าสู่ Entry Clones

1.1.1 นำยีน *DFR* ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM T easy และได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว (ภาพที่1) มาเตรียมให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับเทคโนโลยี Gateway โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่กำหนดให้มีการเติมลำดับเบสของไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ให้มีลำดับที่เหมาะสมสำหรับการเคลื่อนย้ายชิ้นยีนซึ่งกันและกัน เรียกว่า attB-PCR product โดยออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *DFRAS* โดยที่ ด้าน Forward เติ ม ล ำ ด ำ บ เ ส ที่ ป ล า ย ด ำ น 5 ' ด ำ ย GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ส่วนไพรเมอร์ Reverse ให้เติมลำดับเบสที่ปลายด้าน 5' ด้วย GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

1.1.2 เพิ่มปริมาณยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ Pfu DNA polymerase (RBC Bioscience) โดยเตรียมปฏิกิริยาของพีซีอาร์บนน้ำแข็งที่ประกอบด้วย 10X Reaction Buffer 5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer 2 ไมโครลิตร, Plasmid pGEM easy- *DFR* 1 ไมโครลิตร, 5 U/ul RBC Pfu DNA Polymerase 0.5 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 38.4 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 1 นาที 1 รอบ	}	35 รอบ
94 °C 1 นาที		
55 °C 1 นาที		
68 °C 2 นาที		
68 °C 7 นาที 1 รอบ		

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

1.1.3 การเตรียมชิ้น attB-PCR product ให้บริสุทธิ์

นำชิ้นยีน attB-PCR product ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเติมสารละลาย 1X TBE, pH8.0 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย 30% PEG8000/30 mM MgCl₂ ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 1X TBE, pH 8.0 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยให้ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นมากกว่า 10 ng/ul ตรวจสอบผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis นำสารละลายดีเอ็นเอ attB-PCR product ไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

1.1.4 การนำยีน DFRAS attB-PCR product เข้าสู่เวกเตอร์ pDONR 221

นำสารละลายดีเอ็นเอที่มียีน DFR attB-PCR product ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ตูตใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเวกเตอร์ pDONR (150 ng/ul) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติม BP Clonase II enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยการ vortex นาน 2 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที ได้สารละลายดีเอ็นเอ สำหรับใช้งานในขั้นตอนต่อไป

1.1.5 การนำเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

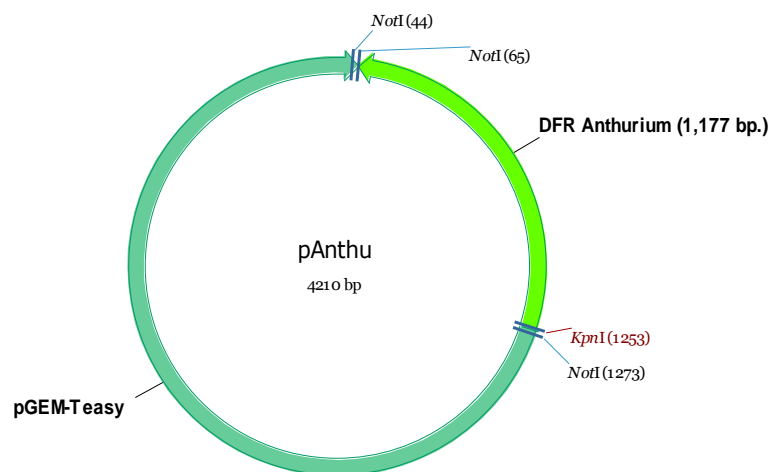
การนำยีน DFRAS ที่เชื่อมต่อยู่ในเวกเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยดูดสารละลายในข้อ 1.1.4 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มี Competent Cell 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ไป Heat-shock โดยการนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 30 วินาที แล้วรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เติม S.O.C. medium ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอด และนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 50 ug/ml kanamycin และนำไปเลี้ยงที่

อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำโคลนที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้พลาสมิดสายผสมที่มียีน DFR เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pDONR 221 เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การส่งถ่ายยีน DFRAS ที่เชื่อมต่อกับ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector

การนำยีน DFR ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector หรือ Binary vector (เวกเตอร์ pMDC32) โดยทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยยีน DFRAS ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pDONR 221 (10 fmoles) จากข้อ 1.1.5 ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และเติมเวกเตอร์ pMDC32 (20 fmoles) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม LR Clonase II Plus enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที

การนำยีน DFRAS ที่เชื่อมต่อยู่ในเวกเตอร์ pMDC32 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันข้อ 1.1.5 นำโคลนที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้พลาสมิดสายผสมที่มียีน DFRAS เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pMDC32 เพื่อนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* ต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงชิ้นส่วนของยีน DFR จากดอกหน้าวัวที่อยู่ใน เวกเตอร์ pGEM-T easy (กุหลาบและคณะ, 2553)

2. การนำพลาสมิด pMDC32-DFRAS เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

การนำเวกเตอร์ pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 โดยวิธี electroporation มีขั้นตอนดังนี้

2.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens*

2.1.1 นำโคลนีเดี่ยวของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เลี้ยงในอาหารเหลว YEP ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Rifampicin ความเข้มข้น 50 ug/ml นำไปขยายที่ 28 °C ขยายด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) เพื่อเตรียม competent cell ต่อไป

2.1.2 นำเซลล์เริ่มต้น 2 มิลลิลิตร เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 ปริมาตร 200 ml นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C ขยายด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนได้ค่า OD. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0.2-0.3

2.1.3 แช่เชื้อในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

2.1.4 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

2.1.5 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

2.1.6 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่ง competent cell ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ที่ได้ที่ อุณหภูมิ -80 °C หรือนำไปใช้ในขั้นตอนการเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation ต่อไป

2.2 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation

2.2.1 นำ competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80 °C มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

2.2.2 นำพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFR ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด competent cell ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที ต่อจากนั้น นำส่วนผสมมาใส่ลงใน cuvette แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที

2.2.3 ทำการเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ด้วยวิธี electroporation โดยใช้เครื่อง BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 โดยกำหนดสภาวะตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตดังนี้

cuvette Gap	0.1	cm
Voltage	2.0	Kv
Capacitor	25	μ F
Resistor	200	Ω

2.2.4 เช็ด cuvette ให้แห้งก่อน pulse หลังจาก pulse ให้เติมอาหารเหลว YEP 1 มิลลิลิตรทันที

2.2.5 ย้ายส่วนผสมไปเลี้ยงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.5 ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทอาหารออกแล้วเติมอาหารเหลวใหม่ลงไป 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลาย 50 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEP ที่เติม kanamycin 50 μ g/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2-3 วัน นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFR ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

2.3 การตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS ในเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens*

ตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFR ใน *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยการนำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารไปคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีการเตรียมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 μ M Forward Primer (...F) 2 ไมโครลิตร, 5 μ M Reverse Primer (...R) 2 ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum Taq DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 12.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วนำเชื้อจุ่มลงในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C	2 นาที	1 รอบ	} 35 รอบ
94 °C	1 นาที	}	
55 °C	1 นาที		
72 °C	2 นาที		

72 °C 10 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

นำโคลนที่ตรวจพบพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP ที่เติม 50 ug/ml Kanamycin เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงเพื่อใช้ในขั้นตอนการถ่ายยีนต่อไป

การถ่ายยีน AaDFRAS เข้าสู่หน้าว

1. การถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียม

เตรียมแคลลัสหน้าวสำหรับการถ่ายยีน โดยทำการเลี้ยงใบอ่อนหน้าวพันธุ์ราปิโต้ และพันธุ์ไซเนต ในอาหารสังเคราะห์ MS ทำการตัดใบหน้าวเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5-1 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS วาง 5 ชิ้น/plate เลี้ยงจนกระทั่งเกิดเป็นแคลลัส และเพิ่มแคลลัสให้ได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม โดยเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียม EHA 105 ที่มีพลาสมิด pMDC32 ที่บรรจุยีน AaDFRAS ที่โคลนได้จากดอกหน้าว (ที่ได้จากข้อ 2.) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCl 5 g/l pH7.0)ที่เติม Kanamycin 50 ug/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง spindown และละลาย pellet bacteria ด้วย co-culture media ให้ได้ OD.600 ประมาณ 0.6-1.0

ละลาย Agrobacterium EHA 105 ในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 2 mg/l sucrose 3 % pH 5.7 นำแคลลัสหน้าวเตรียมไว้ มาเลี้ยงเขย่าร่วมกับ Agrobacterium 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ แล้วซับเนื้อเยื่อให้แห้งด้วยกระดาษกรอง เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime 500 mg/g เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม cefotaxime 200 mg/l เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 10 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี antibiotic จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเป็นยอด ตัดยอดไปเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม sucrose 3 % pH 5.7 นำไปตรวจสอบการได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

2. การตรวจสอบต้นหน้าวัวที่ได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

นำใบของต้นหน้าวัวที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานต่อ hygromycin มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Plant II Kit ตามวิธีของบริษัท MACHERY-NAGEL ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง BioDrop และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบการปรากฏของยีน AaDFRAS ในหน้าวัวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ คือ NOSTer204.F, NOSTer204.R (204bp) เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของ Nos terminator และยีน AaDFRAS จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด) 2554- 2558

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

การสร้างชุดยีน

การสร้างชุดยีน *pMDC32-DFRAS*

1.การนำยีน DFRAS เข้าสู่ Expression Vector โดยใช้เทคโนโลยี Gateway

1.1 การนำยีน DFRAS เข้าสู่ Entry Clones

การนำยีนเข้าสู่ Entry Clones เป็นการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของ DFR ให้อยู่ในรูปของ Antisense และให้เหมาะสมสำหรับการโคลนยีนโดยใช้เทคโนโลยี Gateway จากการนำลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้ (กุหลาบและคณะ, 2553) มาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ และดัดแปลงลำดับเบสของไพรเมอร์ Forward และ Reverse โดยเติมลำดับเบสที่ปลายด้าน 5' จากการออกแบบไพรเมอร์ พบว่าได้ไพรเมอร์ด้าน Forward คือ AaDFRattB2AS มีลำดับเบส

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCCCCGTGCTAT CACTGTTC และได้

ไพรเมอร์ด้าน Reverse คือ AaDFRattB1AS มีลำดับเบส

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATCAGTTTCTGCCTCTATA โดยไพร

เมอร์ดังกล่าวจะไปจับบริเวณภายในของยีน DFR ที่โคลนได้ (ภาพที่ 2) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน DFRAS ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส และมีชิ้นดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 3)

แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้นสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้อย่างมีความจำเพาะกับยีน DFR เพียงอย่างเดียว อีกทั้งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งนี้ได้ใช้ Pfu DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรม 3'-5' exonuclease ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์มี fidelity ที่สูง เหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นของยีน DFR ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีต้องการความถูกต้องของลำดับเบสสูง (วีระพงศ์, 2012)

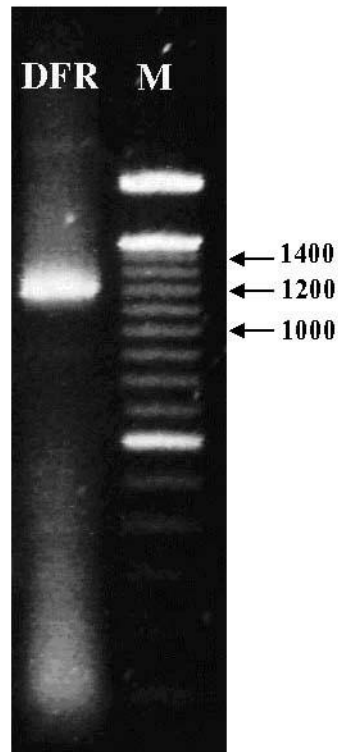
1	CACACACACA CACACATATA TATATATATA TAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GCGCTTTTAT CAGTTTCTGC CICTATAAAC AACAGCTGGT TATATATAAT
101	CTGCGAGGAT GATGCACAAG GGCACCGTGT GCGTGACGGG CGCTGCCGGG TTCGTTGGCT CATGGCTGAT CATGAGGCTC CTCGAGCAGG GTTACTCTGT
201	CAAGGCCACC GTCCGGGACC CCAGCAACAT GAAGAAGGTG AAGCACCTGC TCGACCTTCC AGGGGCCGCG AACCGCTGA CCCTCTGGA GGCCGACCTC
301	GTGATGAGG ACAGCTTCGA CGAGCCCATC CAAGGCTGCA CCGGCGTCTT CCACGTCGCG ACGCCCATGG ACTTCGAATC CAAGGACCCA GAGAGTGAGA
401	TGATCAAGCC GAGGATCGAG GGGATGCTGA ACCTGTTGCG GTCGTGTGCG AGGGCGAGCA GCACCGTCCG GCGAGTCGTC TTCACATCCT CGGCCGGCAC
501	GGTCTCCATA CACGAGGGCC GCAGACCTT CTACGACGAG ACCTCCTTGA GCGAGCTGCA CTTCTGCAGG GCCAAGAAGA TCGCCGATG GATGATTTTT
601	GTGTCGAAGA CGTTGGCCGA GAAGGCCGCG TGGGACTTTG CCGAGAAGAA CAACATCGAC TTCATCAGCA TTATCCCCAC CCTAGTCAAC GGCCCTTCG
701	TCATGCCAC CATGCCGCC AGCATGCTCT CCGCCCTCGC CCTCATCACA AGGAACGAGC CGCACTATTG GATCCTGAAC CCGGTGCAGT TCGTCCACCT
801	CGATGACCTC TGCAACGCC ACATCTTCTT GTTCGAGTGC CCGGACGCCA AGGGAAGGTA CATCTGCTCC TCCACGAGC TCACCATCGC CGGCCTCGCC
901	CAGATACTCC GGCAGCGCTA CCCTGAGTTC GACGTCCCA CCGAGTTGG AGACATGGAG GTCCTCGACA TCATAAGTA CTGCTCCAAG AAGCTCACGG
1001	ACCTAGGCTT TGAGTTCAAG TACAGCTTAG AGGATATGTT TGATGGGGG ATTCACTCCT GCAGAGAGAA GGGCTTGTG CCGCCGCCA CCAAGGAGCC
1101	ATCATATGCC ACTGAACAAT TAATTGCCAC CGGGCAAGC AACGGCCATT GAGACAGTG ATAGCACGGG GACCCAA

ภาพที่ 2 ตำแหน่งไพรเมอร์ที่ต่อด้วย attB1 (ตัวอักษรสีเขียว) (บน) และ attB2 (ตัวอักษรสีแดง) (ล่าง) ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน DFRAS

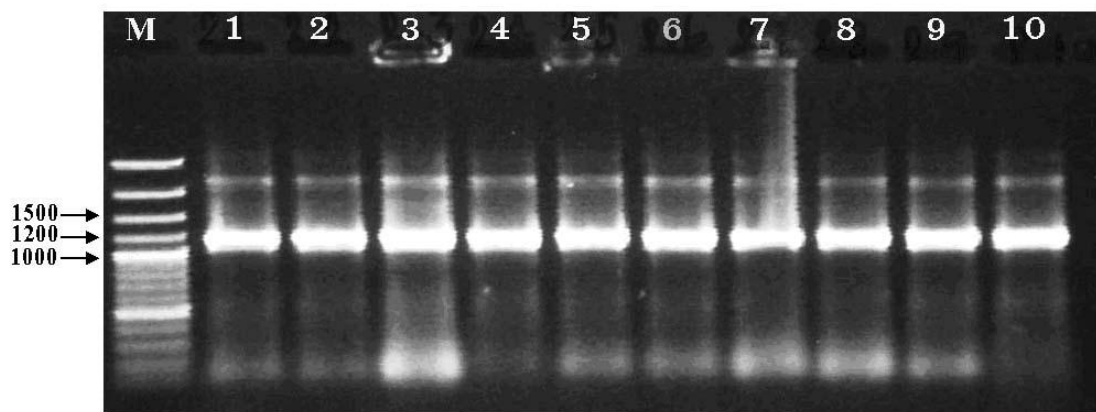
Antisense เป็นลำดับ oligonucleotides สายสั้นๆ ของ DNA หรือ RNA ที่ออกแบบมาให้เป็นคู่สมและความจำเพาะกับลำดับเบสของยีนที่สนใจ เพื่อเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนนั้นให้มีความแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งเป็นผลมาจากการจับคู่กันของ Antisense oligonucleotides กับยีน โดยอาศัยหลักการ คือการป้องกันหรือขัดขวางไม่ให้มีการสังเคราะห์โปรตีนจากยีนเป้าหมาย แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด(Christine Antler.2003.),(<http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata>.) antisense strand หรือ DNA template คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) หรือสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) ที่ทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับกระบวนการการถอดรหัสโดยให้ RNA polymerase เข้าเกาะแล้วเริ่มต้นการถอดรหัสในทิศทาง 5'→3' ดังนั้น ssDNA template คือสายดีเอ็นเอที่มีทิศทาง 3'→5' ซึ่งสายใดสายหนึ่งของ DNA อาจเป็นทั้ง antisense strand ของยีนหนึ่ง แต่เป็น sense strand ของอีกยีนหนึ่งก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่ง promoter gene ซึ่งเป็นตัวกำหนดทิศทางการถอดรหัส (<http://cpe.rsu.ac.th/ut/courses>) ได้มีการนำเทคโนโลยี antisense ไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางสำหรับในพืชได้ประสบผลสำเร็จใน การสร้างมะเขือเทศ :The Flavr Savr tomato โดยใช้ antisense RNA ไปควบคุม การ สุก ของ มะเขือเทศ โดยไปจับกับ mRNA ที่เกี่ยวกับการสร้างเอธิลีน จึงส่งผลให้มะเขือสุกช้าลง นอกจากนี้ เทคนิค antisense ของยีนACC oxidase ได้ถูกนำมาใช้ในการลดความสุกของ ผลไม้ ใน กลุ่ม แตง (melon) มะละกอ และอื่นๆ ส่วนในไม้ดอกมีใช้เทคโนโลยี antisense ในการควบคุมสีดอก เช่นการยับยั้งและ เปลี่ยนแปลงการเกิดสีดอกในพืชนี้อาจทำให้ได้ดอกที่มีสีเปลี่ยนไป (Christine Antler.2003.)(<http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata>.)

ชิ้นดีเอ็นเอของยีน DFRAS ที่เพิ่มปริมาณได้ จะมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ attB1 และ attB2 เชื่อมติดอยู่ เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PEG8000 พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นมากกว่า 10 ng/ul และมีปริมาณเพียงพอในการนำยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pDONR 221 ได้ประสบผลสำเร็จ ซึ่งจากการตรวจสอบโดยการนำโคลนของแบคทีเรียที่ได้รับโคลนเป้าหมายด้วยเทคนิค Single colony PCR พบว่าทุกโคลนที่ทำ การตรวจสอบ สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส (ภาพที่ 4) จึงสรุปได้ว่าชิ้นยีน DFRAS ที่อยู่ในตำแหน่งกลับทิศได้ถูกนำเข้าไปอยู่ในเวกเตอร์ pDONR 221 แล้ว (ภาพที่ 5) และเมื่อนำโคลนเป้าหมายดังกล่าวไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิด พบว่าได้ พลาสมิดที่มีปริมาณมาก (ภาพที่ 6) และสามารถใส่ชิ้นยีน DFRAS ที่อยู่ในเวกเตอร์ pDONR 221 นำเข้าสู่ Plant Expression Vector ต่อไป

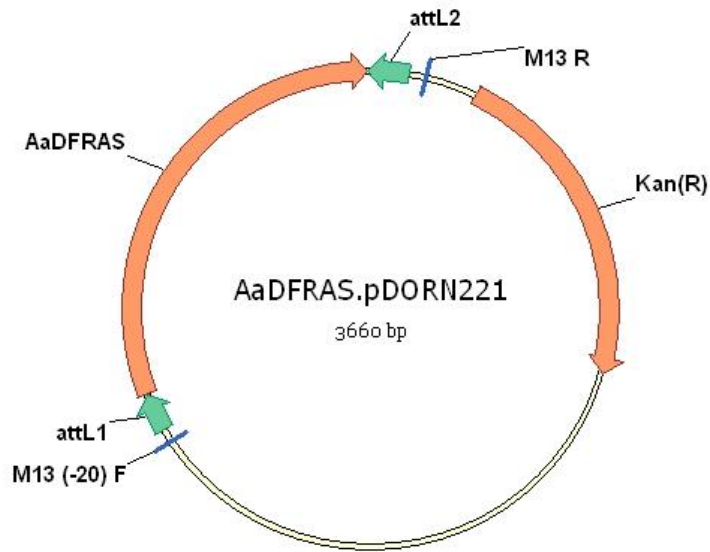
ในขั้นตอนการนำชิ้นยีน DFRAS ที่มีส่วนของ attB1 และ attB2 เข้าสู่เวกเตอร์ pDONR 221 เป็นการใช้นวัตกรรม Gateway ซึ่งเป็นระบบที่ออกแบบมาให้มีความง่ายในการ cloning และ subcloning ชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจเข้าเวกเตอร์ได้ โดยรวมอยู่ในขั้นตอนเพียงไม่กี่ขั้นตอน คือเราสามารถที่จะทำการ clone ดีเอ็นเอที่สนใจเข้าเวกเตอร์ที่เรียกว่า Gateway entry vector และทำการย้ายชิ้นดีเอ็นเอจากเวกเตอร์นี้ไปสู่เวกเตอร์ตัวอื่นๆ ที่เป็นระบบ Gateway เหมือนกันได้ โดยอาศัย bacteriophage lamda-based site-specific recombinant ที่เรียกว่า att site ดังนั้นในกระบวนการทำ cloning จึงไม่ต้องการขั้นตอนการใช้ restriction enzyme และ ligase enzyme ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ นำชิ้นยีน DFR ที่มีส่วนของ attB1 และ attB2 เชื่อมต่ออยู่ทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' นั้น จะมีการแลกเปลี่ยนชิ้นดีเอ็นเอซึ่งกันและกัน โดยเกิดที่ตำแหน่ง attB1, attB2 ของชิ้นยีน DFRAS กับตำแหน่ง attP1, attP2 ที่อยู่บนเวกเตอร์ pDONR 221 จึงทำให้ได้ Entry Clones คือ pDONR 221 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ DFRAS (ภาพที่ 5) สำหรับใช้งานในขั้นตอนต่อไป



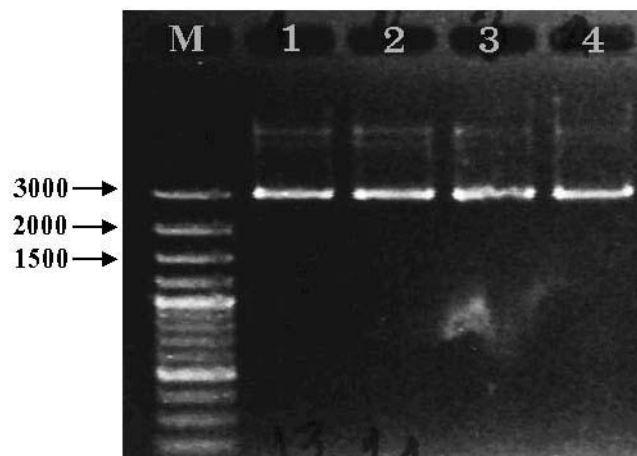
ภาพที่ 3 แลบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน DFR ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM easy (Pfu DNA polymerase) ด้วยไพรเมอร์ AaDFRASB1B2 M = 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)



ภาพที่ 4 แลบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบชิ้นยีน DFR จากโคลนแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pDONR 221 โดยวิธี colony PCR M = 100 bp DNA Ladder (Fermentus)



ภาพที่ 5 แสดงชิ้นส่วนของยีน DFR_AS จากดอกหน้าวัวที่อยู่ใน เวกเตอร์ pDORN 221

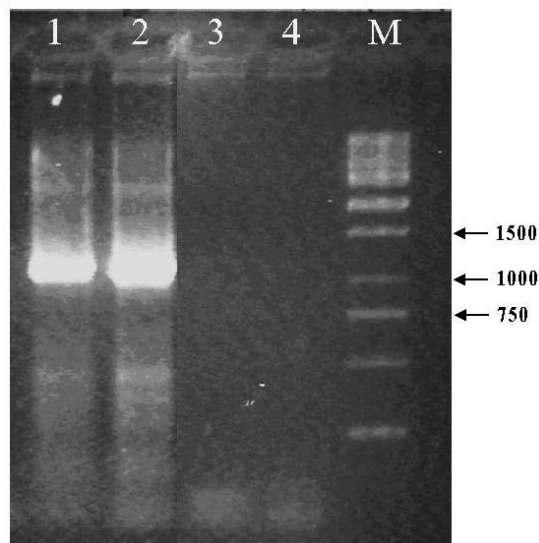


ภาพที่ 6 พลาสมิดที่สกัดจาก pDONR221 ที่ได้รับยีน DFRAS M = 100 bp DNA Ladder

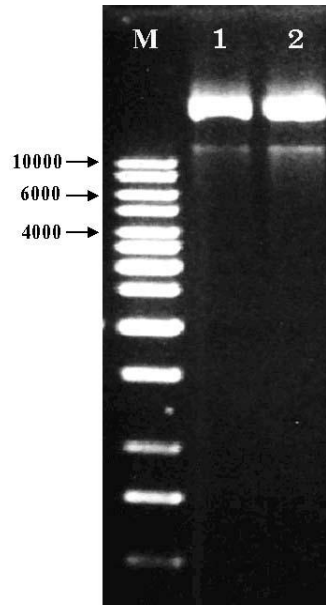
1.2 การนำยีน DFRAS เข้าสู่ Plant Expression Vector

จากการใช้เทคโนโลยี Gateway นำยีน DFRAS ที่เชื่อมต่ออยู่กับเวกเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector ผลการทดลองพบว่าสามารถนำยีน DFRAS เข้าสู่เวกเตอร์ pMDC32 ซึ่งเป็น Plant Expression Vector ได้สำเร็จ โดยผลจากการนำโคลนนี้ของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยง

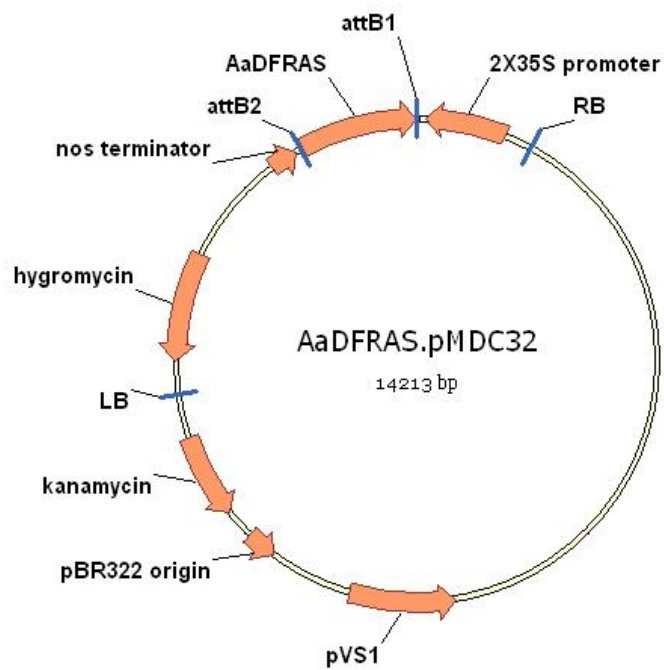
คัดเลือก ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Single colony PCR พบว่าโคลนที่ได้รับชิ้นยีน DFRAS สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ตรงกับค่าคาดหวังที่กำหนดไว้ แต่โคลนที่ไม่ได้รับชิ้นยีน DFRAS จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส (ภาพที่ 7) จึงสรุปได้ว่าชิ้นยีน DFRAS ได้ถูกนำเข้าไปอยู่ในเวกเตอร์ pMDC 32 แล้ว และเมื่อนำโคลนเป้าหมายดังกล่าวไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิด พบว่าได้พลาสมิดที่มีปริมาณมาก (ภาพที่ 8,9) สามารถใช้ในขั้นตอนการนำชิ้นยีน DFRAS ที่อยู่ในเวกเตอร์ pMDC 32 ไปถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* ต่อไปได้



ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบโคลนที่ได้รับยีน AaDFRAS ซึ่งอยู่ใน binary vector pMDC32 ด้วยไพรเมอร์ AaDFRAS ช่อง 1-2 = โคลนที่ได้รับยีน AaDFRAS ช่อง 3-4 = โคลนที่ไม่ได้รับ AaDFRAS
M = 1 Kb DNA Ladder



ภาพที่ 8 แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด AaDFRAS.pMDC32 ที่ผ่านการตรวจสอบพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR ตามภาพที่ 7 (ช่องที่ 1-2) M= 1Kb DNA Ladder



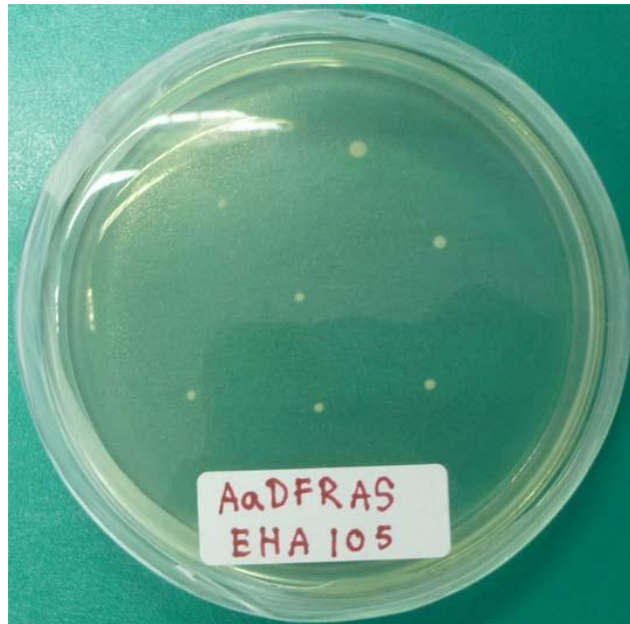
ภาพที่ 9 แสดงชิ้นส่วนของยีน DFR AS จากดอกหน้าวัวที่อยู่ใน เวกเตอร์ pMDC32

เวกเตอร์ pMDC 32 ซึ่งเป็น Plant expression vector หรือ Binary vector ซึ่งมีขนาด 11,752 คู่เบส ที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญ 2 ชุด คือ ชุดโครงสร้างยีนที่เกี่ยวกับการทำงานของยีนเป้าหมายตลอดจนยีนประกอบอื่นๆ ที่ใช้ในการคัดเลือก และการตรวจสอบพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งต้องจัดทำให้เป็นโครงสร้างที่เหมาะสมในการแสดงออกในพืช โดยจะต้องประกอบด้วย 2X35S Promoter ที่ควบคุมการถอดรหัสจากยีนเป็น mRNA และ nos terminator เป็นที่ควบคุมการหยุดการถอดรหัส Left border (LB) และ Right border (RB) เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการนำยีนเป้าหมายเข้าไปในพืช มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Kanamycin เพื่อช่วยคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Hygromycin เพื่อใช้ในการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ของต้นพืชที่ได้รับยีนเป้าหมาย

2. การนำพลาสมิด pMDC32-DFRAS ถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

การเคลื่อนย้าย pMDC32-DFRAS ซึ่งเป็น Binary vector เข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พบว่า competent cell ที่เตรียมได้นั้น สามารถนำไปใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธี electroporation ได้สำเร็จ ผลที่ได้จากการนำเซลล์ไปคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin พบโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ (ภาพที่ 10) ซึ่งต้องใช้เวลาในการเลี้ยงนาน 2-3 วัน จึงจะสังเกตเห็นเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* เจริญเป็นโคโลนี

การเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ electroporation นั้น พบว่าวิธีการนำเชื้อที่เก็บไว้เป็นเวลานานมาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารเพื่อปริมาณมากๆ นั้น เป็นการกระตุ้นให้เซลล์ที่เก็บไว้นานมีการแบ่งตัว ให้ได้เซลล์ใหม่ๆ เมื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารจำนวนมาก ก็จะมีการแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว ในขั้นตอนการทำความสะอาดเซลล์และทำให้เซลล์เข้มข้น การล้างเซลล์โดยใช้ 10% glycerol และปั่นตกตะกอนในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีอุณหภูมิ 4 °C เป็นการรักษาเซลล์ให้สูญเสียสภาพน้อยที่สุด เพื่อให้การส่งถ่าย พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้มีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 10 แสดงโคโลนีของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่ได้รับพลาสมิด pMDC32-DFRAS

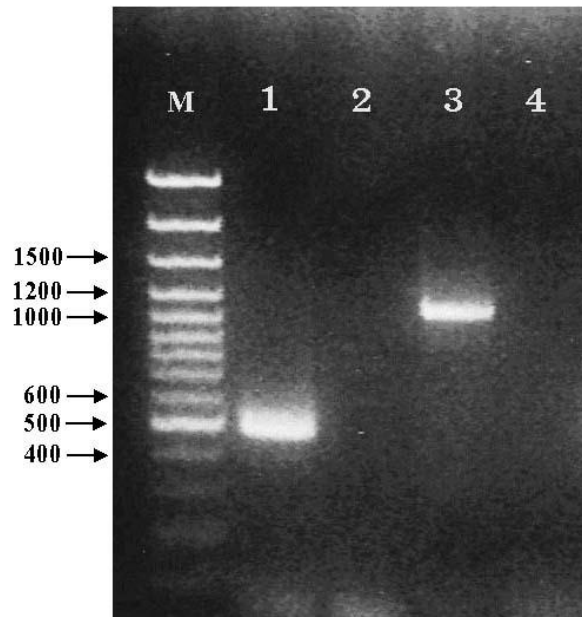
การตรวจสอบ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิด pMDC32-DFRAS พบว่าการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ AaDFRASp32F (GGACTTCGAATCCAAGGACC) และ AaDFRASp32R (AGCAGATGTACCTTCCCTTG) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสอยู่ในยีน AaDFRAS สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส (ภาพที่ 11,12) ซึ่งเป็นขนาดที่ตรงกับค่าคาดหมายนอกจากนี้ได้ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ AaDFRASf (GGTACTAGTGTCCCCGTGCTATCACTGTTC) และ AaDFRASr (GGTGGTCACCTATCAGTTTCTGCCTCTATA) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสอยู่ที่จุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของยีน AaDFRAS สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส (ภาพที่ 11,12) ซึ่งเป็นขนาดที่ตรงกับค่าคาดหมาย และเป็นชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดของยีนที่อยู่ในพลาสมิด pMDC32 จึงสรุปได้ว่าโคโลนีของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin นั้น ได้รับพลาสมิด pMDC32-DFRAS ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่ได้ถูกถ่ายเข้าไปแทรกอยู่

1	CACACACACA CACACATATA TATATATATA TAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GCGCTTTTAT CAGTTTCTGC CTCTATAA&C AACAGCTGGT TATATATAAT
101	CTGCGAGGAT GATGCACAAG GGCACCGTGT GCGTGACGGG CGCTGCCGGG TTCGTTGGCT CATGGCTGAT CATGAGGCTC CTCGAGCAGG GTTACTCTGT
201	CAAGGCCACC GTCCGCGACC CCAGCAACAT GARGAAGGTG AAGCACCTCG TCACCTTCC AGGGGCCGGG AACCGCTGA CCCTCTGGAA GGCCGACCTC
301	GTCGATGAGG ACAGCTTCGA CGAGCCCATC CAAGGCTGCA CCGGCGTCTT CCACGTCGCG ACGCCCATGG ACTTCGAATC CAAGGACCA GAGAGTGAGA
401	TGATCAAGCC GACGATCGAG GGGATGCTGA ACGTGTTCGG GTCGTGTGCG AGGGCGAGCA GCACCGTCCG GCGAGTCGTC TTCACATCCT CGGCCGGCAC
501	GGTCTCCATA CACGAGGGCC GCAGACACCT CTACGACGAG ACCTCCTGGA GCGACGTCGA CTTCTGCAGG GCCAAGAAGA TGACCGGATG GATGTATTTT
601	GTGTCGAAGA CGTTGGCCGA GAAGGCCGGG TGGACTTTG CGGAGAAGA CAACATCGAC TTCATCAGCA TTATCCCCAC CCTAGTC&AC GGCCCTTCG
701	TCATGCCAC CATGCCGCC AGCATGCTCT CCGCCCTCGC CCTCATCACA AGGAACGAGC CGCACTATTC GATCCTGAAC CCGGTGCAGT TCGTCCACCT
801	CGATGACCTC TGCAACGCC ACATCTTCT GTTCGAGTGC CCGACGCCA A&GGGAAGTA CATCTGCTCC TCCCACGAGC TC&CCATCGC CGGCCTCGCC
901	CAGATACTCC GGCAGCGCTA CCCTGAGTTC GACGTCCCA CCGAGTTGG AGACATGGAG GTCCTCGACA TCATAAGCTA CTCGTCCAAG A&GCTCACGG
1001	ACCTAGGCTT TGAGTTCAAG TACAGCTTAG AGGATATGTT TGATGGGGG ATTCACTCCT GCAGAGAGAA GGGCTTGTG CCGCCCGCCA CCAAGGAGCC
1101	ATCATATGCC ACTGAACAAT TAATTGCCAC CGGGCAAGAC AACGGCATT GAGAACAGTG ATAGCACGGG GACCCAA

ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบยีนใน pMDC32

สีดำ : ไพรเมอร์ AaDFRASp32F , AaDFRASp32R ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส

สีฟ้า : ไพรเมอร์ AaDFRASf , AaDFRASr ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1120 คู่เบส



ภาพที่ 12 แสดงแถบดีเอ็นเอของการตรวจสอบเชื้อ *A. tumefaciens* EHA105 ที่ได้รับเวกเตอร์

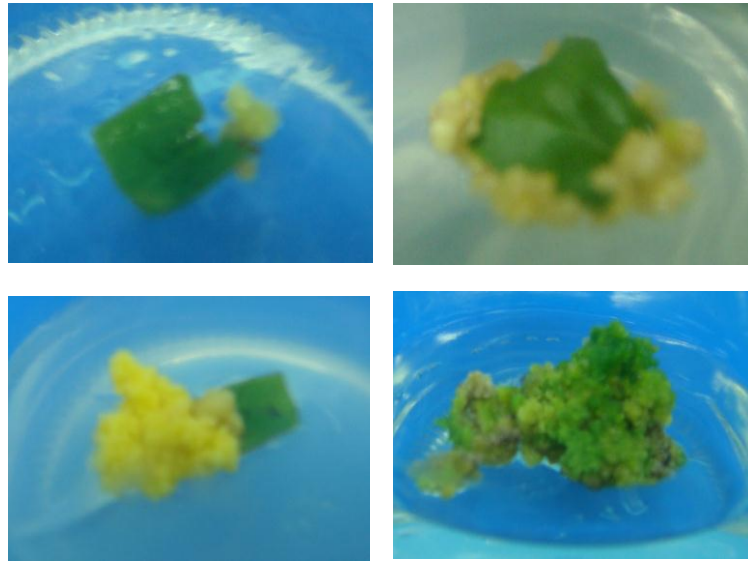
pMDC32-AaDFRAS (ช่องที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอ ขนาด 500 bp จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ AaDFRASp32F+ AaDFRASp32R , ช่องที่ 3 คือแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1120 bp จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ AaDFRASf+AaDFRASr) และ (ช่องที่ 2,4 คือ *A. tumefaciens* EHA105 ที่ไม่ได้รับ pMDC32-AaDFRAS จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ AaDFRASp32F+ AaDFRASp32R และ AaDFRASf+AaDFRASr ตามลำดับโดยมี 100 bp. DNA Ladder เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ

2. การถ่ายยีน AaDFR-AS เข้าสู่หน้าวัว

2.1 การเตรียมพีซีสำหรับใช้ถ่ายยีนและทดสอบวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการนำใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ทำให้ได้ชิ้นส่วนของหน้าวัวในสภาพปลอดเชื้อ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัส และเพิ่มปริมาณแคลลัสให้ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 13) สามารถทดสอบระดับ cefotaxime ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และระดับ

Hygromycinที่เหมาะสมในการคัดเลือกหน้าวัว สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 14)



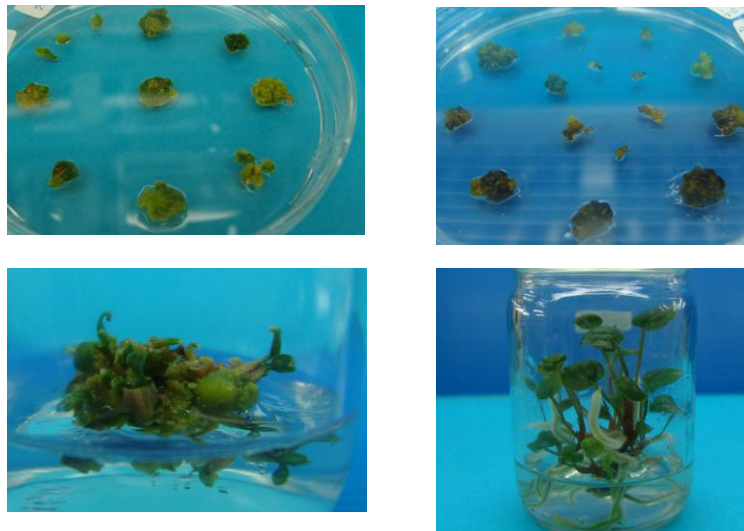
ภาพที่ 13. การเกิดแคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนของหน้าวัว ในอาหารสูตร MS (บนซ้าย=แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 4 เดือน บนขวา=แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 6 เดือน ล่างซ้าย= แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 8 เดือน ล่างขวา= แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 12 เดือน



ภาพที่14. การพัฒนาของต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงใบอ่อนของหน้าวัวพันธุ์ไซเน็ต ในอาหารสูตร MS (ซ้าย = ยอดอ่อน อายุ 6 เดือน กลาง= ต้นที่สมบูรณ์พร้อมออกปลูก ขวา = ต้นที่ย้ายออกปลูก 1 เดือน

2.2 การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

จากการถ่ายยีน DFR ในรูป antisense อยู่ในพลาสมิด pMDC32 (pMDC32-DFRAS) เข้าสู่แคลลัสของหน่ว้าว โดยใช้ Agrobacterium พบว่าสามารถส่งถ่ายยีน DFRAS เข้าสู่หน่ว้าวได้สำเร็จ เมื่อทำการตรวจสอบชิ้นแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารคัดเลือก โดยนำแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าแคลลัสหน่ว้าวที่ได้รับการถ่ายยีนจะเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ ส่วนแคลลัสหน่ว้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด เมื่อชักนำแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนให้พัฒนาเป็นยอด สามารถนำไปตรวจสอบการได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR เมื่อเพาะเลี้ยงต้นที่ผ่านการตรวจสอบต่อเป็นระยะเวลา 12 เดือนก็สามารถจะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมที่จะออกปลูกได้ (ภาพที่ 15)

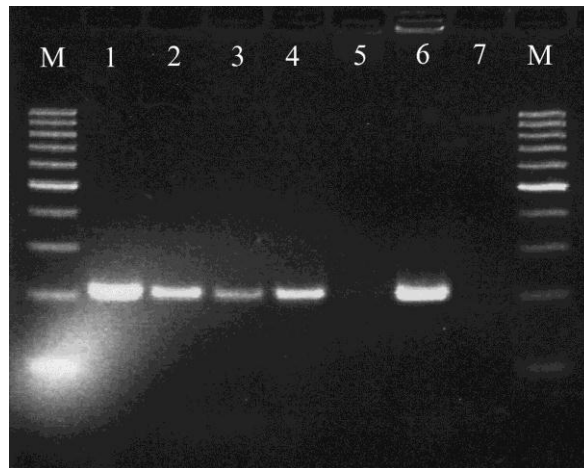


ภาพที่ 15. การพัฒนาของแคลลัสหน่ว้าวพันธุ์ราบิด ที่ได้จากการถ่ายยีน DFR ในรูป antisense (บนซ้าย= แคลลัส หลังได้รับการถ่ายยีน 7 วัน บนขวา=แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 30 วัน ล่างซ้าย= แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก หลังจากนำมาเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ล่างขวา = ต้นที่เกิดจากการพัฒนาของแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก เมื่อนำมาเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 เดือน

3. การตรวจสอบต้นหน่ว้าวที่ได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน DFR ในรูป antisense (DFRAS) ในต้นหน่ว้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOSt204.F และ NOSt204.R พบว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 204 คู่เบส เพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่16) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน DFR และ Nos terminator ซึ่งเป็นชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่หน้าวัว จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ ที่ใช้ตรวจสอบนั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของต้นหน้าวัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่16)



ภาพที่16. ผลการตรวจสอบต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีน DFR ในรูป antisense ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOSter204.F, NOSter204.R (204bp) (1-4 = ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ,5 = ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 6 = AaDFRAS_PMDC32, 7=control, M=100bp marker)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การสร้างชุดยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ที่โคลนได้จาก cDNA ของดอกหน้าวัวให้อยู่ในรูปควบคุมการแสดงออกของยีนแบบกลับทิศ ได้เป็น *pMDC32-DFRAS*. และนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ทำให้ได้ชุดยีน *pMDC32-DFRAS* ที่อยู่ใน *Agrobacterium tumefaciens* สามารถถ่ายฝากสู่หน้าวัวประสบผลสำเร็จ เมื่อนำต้นมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนนี้สามารถนำออกปลูกเพื่อตรวจสอบผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของดอกหน้าวัวในอนาคตต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

ได้ชุดยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* จากดอกหน้าวัวที่อยู่ในรูปควบคุมการแสดงออกของยีนแบบกลับทิศ ที่เป็นของกรมวิชาการเกษตรสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับแต่งสีหน้าวัวโดยวิธีการถ่ายยีน เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอก ได้วิธีการถ่ายยีนสู่หน้าวัว ได้หน้าวัวที่มีสีดอกเปลี่ยนไป นอกจากนี้สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการได้

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ นักปรับปรุงพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร สถาบันการศึกษา

เอกสารอ้างอิง (References)

- กุหลาบ คงทอง ประสาน สืบสุข. และกิ่งกาญจน์ พิชญกุล 2553. การโคลนยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* จากดอกหน้าวัว. หน้า186-195 ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม1. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษย์. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าว ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.
- วีระพงศ์ ลุสิตานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2012. พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain Reaction. Available : www.microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku.../Basic_PCR_June_08.pdf. Access : 11-06-2012.
- Antisense technology. Available from : <http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata>. Accessed : 14 June 2012.
- Brugliera F., Gina Barri-Reweell, Timothy A. Holton and John G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. The Plant Journal 19(4), 441-451.
- Christine Antler.2003. Antisense RNA. Available from : <http://www.scq.ubc.ca>. Accessed : 14 June 2012.
- Eric T. Johnson, Sunhyo Ryu, Hankuil Yi, Byongchul Shin, Hyeonsook Chong and Giltso Choi. 2001. Alteration of single amino acid changes the substrate specificity of *dihydroflavonol 4-reductase*. The Plant Journal 25(3): 325-333.
- QIAGEN. 2003. QIAprep miniprep handbook. pp. 1-23.
[.http://cpe.rsu.ac.th/ut/courses](http://cpe.rsu.ac.th/ut/courses)
http://www.gibthai.com/services/faq_detail.php?page=2&type_id=1
<http://www.med.upenn.edu/lamitinalab/documents/GatewayBPreaction.pdf>

กิจกรรมที่ 3 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา Development of SNP Marker for *Hevea* Clonal Improvement

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง:	นายประสาน สืบสุข	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน:	กุหลาบ คงทอง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	จิราพร แก่นทรัพย์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข	ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา
	รัชนี้ รัตน์วงศ์	ศูนย์วิจัยยางหนองคาย

คำสำคัญ (keywords)

ยางพารา ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ SNP DNA fingerprint

บทคัดย่อ (Abstracts)

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย สามารถสร้างรายได้ให้เกษตรกรทั้งในรูปของน้ำยางและไม้ยาง การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต้องใช้เวลาอันยาวนาน การนำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์เป็นการช่วยย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง การวิจัยนี้ได้ค้นหาตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลิปของยีนในยางพารา 12 พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 โดยการเพิ่มปริมาณซันดิเอ็นเอของยีน 9 ยีนนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสลิปรวม 90 ตำแหน่ง และได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสลิปอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ASA จำนวน 56 ตำแหน่ง ที่สามารถตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ และได้สร้างแผนที่พันธุกรรมของยางพาราโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสลิป 13 ตำแหน่ง ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR 19 ตำแหน่ง และเครื่องหมาย μ -SSR 62 ตำแหน่ง วิเคราะห์ความเชื่อมโยงและตำแหน่งการวางตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ประชากรลูกผสม 96 พบว่าสามารถวิเคราะห์การจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวนชุดจีโนมของยางพารา การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้

The Para rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) is an economically important plant of Thailand for its latex and wood. Breeding of this species takes time. Using molecular marker condenses timelines in the breeding. This study was to discover genetic variation by using single nucleotide polymorphism (SNP) in 12 rubber tree clones, RRIM600, PB217, Chachoengsao 50 (CH50), RRIT251, PB260, RRIC110, RRII118, RII105, RRIT226, BPM24, PB255 and PB235. DNA fragment of 9 genes were amplified and sequencing analyzed. Found that there are total 90 different SNPs. We have developed the simple method to detect SNP by using Allele Specific Amplification (ASA) technique, that we could design 56 PCR primers for ASA technique to determine these clones. We have created genetic map of rubber tree by using 13 SNPs, 19 EST-SSR markers and 62 g-SSR markers to analyze the linkage of DNA marker in 96 hybrid lines. Mapping analysis showed that there are 18 linkage groups in rubber tree genome. The SNPs discovered in this study were able to discriminate among these clones. Furthermore, they are useful in creating DNA fingerprint of the rubber tree and efficient for rubber tree breeding.

บทนำ (Introduction)

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่ให้ผลตอบแทนสูงทั้งในรูปของน้ำยาง และเนื้อไม้ ซึ่งมีการปลูกมากในภาคใต้ และภาคตะวันออก ปัจจุบันพื้นที่ปลูกยางพาราได้ขยายไปในภาคอีสาน และภาคเหนือ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความเหมาะสมในการปลูกยางพาราน้อยกว่าภาคใต้ของประเทศ ซึ่งจะส่งผลถึงปริมาณผลผลิตน้ำยางที่น้อยลงตามมา การปรับปรุงพันธุ์ยางเพื่อให้ได้ยางพันธุ์ดีที่มีผลผลิตสูง ทนทานต่อโรค และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เป็นสิ่งที่จำเป็นมากที่ต้องดำเนินการ ซึ่งกว่าจะได้พันธุ์ยางแต่ละพันธุ์นั้นต้องผ่านกระบวนการผสมพันธุ์และทดสอบพันธุ์ โดยต้องใช้เวลาจนถึง 20 ปี วิธีการช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้น้อยลงนั้นสามารถนำเอาเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ (Marker-assisted selection, MAS) เพื่อช่วยคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ตรงกับความต้องการ โดยไม่จำเป็นต้องดูฟีโนไทป์ของต้นนั้น แต่ที่สำคัญคือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับคัดเลือกนั้น ต้องอยู่ใกล้กับยีนที่สนใจ ยิ่งอยู่ใกล้กับมากเท่าใด ประสิทธิภาพในการใช้เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการก็ยิ่งสูง และมีความแม่นยำมากขึ้น หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นโดยตรง ถือได้ว่าเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด การเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้คัดเลือกพันธุ์นั้น มักจะเลือกจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่บนแผนที่จีโนมที่มีความละเอียดมาก (สุรินทร์, 2552) สำหรับในยางพารานั้นได้มี รายงานแผนที่จีโนมแล้ว แต่ข้อมูลของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ปรากฏบนโครโมโซมแต่ละแท่งนั้นยังมีความละเอียดน้อย ซึ่งจะส่งผลให้บางลักษณะของยีนที่แสดงออกมีความสัมพันธ์น้อยกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ หรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอในยางพาราจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้แผนที่จีโนมที่มีความละเอียดสูง ที่สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้

วิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณที่สำคัญในยางพารา ได้แก่ ผลผลิต การเจริญเติบโต การทนทานต่อโรค การทนต่อความแห้งแล้ง และอื่น ๆ เป็นต้น เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP (Single Nucleotide Polymorphism) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง ที่สามารถใช้จัดทำแผนที่จีโนมให้มีความละเอียดได้สูง เนื่องจากมีกระจายอยู่ทั่วจีโนม จากการศึกษา SNP ในจีโนมมนุษย์ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล dbSNPs สามารถพบ SNP ได้ทุก ๆ 300-500 เบสตลอด (สุรินทร์, 2552) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งบนส่วนที่เป็นยีนหรือส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้นหรือน้อยลง เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP สามารถเริ่มต้นพัฒนาจากลำดับเบส EST ของยางพารา ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยวิธีการตรวจสอบการเกิด SNP สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบส ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ของยางพารา

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. ยางพารา 12 พันธุ์พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235 และประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ (ได้รับการสนับสนุนจาก คุณกรรณิการ์ ชีระวัฒนสุข ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา จ.ฉะเชิงเทรา)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
3. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (BioDrop)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน
5. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation
6. ชุดน้ำยาสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล
7. โปรแกรมสำหรับจัดทำแผนที่พันธุกรรม OneMap
8. ไพรเมอร์ที่ใช้ประกอบการทำแผนที่ยีน ได้แก่ EST-SSR และ g-SSR ที่พัฒนาจากยางพารา (ประสาน และคณะ 2553) และเครื่องหมายสลับที่พัฒนาได้จากการทดลองนี้
9. สารเคมี และเครื่องมือพื้นฐานต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล

วิธีการ

1. การค้นหาตำแหน่งการเกิดสลับ (SNP) ในยางพารา

1.1 การสืบค้นข้อมูลยีนของยางพารา และวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาตัวแทนลำดับเบส

สืบค้นข้อมูลยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI ของยีนยางพารา โดยการวิเคราะห์ Contig Assembly แล้วตัดส่วนของลำดับเบสที่เป็นของ Vector ออก โดยใช้ VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih>.

gov/tools/vecscreen) และนำตัวแทนลำดับเบสที่ต้องการไปออกแบบไพรเมอร์ โดยโปรแกรม Vector NTI (ชนิดระบุระยะเวลาการใช้งาน) และสังเคราะห์ไพรเมอร์ เพื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบยางพาราพันธุ์

นำใบยางพารา 12 พันธุ์พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235 โดยนำใบมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด นำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin Plant II (MACHEREY-NAGEL) จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยแยกด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง BioDrop แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยางพาราด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ PB 217 ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละชนิด ทำการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

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 Taq 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	

1.4 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

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

1.5 การทำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่เหลือจากข้อ 1.4 ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด PCR Purification Kit สำหรับดีเอ็นเอมีเพียงชิ้นเดียว แต่กรณีที่ปรากฏดีเอ็นเอหลายชิ้นจะใช้ชุด Gel Extraction Kit หลังจากตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้อีกครั้งตามข้อ 1.4 และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง BioDrop เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาลำดับเบส

1.6 นำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ส่งหาลำดับเบส (DNA Sequencing Services; <http://base-asia.com>)

1.7 นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อค้นหารูปแบบการมีลำดับเบสที่แตกต่างกันแบบ SNP ระหว่างยาลายพาราพันธุ์ RRIM 600 และ PB 217 เพื่อหาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส SNP

1.8 เมื่อพบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ SNP ระหว่างยาลายพารา 2 พันธุ์ในข้อ 1.7 ให้หาลำดับเบสกับยาลายพารา 10 พันธุ์ ได้แก่ ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 โดยขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.4-1.7

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสปีอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA (Allele Specific Amplification)

2.1 คัดเลือกตำแหน่งการเกิดสปีที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยอาศัยข้อมูลข้อ 1.8

2.2 ออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครอบคลุมตำแหน่งการเกิดสปีที่จะตรวจสอบด้วยเทคนิค ASA โดยใช้โปรแกรม BatchPrimer3 และสังเคราะห์ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ต่อการตรวจสอบ 1 ตำแหน่ง

2.3 สกัดดีเอ็นเอจากยาลายพารา 12 พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235 โดยใช้ชุดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพืช ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้ agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสง ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.4

2.4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยาลายพาราพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเทคนิค PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละชนิด ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.5

2.5 เปรียบเทียบรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตรวจสอบสปีโดยใช้เทคนิค ASA ในยาลายพาราพันธุ์ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235

3. การสร้างแผนที่พันธุกรรม

3.1 นำใบยาลายพาราของประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบดีเอ็นเอ ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.2

3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดีเอ็นเอของยาลายพาราลูกผสม จำนวน 96 พันธุ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละชนิดที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5

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

3.4 นำรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของประชากรลูกผสมทั้งหมด 96 สายพันธุ์กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ที่ได้จากการตรวจสอบ มากำหนดรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ตามตามข้อกำหนดของโปรแกรม OneMap (Wu *et al.*, 2002, Margarido *et al.*, 2007)

2.5 สร้างแผนที่พันธุกรรมของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR และ g-SSR ที่ดำเนินการไปแล้ว (ประสาน และคณะ 2553) นำมาวิเคราะห์ร่วมกันโดยใช้โปรแกรม OneMap (Margarido *et al.*, 2007) ซึ่งทำงานอยู่บนโปรแกรม R โดยกำหนดค่า LOD score เท่ากับ 5 ค่า recombination fraction ที่ 0.35 ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้แบบ Kosambi function และเขียนแผนที่โดยใช้โปรแกรม MapChart 2.2

เวลาและสถานที่

- ระยะเวลาดำเนินการทดลอง ตุลาคม พ.ศ. 2553 – กันยายน พ.ศ.2558)
- สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. การค้นหาตำแหน่งการเกิดสแนป (SNP) ในยางพารา

จากการค้นหาข้อมูล EST ของยางพาราที่ รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI นำมาจัดเก็บไว้ในรูปแบบไฟล์ FASTA และจากการนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับโปรแกรม Blastn และทำการวิเคราะห์ Contig Assembly พบว่าได้กลุ่มของข้อมูล EST ที่มีลำดับเบสเหมือนกันทั้งเส้น หรือเหมือนกันบางส่วน ที่สามารถใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มข้อมูลแต่ละกลุ่มยีน และได้ตัดส่วนของ Vector ที่ปะปนอยู่ทางด้านปลาย 5' และ ปลาย 3' ออก และได้นำข้อมูลลำดับเบสไปออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 455 คู่ สำหรับใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของดีเอ็นเอในยางพารา พันธุ์ RRIM 600 และ PB217 เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ไปทำให้บริสุทธิ์ (purify) โดยการแยกชิ้นดีเอ็นเอจากเจล และส่งหาลำดับเบส พบว่าผลการวิเคราะห์ลำดับเบสระหว่างยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ PB217 มีการปรากฏแห่งของการเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสแนป (SNP) ระหว่างยางพาราทั้งสองพันธุ์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งลำดับเบสเหล่านี้จะใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการตรวจสอบรูปแบบการเกิดการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอชนิด SNP ในยางพาราพันธุ์อื่น ๆ เช่นในพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพิ่มเติมจากที่พบอยู่ในพันธุ์ RRIM600 และ PB217 นอกจากนี้พบว่าลำดับเบสของยีนเดียวกันในแต่ละพันธุ์ จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน ในบางยีนพบการเปลี่ยนแปลงหลายตำแหน่ง แต่บางยีนก็ยังไม่พบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามหากใช้พันธุ์ยางเพิ่มมากขึ้น อาจพบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงเบสได้ ซึ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสแนปพบทั้งในรูปแบบของ homozygous และ heterozygous จากผลของลำดับเบสที่ได้วิเคราะห์

พบว่าบางยีน หรือบางไพรเมอร์นั้นการหาลำดับเบสสามารถทำได้ยาก เนื่องจากยีนนั้นมีลำดับเบสที่ประกอบด้วยลำดับของดีเอ็นเอชนิดเบสซ้ำจำนวนหลายๆ เบส ติดต่อกัน จึงทำให้บางยีนไม่ได้ข้อมูลลำดับเบส หรือได้ข้อมูลยังไม่ครบถ้วน จึงได้คัดเลือกบางยีนสำหรับศึกษาในขั้นต่อไป

จากการค้นหาและวิเคราะห์ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยางพารา ได้ไพรเมอร์ที่ผ่านการออกแบบให้ครอบคลุมตำแหน่งการเกิดสนิป พบว่าตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของแต่ละยีนดังนี้

1.1 ซีนดีเอ็นเอของยีน DnaJ (chaperone DnaJ; Hsp40 (heat shock protein 40 kD)) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน Accession AF085275 ที่ความเหมือน 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น DnaJ protein mRNA ที่แสดงออกในน้ำยางของยางพารา clone pHvDnaJ-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ethylene และเมื่อนำลำดับเบสของยางพาราพันธุ์อื่น ๆ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน DnaJ ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 10 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *DnaJ* (chaperone DnaJ; Hsp40) ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position									
	C174T	G189C	G198T	A303T	A392G	A423G	A444T	G502C	A628G	A752G
RRIM600	C/C	G/G	G/G	T/T	G/A	A/A	T/T	G/C	G/G	G/A
PB217	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	A/A	T/T	C/C	G/G	A/A
RRIT251	T/T	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	A/A	C/C	A/A	G/G
PB260	C/T	G/C	G/T	T/A	A/A	G/A	T/A	G/C	G/G	G/A
RRIC110	C/T	G/C	G/T	T/A	G/A	G/A	T/A	G/C	A/A	-
RRII118	C/T	G/C	G/T	T/A	G/A	G/A	T/A	G/C	A/A	G/A
RRII105	-	-	-	-	A/A	G/A	-	C/C	-	-
RRIT226	C/T	G/C	G/T	T/A	A/A	G/A	T/A	G/C	G/G	G/A
BPM24	C/T	G/C	G/T	T/A	A/A	G/A	T/A	G/C	G/G	-
PB225	T/T	-	-	T/T	A/A	G/A	-	C/C	A/A	-
CH50	-	-	-	-	A/A	G/G	-	C/C	-	-
PB235	C/C	-	-	T/T	A/A	-	-	C/C	A/A	-

1.2 ซีนดีเอ็นเอของยีน Cyclophilin ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน Accession HQ268021 ที่ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น cyclophilin mRNA ที่แสดงออกในน้ำยางของยางพารา clone RY7-33-97 และเมื่อนำลำดับเบสของยางพาราทั้ง 12 พันธุ์ไปวิเคราะห์หาตำแหน่ง

ของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน Cyclophilin ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 2 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน Cyclophilin) ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position	
	C184T	A187G
RRIM600	C/T	G/A
PB217	C/C	G/G
RRIT251	C/C	G/A
PB260	C/T	G/A
RRIC110	C/C	G/G
RRII118	C/C	G/G
RRII105	C/C	G/G
RRIT226	C/C	G/G
BPM24	C/T	G/A
PB225	T/T	A/A
CH50	C/C	G/G
PB235	C/C	G/G

1.3 ซีนดีเอ็นเอของยีน CuZnSOD (*Cu/Zn superoxide dismutase*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์ จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน Accession AF457209 ที่ความเหมือน 97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นยีน Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) mRNA ที่สัมพันธ์กับผลผลิตและสภาวะเครียดในยางพารา และเมื่อนำลำดับเบสของยางพาราทั้ง 12 พันธุ์ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน CuZnSOD ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *Cu/Zn superoxide dismutase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C220T	A384T	A745T	A1006T	G1170T	A1171T	G1199C	A1274C
RRIM600	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
PB217	T/T	T/T	A/A	A/A	G/G	T/T	G/T	A/A
RRIT251	C/T	T/A	T/T	A/A	G/T	T/A	G/C	C/C

PB260	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
RRIC110	C/C	T/A	T/T	A/A	G/T	T/A	G/C	C/A
RRII118	C/T	T/T	A/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
RRII105	C/T	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	C/A
RRIT226	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
BPM24	C/T	T/T	A/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
PB255	C/T	T/T	A/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
CH50	C/T	T/A	T/T	A/T	G/T	T/A	G/C	C/C
PB235	C/T	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	C/A

1.4 ซีนดีเอ็นเอของยีน CCR (*cinnamoyl-CoA reductase*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จาก ยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *cinnamoyl-CoA reductase* mRNA และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับในดีเอ็นเอของยีน CCR ได้ค้นพบ ตำแหน่งการเกิดสลับ 16 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีน *cinnamoyl-CoA reductase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C132T	A231G	A275T	A1780G	A1750T	A1745T	G1710C	A1703G
RRIM600	T/T	G/G	C/C	A/A	T/T	A/A	G/G	G/G
PB217	T/T	G/G	C/C	A/A	T/T	A/T	C/G	A/G
RRIT251	C/T	G/A	C/C	A/G	A/T	A/T	C/G	A/A
PB260	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/G
RRIC110	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/A
RRII118	T/T	G/G	A/T	A/G	A/T	A/T	G/G	A/A
RRII105	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/A
RRIT226	T/T	G/G	T/T	A/A	T/T	A/T	C/G	A/G
BPM24	-	G/G	C/C	A/-	-	-	G/G	-
PB225	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/A
CH50	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/G
PB235	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/G

ตารางที่ 4 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *cinnamoyl-CoA reductase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C1639T	A1637G	A1609G	G1604T	A1600T	C1596T	A1581G	A1537T
RRIM600	C/C	A/A	A/A	G/G	G/G	T/T	A/A	T/T
PB217	C/C	A/A	A/G	G/T	A/G	C/T	A/A	A/T
RRIT251	C/C	A/A	G/G	G/T	A/G	C/T	A/A	A/A
PB260	C/C	-	A/-	G/T	A/G	-	-	-
RRIC110	C/T	-	G/G	T/T	A/A	-	-	-
RRII118	C/T	A/G	G/G	G/G	A/A	T/T	A/G	A/A
RRII105	C/C	-	G/G	T/T	A/A	-	-	-
RRIT226	C/C	A/A	A/G	G/T	A/G	C/T	A/A	A/T
BPM24	C/C	-	A/-	G/G	-	-	-	-
PB225	C/T	-	G/G	T/T	A/A	-	-	-
CH50	C/C	-	A/-	G/T	-	-	-	-
PB235	C/C	-	A/-	G/T	-	-	-	-

1.5 ซีนตีเอ็นเอของยีน *HMGR (hydroxymethylglutaryl coenzyme A)* ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *hydroxymethylglutaryl coenzyme A mRNA* และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน *HMGR* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 11 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *hydroxymethylglutaryl coenzyme A* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	A96G	A292G	G349C	A384C	C425T	C842G	A1325T	C1289T
RRIM600	A/G	A/G	C/G	A/C	C/T	C/G	A/T	C/T
PB217	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	C/G	A/A	C/C
RRIT251	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/T
PB260	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
RRIC110	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C

RRII118	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
RRII105	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
RRIT226	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
BPM24	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
PB225	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
CH50	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
PB235	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/T

1.6 ซีนตีเอ็นเอของยีน *FDP (farnesyl diphosphate synthase isoform)* ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *farnesyl diphosphate synthase isoform* mRNA และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน *FDP* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 13 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *farnesyl diphosphate synthase isoform* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	G997C	C1348T	A1474G	A1596G	A3344G	A3321T	A3323G	C3547T
RRIM600	C/C	C/C	A/G	A/A	A/A	A/A	G/G	T/T
PB217	C/G	C/T	A/A	A/G	A/G	A/A	G/G	T/T
RRIT251	C/G	C/C	A/A	A/G	A/G	A/A	A/G	C/T
PB260	C/C	C/C	A/A	A/G	-	-	-	-
RRIC110	C/G	C/T	A/A	A/G	-	-	-	-
RRII118	C/G	C/T	A/A	A/G	G/G	A/T	G/G	T/T
RRII105	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	-	-	-
RRIT226	C/C	C/C	A/G	A/A	A/A	A/A	G/G	T/T
BPM24	C/G	C/T	A/A	A/G	-	-	-	-
PB225	C/C	C/C	A/A	A/G	-	-	-	-
CH50	C/G	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	T/T
PB235	C/G	C/C	A/A	A/A	A/A	-	-	-

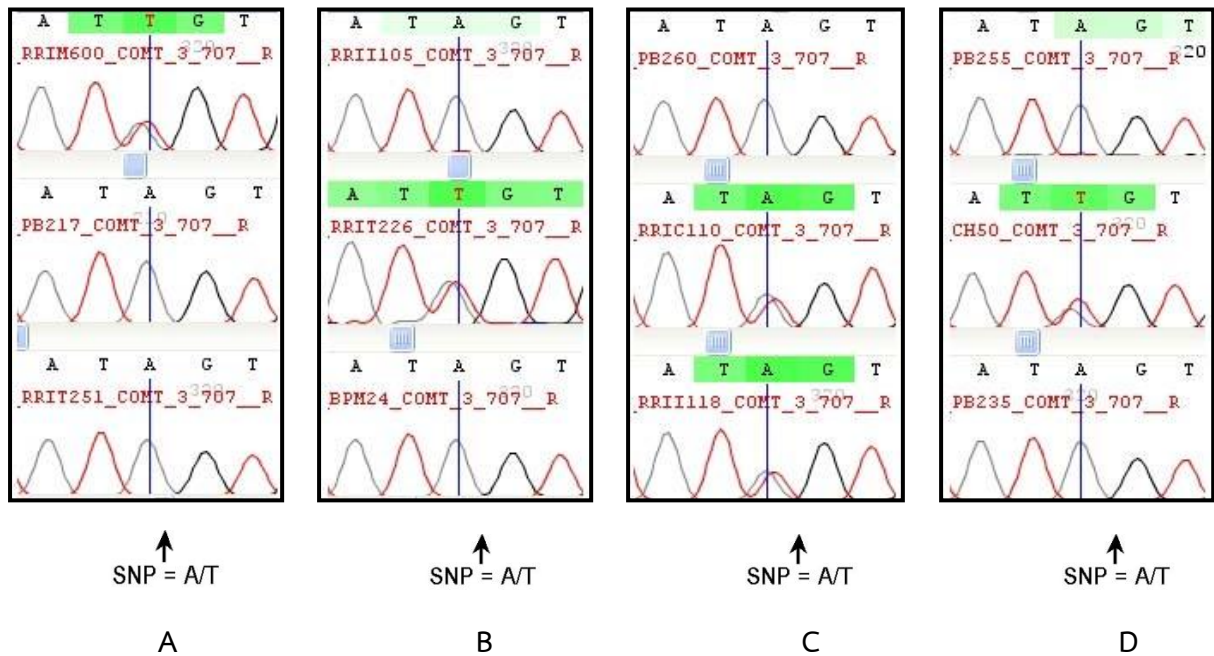
ตารางที่ 6 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *farnesyl diphosphate synthase isoform* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position				
	G3731T	A3752T	C4229T	A4415T	A4655G
RRIM600	G/T	T/T	T/T	A/A	G/G
PB217	G/G	A/T	C/T	A/T	A/G
RRIT251	G/G	A/T	C/T	A/A	A/G
PB260	G/G	-	T/T	A/A	A/G
RRIC110	G/T	-	C/T	A/T	A/G
RRII118	G/G	A/A	C/C	T/T	A/A
RRII105	G/G	-	C/T	A/A	G/G
RRIT226	G/T	T/T	T/T	A/A	A/G
BPM24	G/G	-	C/C	T/T	A/A
PB225	G/T	-	T/T	A/A	G/G
CH50	G/T	T/T	T/T	A/A	A/G
PB235	G/G	-	T/T	A/A	G/G

1.7 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *COMT* (*caffeic acid O-methyltransferase*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์ จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *caffeic acid O-methyltransferase* mRNA และเมื่อนำลำดับเบส ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน *COMT* ได้ค้นพบ การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *COMT* ที่เกิดกับยางพารา 12 พันธุ์ คือ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 เมื่อพิจารณา จากการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ COMT3-707 ในตำแหน่งที่ A302T จะพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่มีลักษณะของเส้น chromatogram ปรากฏอยู่ 2 peaks ในตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่าตำแหน่งนั้นมี genotype เป็น heterozygous แบบ A/T ที่พบได้ในยางพาราพันธุ์ RRIM600 RRIC110 RRII118 RRIT226 และ ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) ส่วนลักษณะของเส้น chromatogram ที่มี 1 peaks ในตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่ามี genotype ที่เป็น homozygous แบบ A/A พบได้ในยางพาราพันธุ์ PB217 RRIT251 PB260 RII105 BPM24 PB255 และ PB235 จะเห็นว่าในตำแหน่งที่ A302T ไม่ปรากฏสนิป genotype ที่เป็น homozygous แบบ TT กับยางพาราทั้ง 12 พันธุ์ (ภาพที่ 1)

การเปรียบเทียบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *COMT* กับยางพารา 12 พันธุ์ จากการใช้ไพรเมอร์ COMT3-707 COMT680-1297 และ COMT1296-1902 พบตำแหน่งที่เกิดสนิป จำนวน 15 ตำแหน่ง คือ C116T A239G A251G G272T A302T C340T C572T G590T A854T A856T C866T C1101T

C1062G A1158G และ G1179C พบตำแหน่งที่มีลำดับเบสแตกต่างกันในยาลพาราคั่วแต่ละพันธุ์ มี genotype แบบ heterozygous คือ A/G A/T C/T และ G/C มี genotype แบบ homozygous คือ A/A C/C G/G และ T/T ดังแสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *COMT* ในพันธุ์ยาลพาราคั่วที่ตำแหน่ง A302T (A: RRIM600, PB217, RRIT251, B: RRII105, RRIT226, BPM24, C: PB260, RRIC110, RRII118, D: PB255, CH50, PB235)

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *caffeate O-methyl-transferase* ในพันธุ์ยาลพาราคั่ว

Varieties	SNP position								
	C136T	A264G	A276G	G297T	A327T	C366T	C601T	G619T	
RRIM600	C/T	G/A	A/A	G/T	T/A	T/T	C/T	T/T	
PB217	C/T	G/G	A/G	T/T	A/A	T/C	T/T	T/G	
RRIT251	C/T	G/G	A/G	T/T	A/A	T/C	T/T	T/G	
PB260	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G	
RRIC110	C/C	G/A	A/G	G/T	T/A	T/C	C/T	T/G	
RRII118	C/C	G/A	A/G	G/T	T/A	T/C	C/T	T/G	
RRII105	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G	
RRIT226	C/T	G/A	A/A	G/T	T/A	T/T	C/T	T/T	
BPM24	C/T	G/G	A/G	T/T	A/A	T/C	T/T	T/G	
PB225	C/C	G/G	A/A	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G	

CH50	C/C	G/A	A/G	G/T	T/A	T/C	C/T	T/G
PB235	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G

ตารางที่ 7 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *caffeate O-methyl-transferase* ในพันธุ์
ยางพารา

Varieties	SNP position							
	A905T	A907T	C917T	C1062T	G1113G	A1209G	G1233C	
RRIM600	A/A	A/A	C/C	C/C	C/G	A/A	G/G	
PB217	A/T	A/T	C/T	C/T	C/C	A/G	G/C	
RRIT251	A/T	A/T	C/T	C/T	C/C	A/G	G/C	
PB260	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	G/G	C/C	
RRIC110	A/A	A/A	C/T	C/T	C/G	A/A	C/C	
RRII118	A/T	A/T	C/T	C/T	C/G	A/G	G/C	
RRII105	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	-	C/C	
RRIT226	A/A	A/A	C/C	C/C	C/G	A/A	G/G	
BPM24	A/T	A/T	C/T	C/T	C/C	A/G	G/C	
PB225	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	G/G	C/C	
CH50	A/T	A/T	C/C	C/T	C/G	A/G	G/G	
PB235	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	G/G	C/C	

1.8 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *ETR1* (*ethylene receptor*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับ *ethylene receptor* และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน *ETR1* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *caffeate O-methyl-transferase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C287T	A553G	C699T	A719G	C754T	G833C	C976T	A1193T
RRIM600	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
PB217	C/C	A/G	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	A/A
RRIT251	C/C	A/A	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	A/A

PB260	C/C	A/G	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T	A/A
RRIC110	C/T	A/G	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
RRII118	C/T	A/A	C/T	A/G	C/T	G/C	C/T	A/T
RRII105	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
RRIT226	C/C	A/G	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T	A/A
BPM24	C/T	A/A	C/T	A/G	C/T	G/C	C/T	A/T
PB225	C/C	A/G	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	A/A
CH50	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
PB235	C/C	A/G	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T	A/A

1.9 ขึ้นดีเอ็นเอของยีน *REF* (*rubber elongation factor*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับ *rubber elongation factor* และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับในดีเอ็นเอของยีน *REF* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสลับ 15 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีน *rubber elongation factor* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position								
	C503T	G509T	A547G	C615T	A916T	C944T	C991T	C1072T	A1221T
RRIM600	T/T	T/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
PB217	C/T	G/T	A/G	C/T	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
RRIT251	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
PB260	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
RRIC110	C/T	T/T	A/G	C/T	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
RRII118	T/T	T/T	G/G	C/T	T/T	T/T	T/T	C/C	A/A
RRII105	T/T	T/T	G/G	C/T	T/T	T/T	T/T	C/C	A/A
RRIT226	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
BPM24	C/T	T/T	A/G	C/T	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
PB225	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
CH50	C/T	T/T	A/G	C/C	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
PB235	C/T	G/T	A/G	C/T	A/T	C/T	C/T	C/T	A/T

จะเห็นได้ว่าจำนวนอัลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปจะมีเพียง 1 ถึง 2 อัลลีลเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่มีจำนวนอัลลีลตั้งแต่ 1-16 อัลลีล (Mateescu *et al.*, 2005) เนื่องจากสนิปเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งเบสเท่านั้น genotype ที่เกิดขึ้นในแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีเพียง 2 รูปแบบ คือ homozygous (A/A C/C G/G T/T) และ heterozygous (A/G C/T G/C A/T G/T A/C) การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปมาใช้จึงต้องการเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ heterozygous genotype สูงสุด เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้แยกความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีนในยางพาราที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา โดยการนำไปทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งการเกิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของไม้ในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ ต่อไป และสามารถนำรูปแบบการเกิดตำแหน่งสนิปของยีนที่ตรวจพบในยางพารา จำนวน 12 พันธุ์ นำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารา เพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ จากผลการทดลองของ Yameun and Boonphakdee (2013) ซึ่งได้จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารา 10 พันธุ์ โดยใช้ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *caffete O-methyl-transferase* นำมาเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *COMT* ด้วยเทคนิค PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด สามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราได้จำนวน 7 พันธุ์ แต่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพาราพันธุ์ PB235 PB255 และ PB260 ออกจากกันได้ ในขณะที่งานวิจัยครั้งนี้ได้พบตำแหน่งสนิปที่ A251G สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพันธุ์ PB255 ที่ให้สนิปแบบ A/G ออกจากพันธุ์ PB235 และ PB260 ที่ให้สนิปแบบ G/G แม้ว่ายางพาราพันธุ์ PB235 และ PB260 ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ด้วยตำแหน่งสนิปของยีน *COMT* ถ้าหากนำตำแหน่งของยีนอื่นมาตรวจสอบร่วมด้วยก็จะสามารถจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ทั้งสองออกจากกันได้ เช่น ผู้วิจัยได้ทำการทดลองการตรวจสนิปของยีน *cyclophilin* ที่ในตำแหน่ง C91T สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ PB235 ที่มีสนิปแบบ C/C และ PB260 ที่มีสนิปแบบ C/T ดังนั้นการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปมาประยุกต์ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารานั้นควรเลือกใช้ตำแหน่งสนิปที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ และได้มาจากยีนหลาย ๆ ตำแหน่ง

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสนิปอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA (Allele Specific Amplification)

จากการค้นหาและวิเคราะห์ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยางพารา ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค ASA เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของเทคนิค ASA และตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 ซีนดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* (chaperone *DnaJ*; Hsp40 (heat shock protein 40 kD))

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 10 ตำแหน่ง ของซีนดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 10 ตำแหน่ง เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิป พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 6 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ได้แก่

2.1.1 ตำแหน่งที่ 70 ใช้ไพรเมอร์ DnaJ_ASP70_T_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มี ลำดับเบสแบบ T และ DnaJ_ASP70_C_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C และมี รูปแบบการเกิดสนิป ดังแสดงเป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค ASA ในภาพที่ 2

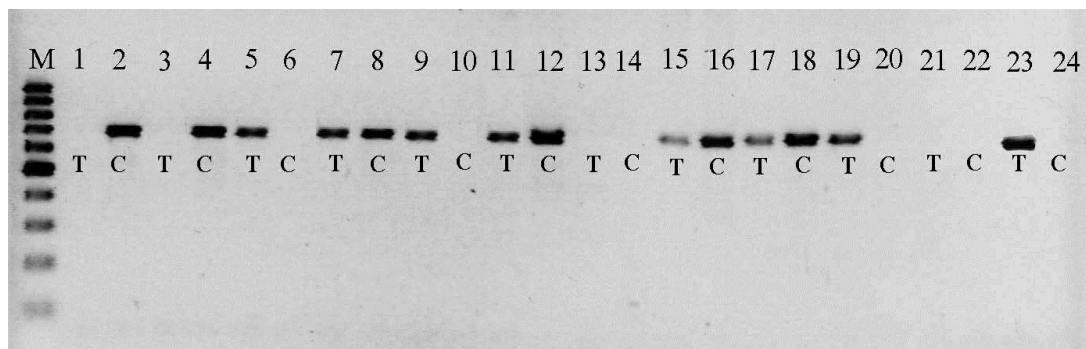
2.1.2 ตำแหน่งที่ 94 ใช้ไพรเมอร์ DnaJ_ASP94_G_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มี ลำดับเบสแบบ G และ DnaJ_ASP94_T_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T

2.1.3 ตำแหน่งที่ 288 ใช้ไพรเมอร์ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP288_G_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มี ลำดับเบสแบบ G และ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP288_A_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A

2.1.4 ตำแหน่งที่ 319 ใช้ไพรเมอร์ DnaJ_ASP319_G_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มี ลำดับเบสแบบ G และ DnaJ_ASP319_A_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A

2.1.5 ตำแหน่งที่ 404 ใช้ไพรเมอร์ DnaJ_ASP404_G_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มี ลำดับเบสแบบ G และ DnaJ_ASP404_C_F กับ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C

2.1.6 ตำแหน่งที่ 520 ใช้ไพรเมอร์ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP520_G_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มี ลำดับเบสแบบ G และ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP520_A_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A



ภาพที่ 2 แสดงการตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในพันธุ์ยางพาราโดยใช้เทคนิค ASA ด้วยไพรเมอร์ DnaJ_ASP70_T_F และ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T และ DnaJ_ASP70_C_F และ DnaJ_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C โดยช่องที่ 1-2=RRIM600, 3-4= PB217, 5-6= RRIT251, 7-8= PB260, 9-10= RRIC110, 11-12= RRII118, 13-14= RRII105, 15-16= RRIT226, 17-18= BPM24, 19-20= PB225, 21-22= CH50, 23-24= PB235 และ M=100 bp. DNA Ladder

2.2 ซีนตีเอ็นเอของยีน *Cyclophilin*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 2 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *Cyclophilin* และได้ ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 2 ตำแหน่ง ไม่พบไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วย เทคนิค ASA ในยางพารา

2.3 ซีนตีเอ็นเอของยีน *CuZnSOD (Cu/Zn superoxide dismutase)*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *CuZnSOD* และได้ออกแบบ ไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 8 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 1 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการ เกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.3.1 ตำแหน่งที่ 582 ใช้ไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_A_R* กับ *CuZnSOD_2F* ตรวจสอบการ เกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 498 คู่เบส และไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_T_F* กับ *CuZnSOD_2R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 230 คู่เบส

2.4 ซีนตีเอ็นเอของยีน *CCR (cinnamoyl-CoA reductase)*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 16 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *CCR* และได้ออกแบบไพร เมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 11 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 6 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการ เกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.4.1 ตำแหน่งที่ 189 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP189_G_F* กับ *CCR_ASP(1)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 176 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP189_A_R* กับ *CCR_ASP(1)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 155 คู่เบส

2.4.2 ตำแหน่งที่ 233 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP233_A_F* กับ *CCR_ASP(1)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 135 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP233_C_F* กับ *CCR_ASP(1)_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 135 คู่เบส

2.4.3 ตำแหน่งที่ 110 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP110_G_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 259 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP110_T_R* กับ *CCR_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 114 คู่เบส

2.4.4 ตำแหน่งที่ 145 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP145_T_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 225 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP145_C_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 225 คู่เบส

2.4.5 ตำแหน่งที่ 209 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP209_G_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 161 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP209_A_R* กับ *CCR_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 205 คู่เบส

2.4.6 ตำแหน่งที่ 216 ใช้ไพรเมอร์ CCR_ASP216_G_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส และไพรเมอร์ CCR_ASP216_C_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส

2.5 ซีนตีเอ็นเอของยีน *HMGR* (hydroxymethylglutaryl coenzyme A)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสลับ 11 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *HMGR* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 9 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลับด้วยเทคนิค ASA ในยุงพารา จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่

2.5.1 ตำแหน่งที่ 96 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP96_G_F กับ HMGR_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 438 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP96_A_F กับ HMGR_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 434 คู่เบส

2.5.2 ตำแหน่งที่ 292 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP292_G_F กับ HMGR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 484 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP292_A_F กับ HMGR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 488 คู่เบส

2.5.3 ตำแหน่งที่ 349 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP349_G_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 471 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP349_C_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 471 คู่เบส

2.5.4 ตำแหน่งที่ 384 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP384_A_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 445 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP384_C_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 445 คู่เบส

2.5.5 ตำแหน่งที่ 425 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP425_T_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 398 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP425_C_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 397 คู่เบส

2.5.6 ตำแหน่งที่ 1289 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1298_T_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1289_C_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส

2.5.7 ตำแหน่งที่ 1549 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_T_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 277 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_C_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 276 คู่เบส

2.5.8 ตำแหน่งที่ 1720 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1720_A_F กับ HMGR_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 91 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1720_C_F กับ HMGR_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 96 คู่เบส

2.5.9 ตำแหน่งที่ 2461 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_T_R กับ HMGR_ASP(8)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_C_R กับ HMGR_ASP(8)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส

2.6 ขึ้นดีเอ็นเอของยีน *FDP (farnesyl diphosphate synthase isoform)*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสปี 13 ตำแหน่งของขึ้นดีเอ็นเอของยีน *FDP* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 15 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสปีด้วยเทคนิค ASA ในบางพารา ได้แก่

2.6.1 ตำแหน่งที่ 872 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP872_G_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 465 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP872_C_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 465 คู่เบส

2.6.2 ตำแหน่งที่ 1220 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1220_T_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 109 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1220_C_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 109 คู่เบส

2.6.3 ตำแหน่งที่ 1346 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1346_G_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1346_A_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส

2.6.4 ตำแหน่งที่ 1468 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1468_G_R กับ FDP_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 265 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1468_A_F กับ FDP_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 265 คู่เบส

2.6.5 ตำแหน่งที่ 3584 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP3584_G_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP3584_T_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 499 คู่เบส

2.6.6 ตำแหน่งที่ 4075 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP4075_T_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 112 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP4075_C_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 110 คู่เบส

2.6.7 ตำแหน่งที่ 4261 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP4261_A_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 309 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP4261_T_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 296 คู่เบส

2.6.8 ตำแหน่งที่ 4500 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP4500_G_F กับ FDP_ASP(5)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 199 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP4500_A_F กับ FDP_ASP(5)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 203 คู่เบส

2.7 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *COMT* (*caffeic acid O-methyltransferase*)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสลิป 15 ตำแหน่งของชั้นดีเอ็นเอของยีน *COMT* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 13 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 9 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลิปด้วยเทคนิค ASA ในบางพารา ได้แก่

2.7.1 ตำแหน่งที่ 116 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP116_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 675 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP116_C_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 675 คู่เบส

2.7.2 ตำแหน่งที่ 251 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP251_G_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 540 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP251_A_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 540 คู่เบส

2.7.3 ตำแหน่งที่ 272 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP272_G_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 520 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP272_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 520 คู่เบส

2.7.4 ตำแหน่งที่ 302 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP302_A_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 493 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP302_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 493 คู่เบส

2.7.5 ตำแหน่งที่ 340 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP340_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 451 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP340_C_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 451 คู่เบส

2.7.6 ตำแหน่งที่ 572 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP572_T_R* กับ *COMT_ASP_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 542 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP572_C_R* กับ *COMT_ASP_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 542 คู่เบส

2.7.7 ตำแหน่งที่ 1011 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP1011_T_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 348 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP1011_C_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 347 คู่เบส

2.7.8 ตำแหน่งที่ 1062 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP1062_G_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP1062_C_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 คู่เบส

2.7.9 ตำแหน่งที่ 1179 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP1179_G_R* กับ *COMT_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 562 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP1179_C_F* กับ *COMT_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 562 คู่เบส

2.8 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *ETR1* (ethylene receptor)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่งของชั้นดีเอ็นเอของยีน *ETR1* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 8 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.8.1 ตำแหน่งที่ C287T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP287_T_R* กับ *ETR1_ASP(1)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 301 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP287_C_R* กับ *ETR1_ASP(1)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 301 คู่เบส

2.8.2 ตำแหน่งที่ A553G ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP553_G_R* กับ *ETR1_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 454 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP553_A_R* กับ *ETR1_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 448 คู่เบส

2.8.3 ตำแหน่งที่ C699T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP699_C_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 352 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP699_T_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 352 คู่เบส

2.8.4 ตำแหน่งที่ A719G ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP719_G_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 373 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP719_A_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 373 คู่เบส

2.8.5 ตำแหน่งที่ C754T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP754_T_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 409 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP754_C_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 407 คู่เบส

2.8.6 ตำแหน่งที่ G833C ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP833_G_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 491 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP833_C_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 489 คู่เบส

2.8.7 ตำแหน่งที่ C976T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP976_T_R* กับ *ETR1_ASP(4)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 405 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP976_C_R* กับ *ETR1_ASP(4)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 401 คู่เบส

2.8.8 ตำแหน่งที่ A1193T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP1193_A_R* กับ *ETR1_ASP(5)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 463 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP1193_T_R* กับ *ETR1_ASP(5)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 461 คู่เบส

2.9 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *REF* (rubber elongation factor)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 9 ตำแหน่งของชั้นดีเอ็นเอของยีน *REF* สามารถออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA ได้ จำนวน 9 ตำแหน่ง และพบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 9 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.9.1 ตำแหน่งที่ C397T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP397_T_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 269 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP397_C_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 269 คู่เบส

2.9.2 ตำแหน่งที่ G403T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP403_G_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 263 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP403_T_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 263 คู่เบส

2.9.3 ตำแหน่งที่ A441G ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP441_G_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 329 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP441_A_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 329 คู่เบส

2.9.4 ตำแหน่งที่ C504T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP504_T_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 392 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP504_C_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 392 คู่เบส

2.9.5 ตำแหน่งที่ A790T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP790_A_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP790_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 501 คู่เบส

2.9.6 ตำแหน่งที่ C871T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP817_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 484 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP817_C_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 484 คู่เบส

2.9.7 ตำแหน่งที่ C863T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP863_T_R กับ REF_ASP(2)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 128 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP863_C_R กับ REF_ASP(2)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 127 คู่เบส

2.9.8 ตำแหน่งที่ C941T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP941_T_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 460 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP941_C_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 458 คู่เบส

2.9.9 ตำแหน่งที่ A1086T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP1086_A_R กับ REF_ASP(3)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 463 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP1086_T_R กับ REF_ASP(3)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 461 คู่เบส

3. การสร้างแผนที่พันธุกรรม

3.1 จากการสกัดดีเอ็นเอจากยางพาราลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ RRIM600 x PB217 จำนวน 96 พันธุ์ พบว่าได้ดีเอ็นเอปริมาณความเข้มข้นมากกว่า 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 ผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอของยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบว่าดีเอ็นเอของทุกพันธุ์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ จึงนำไปใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งสลับด้วยเทคนิค ASA ต่อไป

3.3 ผลจากการวิเคราะห์ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับในดีเอ็นเอของยาลูกผสม 96 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยเทคนิค ASA นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยาลูกผสมแต่ละพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

3.3.1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *FDP* (*farnesyl diphosphate synthase isoform*) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 15 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 8 ตำแหน่ง สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลับด้วยเทคนิค ASA ในยาลูกผสมพันธุ์พ่อแม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A1346G มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1346_G_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1346_A_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ A/G จำนวน 64 พันธุ์ และสลับแบบ A/A จำนวน 32 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ G3584T มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ G/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP3584_G_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP3584_T_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 499 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ G/G จำนวน 41 พันธุ์ และสลับแบบ G/T จำนวน 51 พันธุ์

3.3.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *CCR* (*cinnamoyl-CoA reductase*) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 11 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 6 ตำแหน่ง สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลับด้วยเทคนิค ASA ในยาลูกผสมพันธุ์พ่อแม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ G110T มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ G/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ CCR_ASP110_G_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 259 คู่เบส และไพรเมอร์ CCR_ASP110_T_R กับ CCR_ASP(2)_F ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 114 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ G/G จำนวน 37 พันธุ์ และสลับแบบ G/T จำนวน 59 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ G216C มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ G/C สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ CCR_ASP216_G_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส และไพรเมอร์ CCR_ASP216_C_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ G/G จำนวน 38 พันธุ์ และสลับแบบ G/C จำนวน 58 พันธุ์

3.3.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* (chaperone DnaJ; Hsp40 (heat shock protein 40 kD)) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A288G มีรูปแบบการเกิดสลิปแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP288_G_R ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 309 คู่เบส และไพรเมอร์ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP288_A_R ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 309 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลิปแบบ A/G จำนวน 88 พันธุ์ และสลิปแบบ A/A จำนวน 8 พันธุ์

3.3.4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *HMGR* (hydroxymethylglutaryl coenzyme A) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ C1289T มีรูปแบบการเกิดสลิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1298_T_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1289_C_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลิปแบบ T/T จำนวน 53 พันธุ์ สลิปแบบ C/T จำนวน 13 พันธุ์ และสลิปแบบ C/C จำนวน 30 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C2461T มีรูปแบบการเกิดสลิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_T_R กับ HMGR_ASP(8) ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_C_R กับ HMGR_ASP(8)_F ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลิปแบบ T/T จำนวน 46 พันธุ์ สลิปแบบ C/T จำนวน 49 พันธุ์ และสลิปแบบ C/C จำนวน 1 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C1549T มีรูปแบบการเกิดสลิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_T_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 277 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_C_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิด สลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 276 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลิปแบบ T/T จำนวน 1 พันธุ์ สลิปแบบ C/T จำนวน 70 พันธุ์ และสลิปแบบ C/C จำนวน 25 พันธุ์

3.3.5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *COMT* (caffeic acid O-methyltransferase) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ C340T มีรูปแบบการเกิดสลิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ COMT_ASP340_T_F กับ COMT_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด

451 คู่เบส และไพรเมอร์ COMT_ASP340_C_F กับ COMT_ASP_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 451 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 96 พันธุ์

3.3.6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *CuZnSOD* (*Cu/Zn superoxide dismutase*) จากไพรเมอร์ที่ ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A528T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_A_R* กับ *CuZnSOD_2F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 498 คู่เบส และไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_T_F* กับ *CuZnSOD_2R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับ เบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 230 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ A/T จำนวน 79 พันธุ์ และสนิปแบบ T/T จำนวน 17 พันธุ์

3.3.7 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *ETR1* (*ethylene receptor*) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A719G มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP719_G_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 372 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP719_A_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 372 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการ ปรากฏสนิปแบบ A/A จำนวน 31 พันธุ์ และสนิปแบบ A/G จำนวน 65 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C754T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP754_T_R* R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 408 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP754_C_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบส แบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 406 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบ การปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 2 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 94 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ G833C มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ G/C สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP833_G_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 490 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP833_C_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 488 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการ ปรากฏสนิปแบบ G/G จำนวน 43 พันธุ์ และสนิปแบบ G/C จำนวน 53 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C976T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(4)_F* กับ *ETR1_ASP976_T_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 404 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(4)_F* กับ *ETR1_ASP976_C_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ

C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 400 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 1 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 95 พันธุ์

3.3.8 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *REF (rubber elongation factor)* จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ G403T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ G/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP403_G_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 262 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP403_T_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 262 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ G/T จำนวน 76 พันธุ์ และสนิปแบบ T/T จำนวน 20 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ A441T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP(1)_F กับ REF_ASP441_G_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 328 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP(1)_F กับ REF_ASP441_A_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 328 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ G/G จำนวน 91 พันธุ์ และสนิปแบบ G/A จำนวน 4 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ A790T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP790_A_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 499 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP790_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 95 พันธุ์ และสนิปแบบ A/T จำนวน 1 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C817T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP817_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 483 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP817_C_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 483 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 44 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 52 พันธุ์

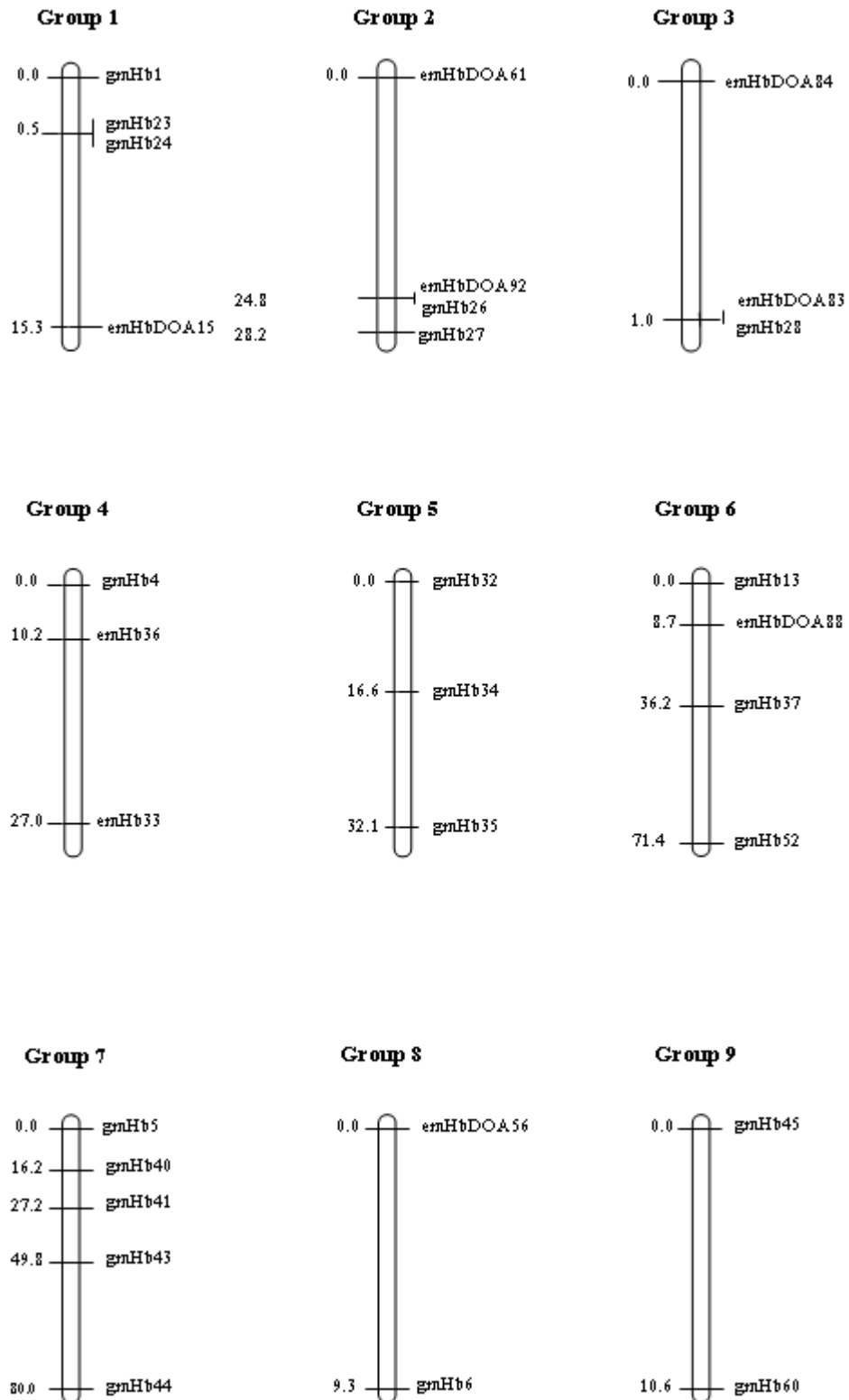
- ตำแหน่งที่ C863T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP(2)_F กับ REF_ASP863_T_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 127 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP(2)_F กับ REF_ASP863_C_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 126 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 3 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 93 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C941T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP941_T_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 459 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP941_C_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้

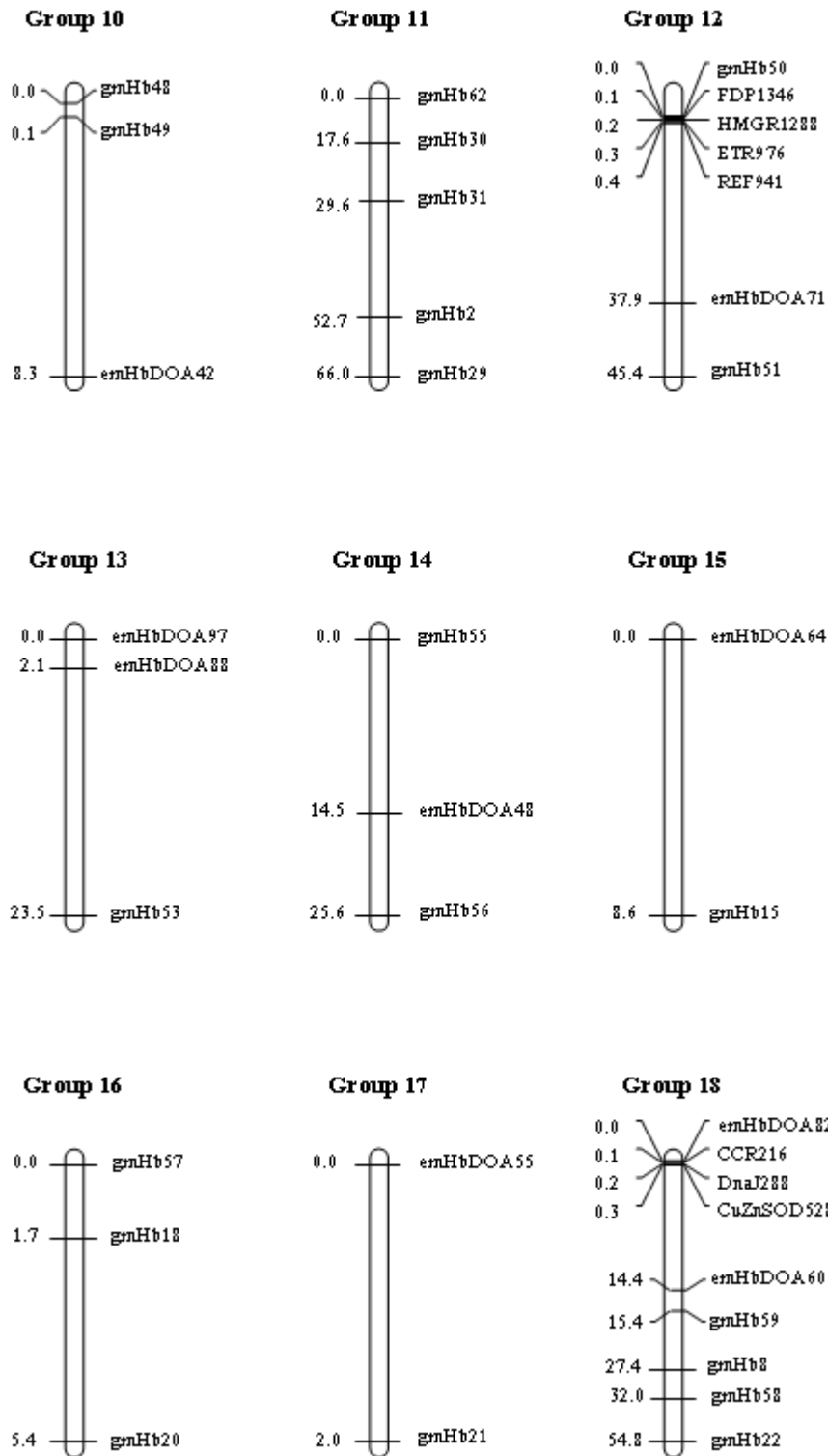
ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 457 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลิปแบบ C/C จำนวน 20 พันธุ์ และสลิปแบบ C/T จำนวน 76 พันธุ์

3.4 การสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายสลิป จำนวน 13 ตำแหน่ง ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR (emHbDOA) จำนวน 19 ตำแหน่ง และเครื่องหมาย g-SSR (gmHb) จำนวน 62 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 94 ตำแหน่ง ได้นำมาวิเคราะห์ความเชื่อมโยง (linkage) ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ประชากรลูกผสม 96 สายพันธุ์ และทำการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายครั้งละ 2 เครื่องหมาย และวิเคราะห์ตำแหน่งการวางตัวของแต่ละเครื่องหมาย โดยใช้โปรแกรม OneMap (Margarido *et al.*, 2007) ซึ่งทำงานอยู่บนโปรแกรม R โดยกำหนดค่า LOD score เท่ากับ 5 ค่า recombination fraction ที่ 0.35 ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้แบบ Kosambi function การวิเคราะห์อาศัยหลักการที่ว่า ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ต่างโครโมโซมกัน การแยกตัวจะเป็นอิสระต่อกัน (independent assortment) แต่ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านั้นอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซมเดียวกัน การแยกตัวจะไม่เป็นอิสระ ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของทั้งสองตำแหน่งนั้น ถ้าอยู่ใกล้กันมากโอกาสจะเกิดรีคอมบิเนชันก็น้อย จึงมักไปด้วยกัน

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 94 ตำแหน่ง พบว่าเครื่องหมายที่วิเคราะห์ความเชื่อมโยงได้ จำนวน 67 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สลิป จำนวน 7 ตำแหน่ง เครื่องหมายชนิด EST-SSR จำนวน 16 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด g-SSR จำนวน 44 เครื่องหมาย ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่สามารถวิเคราะห์ความเชื่อมโยงได้มีจำนวน 27 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สลิป จำนวน 6 ตำแหน่ง เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จำนวน 3 ตำแหน่ง และเครื่องหมายโมเลกุล g-SSR จำนวน 18 ตำแหน่ง โดยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 67 ตำแหน่ง สามารถวิเคราะห์การจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวน haploid genome ของยางพารา ดังแสดงในภาพที่ 3 แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือโครโมโซมเดียวกันนั้น จะมีแนวโน้มที่จะแยกตัวไปด้วยกัน (co-segregation) แต่ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ห่างกันมาก หรือต่างกลุ่มกัน จะมีการแยกตัวเป็นอิสระต่อกัน



ภาพที่ 3 แสดงแผนที่พันธุกรรมของยางพาราที่สร้างจากประชากรลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่างยางพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR และ g-SSR



ภาพที่ 2 (ต่อ) แสดงแผนที่พันธุกรรมของยุงพาราที่สร้างจากประชากรลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่าง ยุงพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสลับ EST-SSR และ g-SSR

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน 9 ยีน ในยางพารา 12 พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RR1118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 เมื่อผ่านการนำเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของยีน และวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสนิปรวม 90 ตำแหน่ง และได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสนิปอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ASA จำนวน 56 ตำแหน่ง ที่สามารถตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ และได้สร้างแผนที่พันธุกรรมของยางพาราโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป 13 ตำแหน่ง ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR 19 ตำแหน่ง และเครื่องหมาย g-SSR 62 ตำแหน่ง วิเคราะห์ความเชื่อมโยงและตำแหน่งการวางตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวน haploid genome ของยางพารา การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีนในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ จัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราเพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมคุณสมบัติของยางพารา
2. การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีนในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ สามารถนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ยางพาราต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง (References)

- ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง และ กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2553. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จากยางพารา. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552. หน้า 18-33.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ พิมพ์ครั้งที่ 1. 269 หน้า.

- Margarido, G.R.A., Souza, A.P. and Garcia, A.A.F. 2007. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* 144: 78-79.
- Mateescu, R.G., Z. Zhang, K. Tsai, J. Phavaphutanon, N.I. Burton-Wurster, G. Lust, R. Quaas, K. Murphy, G.M. Acland and R.J. Todhunter. 2005. Analysis of allele fidelity, polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. *J. Hered.* 96: 847-853.
- Wu, R., Ma, C.X., Painter, I. and Zeng, Z.B. 2002. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*. 61:349-363.
- Yameun, N. and C. Boonphakdee. 2013. DNA fingerprint of the Para Rubber Trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) Based on partial sequences of the caffeate O-methyl-transferase. *Thai J. Genet.* 5(1): 262-265.

การทดลองที่ 3.2

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

The Use of Molecular Markers to Assess the Genetic Diversity of Waxy Corn for Plants Breeding.

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง:

นายประสาน สืบสุข

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน:

กุหลาบ คงทอง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

จิราพร แก่นทรัพย์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กิตติภพ วายุภาพ

สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

คำสำคัญ (keywords)

เครื่องหมายโมเลกุล ข้าวโพด การปรับปรุงพันธุ์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ fingerprint DNA

บทคัดย่อ (Abstracts)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว 186 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ที่เลือกใช้ทั้งหมด 24 คู่ ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 228 ตำแหน่ง ไพรเมอร์ต่างชนิดกันทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งอาจมีความเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แต่ละไพรเมอร์มีโอกาสที่จะพบค่าความหลากหลาย (PIC) ตั้งแต่ 0.52-0.91 ผลการวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของข้าวโพดทั้งหมด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 1.00 ผลของการวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA แล้วเขียนแผนภูมิ Dendrogram ด้วยวิธีการของ SAHN ทำให้การจัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 5 กลุ่ม ความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวโพดด้วยผลของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จึงเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด และเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพด

The use of molecular markers to assess the genetic diversity of 186 waxy corn accessions. A total of 24 SSR primer pairs were applied in this study can detected a total of 228 polymorphic alleles. The polymorphism information contents (PIC) for SSR primer varied from 0.52-0.91. In this study showed a genetic similarity coefficient in the range of 0.70 to 1.00 among all accessions. By SM similarity coefficient method and UPGMA cluster analysis, the dendrogram generated from the SAHN clustering could be separated into five groups. The different genotype based on SSR markers could be advantaged to the waxy corn breeding programs and genetic identity of the variety for reference variety checking.

บทนำ (Introduction)

ข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays ceratina*) จัดเป็นข้าวโพดฝักสดที่ได้รับความนิยมบริโภคในหลายประเทศของภาคพื้นเอเชีย ลักษณะเมล็ดมีสีขุ่นทึบแสง แป้งในเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวจัดเป็นแป้งอ่อน (soft starch) มีลักษณะเมล็ดที่เหนียวนุ่ม (Nuffer *et.al.*, 1968 and Crookston, 1979) เนื่องจากมีปริมาณ amylopectin สูง นอกจากนี้ยังมี water soluble polysaccharides สูงทำให้น่ารับประทาน ในประเทศไทย ข้าวโพดข้าวเหนียว รวมถึงข้าวโพดเทียน ส่วนใหญ่ปลูกเพื่อการบริโภคฝักสดภายในประเทศเท่านั้น มีการปลูกทั่วไปทุกภาคของประเทศ นอกจากนี้ประเทศไทยได้เริ่มส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไปจำหน่ายที่ประเทศเวียดนาม และมีการทดสอบพันธุ์ใหม่ๆ ในประเทศจีน (<http://pikul.lib.ku.ac.th>) ความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ที่อยู่ที่การมีเชื้อพันธุกรรมที่หลากหลาย เชื้อพันธุกรรมข้าวโพด ในปัจจุบันมี 2 กลุ่มคือ 1) เชื้อพันธุกรรมที่เป็นพันธุ์พื้นเมือง โดยประเทศจีน พม่า ไทย และเวียดนาม เป็นแหล่งเชื้อพันธุที่สำคัญของข้าวโพดฝักสด โดยเฉพาะข้าวโพดเทียน และข้าวโพดข้าวเหนียว ที่มีความหลากหลายทั้งขนาดฝัก รูปทรงฝัก สีเมล็ด และจำนวนแถวของเมล็ดในฝัก เช่น ข้าวโพดเทียนฝักเล็ก สีขาว สีเหลือง สีดำ ข้าวโพดข้าวเหนียวแปดแถว ข้าวโพดข้าวเหนียวรูปทรงดอกบัว เป็นต้น และ 2) เชื้อพันธุกรรมกลุ่มพันธุ์การค้าของประเทศต่างๆ ที่พัฒนาจากพันธุ์พื้นเมืองให้มีลักษณะดีตามความต้องการของผู้บริโภคและผู้ปลูก จากความหลากหลายของเชื้อพันธุดังกล่าว หากนำมาสร้างพันธุ์ใหม่จะได้พันธุ์ดีตามลักษณะที่ต้องการ ช่วยสร้างทางเลือกใหม่สำหรับผู้ปลูก โรงงานแปรรูป และผู้บริโภค รวมทั้งเป็นการสร้างโอกาสด้านการตลาดเพิ่มขึ้น เชื้อพันธุกรรมเป็นหัวใจสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะต่าง ๆ ตามต้องการ จึงต้องมีการจัดการเชื้อพันธุกรรม ได้แก่ การจัดหาและเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรม การประเมินลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อพันธุกรรมที่เก็บรวบรวม เช่น ความต้านทานต่อโรคต่าง ๆ ข้อมูลเหล่านี้ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์คัดเลือกเชื้อพันธุกรรม เพื่อนำไปปรับปรุงหรือผสมกับสายพันธุ์อื่นๆ เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ดีต่อไป (<http://library.stks.or.th>)

การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของเชื้อพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวที่รวบรวมไว้ ส่วนใหญ่เป็นการประเมินจากลักษณะทางฟีโนไทป์ รวมถึงลักษณะทางการเกษตรต่าง ๆ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาและพื้นที่ในการศึกษา แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวในระดับดีเอ็นเอ ทำให้การใช้ประโยชน์

จากเชื้อพันธุกรรมได้ไม่เต็มที่มากนัก นอกจากนี้การจำแนกด้วยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจให้ข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง เพราะลักษณะบางอย่างแยกจากกันได้ยาก บางลักษณะอาจจะเป็นผลจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่แตกต่างกัน การประเมินลักษณะประจำพันธุ์ที่ถูกต้องจะส่งผลดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งงานปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งนอกจากต้องมีการบ่งบอกพันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์ที่ถูกต้องแม่นยำแล้ว ยังต้องมีข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอีกด้วย เพื่อการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม การนำความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอมาใช้เป็นข้อมูลประกอบหรือสนับสนุนข้อมูลลักษณะภายนอก จึงทำให้การจำแนกพันธุ์มีความแม่นยำ รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะ ซึ่งลักษณะภายนอกไม่สามารถแยกได้ทั้งหมด การหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีที่ตอบสนองความต้องการดังกล่าวได้เป็นอย่างดี สามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันลักษณะจำเพาะของพันธุ์ต่าง ๆ ได้ รวมทั้งเป็นฐานข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลในระดับดีเอ็นเอเพื่อสร้างเอกลักษณ์เฉพาะประจำพันธุ์พืชหลายชนิด สำหรับใช้ตรวจสอบข้อมูลพันธุกรรม และสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมสำหรับพันธุ์ของตนไว้เพื่อเป็นฐานข้อมูลอ้างอิง และจดทะเบียนพันธุ์เพื่อเป็นตัวยืนยันเมื่อมีการตรวจสอบสายพันธุ์ (ศุจิรัตน์ และคณะ 2552)

SSR (Simple Sequence Repeta) หรือ Microsatellite เป็นเบสซ้ำสั้นจำนวน 1-6 เบส ที่กระจายอยู่จำนวนมากในสายดีเอ็นเอ จากการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงพบส่วนที่เป็น microsatellite มีทั้งส่วนของลำดับดีเอ็นเอที่มีการถอดรหัส และไม่มีการถอดรหัส โดยความถี่ของการเกิด microsatellite ที่มีรูปแบบต่างๆ สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ที่นำไปใช้กันอย่างกว้างขวางในการวิจัยทางพันธุศาสตร์ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การสร้างแผนที่ยีน การติดตามยีน และการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ในข้าวโพดจะพบลำดับซ้ำของเบส (GT) n และ (AG) n ในปริมาณที่มาก (10^4 - 10^5 ซุดซ้ำ) Microsatellite ได้มีการพัฒนาและนำมาใช้สร้างแผนที่ยีนในธัญพืชหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) (Liu *et al.*, 1996) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) (Senior *et al.*, 1996) ข้าว (*Oryza sativa* L.) (McCouch *et al.*, 1997; Temnykh *et al.*, 1999), ข้าวสาลีที่มีโครโมโซม 6 ซุด (*Triticum aestivum* L.) (Roder *et al.*, 1998) ซึ่งแผนที่ยีนเหล่านี้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางการเกษตร นอกจากนี้ microsatellite ได้นำไปใช้ตรวจสอบระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถเพิ่มความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ได้ ตัวอย่างการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืช เช่น ข้าว (Cho *et al.*, 2000) ข้าวโพด (Kantety *et al.*, 1995, Chin *et al.*, 1996, วันชัย และคณะ 2554, ประสาน และคณะ 2554) ข้าวบาร์เลย์ (Russell *et al.*, 1997) ข้าวสาลี (Eujayl *et al.*, 2001) งา (บุชากร, 2549) ใผ่ป่า (รังสัน และสุจิตรา 2548)

ดังนั้นการศึกษาคำนี้จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สำหรับใช้ประกอบการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

- ตัวอย่างใบและเมล็ดของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จ.ชัยนาท ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชื่อพันธุ์กรรมข้าวโพดจำนวน 186 พันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
1	ชั้นคาไลน์ อยุธยา	DOACN01
2	ข้าวเหนียวอยุธยา	DOACN02
3	ข้าวเหนียว 8 แถว สิงห์บุรี	DOACN03
4	ชั้นคาไลน์ สิงห์บุรี	DOACN04
5	ข้าวเหนียวนครปฐม	DOACN05
6	ตะไต้ก้านยาวอ่างทอง	DOACN06
7	ตะไต้ก้านยาวอ่างทอง	DOACN07
8	ข้าวเหนียวอ่างทอง	DOACN08
9	ข้าวเหนียวสวน	DOACN09
10	ตะไต้ก้านยาว ลพบุรี	DOACN10
11	ข้าวเหนียวลพบุรี	DOACN11
12	ข้าวเหนียวลพบุรี	DOACN12
13	ข้าวเหนียวลพบุรี	DOACN13
14	ข้าวเหนียวนครสวรรค์	DOACN14
15	ข้าวเหนียวนครสวรรค์	DOACN15
16	คราบงูนครสวรรค์	DOACN16
17	อีโล้น อุทัยธานี	DOACN17
18	กลีกรหลัก 6ปทุมธานี	DOACN18
19	ตะไต้#26	DOACN19
20	เกษตรขาว	DOACN20
21	PHILIPPINES GLUTIMOUS SYN #20	DOACN21

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
22	GLUTINOUS DMR COMP.	DOACN22
23	GLUTINOUS DMR COMP.POP #41B	DOACN23
24	GLUTINOUS DMR COMP.POP #41C	DOACN24
25	GLUTINOUS SYN #22	DOACN25
26	GLUTINOUS SYN #(ฟิลิปปินส์)	DOACN26
27	LOS BANOS	DOACN27
28	MACAPUNO ฟิลิปปินส์	DOACN28
29	NO-33	DOACN29
30	NO-34	DOACN30
31	NO-35	DOACN31
32	NO-36	DOACN32
33	NO-37	DOACN33
34	NO-38	DOACN34
35	NO-39	DOACN35
36	NO-41	DOACN36
37	NO-42	DOACN37
38	NO-43	DOACN38
39	NO-44	DOACN39
40	NO-45	DOACN40
41	NO-46	DOACN41
42	NO-47	DOACN42
43	NO-48	DOACN43
44	NO-49	DOACN44
45	NO-50	DOACN45
46	NO-51	DOACN46
47	NO-52	DOACN47
48	NO-53	DOACN48

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
49	NO-56	DOACN49
50	ข้าวเหนียวหัวจุก อ. ท่าบ่อ จ. หนองคาย	DOACN50
51	ข้าวโพดเหนียวหัวจุก อ. ท่าบ่อ จ. หนองคาย	DOACN51
52	ข้าวโพดเหนียวบ้านท่าแพง จ.อุดรธานี	DOACN52
53	ข้าวโพดเทียน(ข้าวโพดน้อย) จ.ขอนแก่น	DOACN53
54	ข้าวเหนียวขาว จ. พิษณุโลก	DOACN54
55	ข้าวเหนียว จ. ชัยนาท	DOACN55
56	ข้าวเหนียวพระราชทาน	DOACN56
57	ข้าวเหนียว จ. เชียงราย	DOACN57
58	สำลี 8 แฉก	DOACN58
59	สำลี อ.สวรรคบุรี จ. ชัยนาท	DOACN59
60	เทียนเหลือง จ.นครสวรรค์	DOACN60
61	NO -1	DOACN61
62	NO -2	DOACN62
63	NO -3	DOACN63
64	NO -4	DOACN64
65	NO -5 (ขาว)	DOACN65
66	NO -5 (เหลือง)	DOACN66
67	NO -5 (ม่วง)	DOACN67
68	NO - 6	DOACN68
69	NO - 7	DOACN69
70	NO - 8	DOACN70
71	NO - 9	DOACN71
72	NO - 11	DOACN72
73	NO - 12	DOACN73
74	NO - 14	DOACN74
75	NO -15	DOACN75

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
76	NO -16	DOACN76
77	NO -17	DOACN77
78	NO -19	DOACN78
79	NO -21	DOACN79
80	NO -22	DOACN80
81	NO -23	DOACN81
82	NO -24	DOACN82
83	NO -25	DOACN83
84	NO -27	DOACN84
85	NO -29	DOACN85
86	NO - 30	DOACN86
87	NO -31	DOACN87
88	ข้าวโพดเทียน พันธุ์นิปปคบางกล้า จ. ฉะเชิงเทรา	DOACN88
89	NO NAME	DOACN89
90	ข้าวโพดเทียนเชียงตุง	DOACN90
91	CNTY DMR	DOACN92
92	ST)-1-1-1-30-B-B-B	4001
93	ST)-2-B-2-42-B-B-B	4003
94	ST)-8-1-B-22-1-B-B	4007
95	ST(g))-1-1-1-30-B-1-B	4019
96	ST(g))-2-B-1-2-47-1-1-B-B	4023
97	ST(g))-4-1-50-B-B-B	4025
98	M80-1(tg)-B	4036
99	STM)-1-3-18-1-1-B	4037
100	STM)-2-4-19-1-B	4038
101	STM)-4-2-21-1-B	4039
102	SJ)-1-4-39-B-B-B	4042

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
103	SJ)-4-1-42-B-B-B	4043
104	SJ)-4-2-42-B-1-B	4044
105	SL)-1-44-B-1	4054
106	SL)-1-44-B-2	4055
107	SL)-1-44-B-B(y)	4060
108	CNK(s)-2-1-16-B-B-B	4061
109	CNK(s)-3-1-1-1-1-B-B	4062
110	CNK(s)-5-1-B-1-B-B	4063
111	CNW80-4-1-3-B-B	4118
112	CNW09(s)-2-1-B-B	4124
113	CNW09(s)-10-B-1-B	4130
114	M80-1-B-B-B	4185
115	M80-2-B-1-B	4186
116	M80-3-B-B-B	4191
117	LB50(s)-1-B-B(w)	4197
118	WALB(s)-1-5-1-1-B(v)	4201
119	WALB (s)-2-3-B-B	4207
120	WALB(s)-2-14-B-B(w)	4216
121	WALB(s)-2-22-B-B-4(V)	4234
122	WALB(s)-2-31-1-B-1(y)	4246
123	LBWX09(s)-50-1-B-1-B(w)	4250
124	LBWX09(s)-50-1-B-2-B-B(w)	4254
125	LBWX09(s)-50-1-B-3-B-B(v)	4256
126	LBWX09(s)-50-1-B-4-B-B(v)	4259
127	LBWX09(s)-50-1-B-B-B(Y)	4265
128	EWS4780-4-B-B-B(v)	4266
129	EWS4780-5-B-B-B(w)	4267

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
130	EWS4780-6-B-1(v)	4268
131	EWS4780-9-B-1-B(v)	4275
132	EWS4780-9-B-1-B(w)	4276
133	KRWI045(s)-B-43-B-B-B	4281
134	KRWI047(s)-B-1-B	4282
135	KRWI007721-2(s)-B-37-1	4283
136	TK8)-B-50-B-1-B	4284
137	TK8)-B-50-B-2-B	4285
138	MP)-1-B-B-B	4288
139	MP)-1-B-2-B	4289
140	TNG/H3)-1-B-1(b)	4310
141	TNG/H3)-1-B-4(y)	4315
142	TNG/H3)-6-1-B(b)	4318
143	TNG/H3)-B-B-B(w)	4323
144	TNG/H3)-25-B-B(b)	4336
145	NGL)-B-B-B(v)	4353
146	NGL)-B-B-B(w)	4355
147	NGL)-B-1-B-B	4357
148	TTCN)-3-B-B	4363
149	TTCN)-4-B-1(v)	4364
150	TTCN)-4-B-B(w)	4366
151	KJ)-B-B-B(b)	4386
152	KB)-4-8-B-35-B-B	4388
153	KA54)-1-B(w)	4389
154	KA54)-1-B(y)	4390
155	KA54)-1-B(v)	4391
156	KA54)-B-B(Y)	4399

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
157	KCM)-B-B-B	4400
158	KCM)-B-B-B	4401
159	KL54)-B-1(V)	4402
160	KL54)-B-B(W)	4406
161	KL54)-B-B(v)(W)	4410
162	KL54)-B-B(v)	4412
163	KL54)-B(V)(w)	4413
164	KL54)-B-B(V)(v)	4414
165	PK(v))-1(V)	4420
166	PK(v))-2(w)	4422
167	PK(v))-3(w)	4424
168	tT)-1-1-B(v)	4454
169	tT)-1-1-B(y)	4455
170	tG54)-1-1-B(y)	4456
171	tG54)-1-2-B(y)	4457
172	tG54)-1-3-B(y)	4458
173	tG54)-1-4-B(y)	4459
174	tG54)-1-6-B-B(y)	4460
175	tAY54)-1-B(y)	4461
176	tAY54)-2-B(y)	4462
177	tAY54)-2-B(w)	4463
178	tAY54)-3-B(w)	4464
179	tAY54)-3-B(y)	4465
180	tSU) P'เป็ยร์	4466
181	Agwx20(w))-B-44-B	4467
182	ST)-36-1-B-2-101-1-38-B-B	4470
183	WPB)-80-5-1-1-53-B-1-B	4471

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
184	tAT	4472
185	LB50)-1	4475
186	M80)-1	4479

2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
3. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (BioDrop)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน
5. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation
6. ชุดน้ำยาสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล
7. ชุดโปรแกรมสำหรับจัดวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม NTSYSpc 2.2
8. ไพรเมอร์ SSR ที่พัฒนาจากข้าวโพด (<http://www.maizegdb.org/>)
9. สารเคมี และเครื่องมือพื้นฐานต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพด

นำใบข้าวโพดพันธุ์ต่างๆ จำนวน 186 พันธุ์ ตามที่แสดงในตารางที่ 1 พันธุ์ละ 10 ต้น มาบดรวมกันด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด นำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยแยกด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยา BioDrop แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ (ตารางที่ 1) ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 24 คู่ (รายละเอียดชื่อและลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 2) ทำการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ 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. 2 μM Forward Primer	1	ไมโครลิตร
5. 5 μM Reverse Primer	1	ไมโครลิตร

6. 5 μ M Fluorescent Label Primer	1	ไมโครลิตร
7. ดีเอ็นเอต้นแบบ	2	ไมโครลิตร
8. 5 U/ μ l Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.2	ไมโครลิตร
9. เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ	20	ไมโครลิตร

(Forward Primer ใช้ไพรเมอร์ชนิดที่เติมเบสทางด้านปลาย 5' จำนวน 20 เบส เพื่อการตรวจสอบด้วยสารเรืองแสง FAM, HEX, TAMRA, ROX)

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น

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

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

3. การตรวจหาความแตกต่างขนาดชิ้นดีเอ็นเอแบบละเอียด

นำส่งตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณได้ในข้อ 2 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งเป็นการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอแบบละเอียดโดยวิธี electrophoresis แบบ capillary จากนั้นนำรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ในแต่ละพันธุ์ ไปแปลงข้อมูลให้เป็นตัวเลข โดยเลข 1 (มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ) และเลข 0 (ไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ) จากนั้นวิเคราะห์หาจำนวนอัลลีล และคำนวณค่าความถี่ของแต่ละรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ และหาค่า Polymorphic Information Contents ($PICs=1-\sum p^2$) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงโอกาสที่จะพบความหลากหลาย (Polymorphism) ว่ามีมากเท่าไร โดย p คือค่าความถี่ของแต่ละรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (นฤมล และคณะ, 2547)

4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว

นำรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวโพด จำนวน 186 สายพันธุ์ ที่ได้จากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 24 คู่ ที่ได้แปลงข้อมูลให้เป็นเลข 1 และ 0 ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้ชุดโปรแกรม NTSYSpc 2.2 เพื่อหาสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity

coefficient) แล้วสร้างแผนภูมิเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้ Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average (UPGMA) เพื่อจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวโพดที่แตกต่างกันทางพันธุกรรม

ตารางที่ 2 แสดงเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้าวโพด

No.	Name	Forward primer	Reverse primer
1	bnlg161	GCTTTCGTCATACACACACATTCA	ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT
2	bnlg125	GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG	GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
3	bnlg572	ACTGGACTGTCCTCGTGCCTA	CAAAAAAGATTCGTTCCGGAGTAA
4	bmc1655	ATTAATACTTGCTGATGGCG	TTCTGTTCCCGCCTGTACTT
5	bnlg238	TATTGCTTTCGTCATACACACATTCAT	GAGCATGAGCTTGCATATTTCTTGTGG
6	nc004	TGCGAAGAAGCAGTAGCAA	TGGAGGTAGAAGACGCACG
7	umc1726	GATGAGGAAGAAAAGGAAAAGGA	AGACTCAACCCTAACCTAATGGG
8	phi027	CACAGCACGTTGCGGATTTCTCT	GCGTACGTACGACGAAGACAC
9	umc2028	ACGAGTCACGAATCCGGATAGA	GATTGTCGTCATGCTTCCTTCTCT
10	umc1776	AAGGCTCGTGGCATACTGTAGT	GCTGTACGTACGGGTGCAATG
11	umc1535	GGCAGAGAGATGAAAAAGAATGGA	CAAGGCACCCACACACATACATA
12	phi034	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	GGGGAGCACGCCTTCGTTCT
13	umc1207	GGTGAAGGAGAAGGCGGAGTAT	CACTGGATCACCACACCAACAT
14	umc1185	AGTAAAAGAGGCAAGGACTACGGC	GCGGCGATATATACGAGTTGT
15	umc1065	ACAAGGCCATCATGAAGAGCAGTA	CACGGTCTGGCACACTAACCTTAT
16	phi041	TTGGCTCCCAGCGCCGCAA	GATCCAGAGCGATTTGACGGCA
17	umc1003	AATAGATTGAATAAGACGTTGCC	TGTTCCAATGCTTTTGTACCTCTA
18	umc2101	CCCGGCTAGAGCTATAAAGCAAGT	CTAGCTAGTTTGGTGCCTGGTGAT
19	umc2106	TTAGTTCCTTGCGAATGCCAACATA	CTTGCTTGGGTTGTACGTTGTTT
20	phi053	CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC	AACCCAACGTACTCCGGCAG
21	umc1088	TCATCCTCCTAGCTCCTCTACTCG	AAAACAGTCAGCAGAACCCACTTT
22	umc1008	TCTAGCTTGTGGTGGTGGTTGA	ACATGAGCACAAAGACTGACGC
23	umc1389	AAAACACAACGCTGGACATCAAC	GGTCGTTTTGCTTAGCCCATTTTA
24	phi057	CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT	CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC

ผลการวิจัย (Results)

ผลของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 24 คู่ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 24 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพด การใช้ไพรเมอร์ต่างชนิดกันทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในข้าวโพด 186 พันธุ์ บางพันธุ์อาจมีความเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ได้แถบดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดความแตกต่างขึ้นทั้งหมด 228 ตำแหน่ง (polymorphism alleles) ของข้าวโพดจำนวน 186 พันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นต่อไพรเมอร์มีตั้งแต่ 3 ถึง 21 แถบ (alleles) ไพรเมอร์แต่ละชนิดให้แถบดีเอ็นเอจำนวนต่าง ๆ คือ

1. ปรากฏดีเอ็นเอ 21 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg161
2. ปรากฏดีเอ็นเอ 17 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ phi053
3. ปรากฏดีเอ็นเอ 16 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1065
4. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 15 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1088
5. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 14 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg125
6. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 13 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg238, umc1207, umc1003, umc2101
7. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 9 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ nc004, umc2028, phi041
8. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 8 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ phi027, umc2106
9. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 7 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg572, umc1008
10. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1776, phi034, umc1185
11. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bmc1655
12. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc 1726
13. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1535, umc1389, phi057

การปรากฏจำนวนอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอในการทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบกับสายพันธุ์ข้าวโพด 186 ตัวอย่าง เมื่อใช้ไพรเมอร์ bnlg161 ทำให้มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลสูงสุด 21 อัลลีล และการใช้ไพรเมอร์ umc1535 มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลเพียง 3 อัลลีล แต่ผลจากการทดลองของ ประสาน และคณะ 2554 ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 26 พันธุ์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ bnlg161 และ umc1535 มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลเพียง 6 อัลลีล และ 2 อัลลีล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการปรากฏจำนวนอัลลีลของแต่ละไพรเมอร์นั้นขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่าง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ทำการศึกษา ถ้าหากใช้จำนวนตัวอย่างมาก โอกาสที่จะตรวจพบอัลลีลทั้งหมดของประชากรก็จะเป็นไปได้สูงด้วย

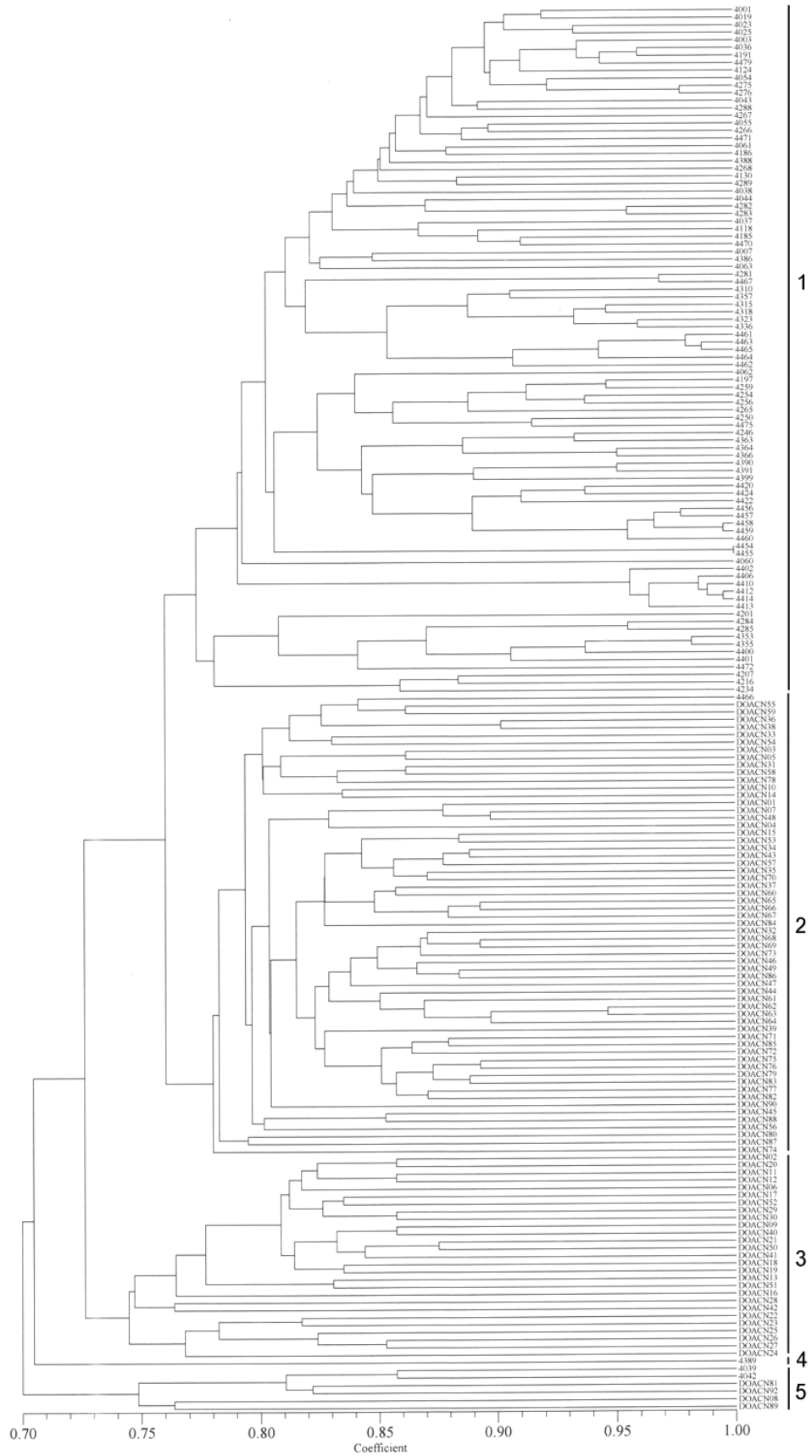
จากการคำนวณค่าความถี่ของการเกิดรูปแบบแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์หาค่า PIC ในแต่ละไพรเมอร์ ซึ่งคำนวณจากจำนวนของแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่พบในข้าวโพดจำนวน 186 สายพันธุ์ พบว่าค่า PIC มีตั้งแต่ต่ำสุดคือ 0.52 และสูงสุดคือ 0.91 โดยค่า PIC นี้เป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะพบความหลากหลาย (Polymorphism) ว่ามีมากเท่าไร ซึ่งค่า PIC จะมีค่าสูงสุดได้ เท่ากับ 1 จากไพรเมอร์ที่ได้ศึกษาทั้งหมด 24 คู่

พบว่าไพรเมอร์ bnlg161 และ umc1065 ให้ค่า PIC สูงที่สุดคือ เท่ากับ 0.91 รองลงมาคือ bnlg125, bnlg238 และ umc1088 มีค่า PICs เท่ากับ 0.87, 0.86 และ 0.85 ตามลำดับ สำหรับไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC น้อยกว่านี้ ได้แสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 โดยไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC สูงนั้นถือว่าเป็นไพรเมอร์ให้ความหลากหลายของรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่สูงในประชากรที่ศึกษา ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์อื่นๆ

จากการนำรูปแบบการปรากฏแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ จำนวน 24 คู่ ที่เกิดขึ้นในข้าวโพดพันธุ์ต่างๆ จำนวน 186 สายพันธุ์ ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.2 ด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดได้ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของข้าวโพดทั้ง 186 สายพันธุ์ ดูได้จากค่า Similarity coefficient ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 1.00 แสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR สามารถบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ดี พบว่าข้าวโพดบางพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก เช่น 4454 [tT)-1-1-B-V] กับ 4455 [tT)-1-1-B-Y] เป็นต้น ส่วนพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ได้แก่ 4001 [ST)-1-1-1-30-B-B-B] กับ DOACN89[NO NAME] มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม 0.70

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ค่า Similarity coefficient ที่ระดับ 0.76 นั้นพบว่าสามารถแยกได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ (ภาพที่ 1)

1. กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 91 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่อยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์
2. กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 61 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งปลูกต่างๆ
3. กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 27 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งปลูกต่างๆ
4. กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 1 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่อยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์
5. กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 4 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งปลูกต่างๆจำนวน 4 สายพันธุ์ และข้าวโพดที่อยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ จำนวน 2 สายพันธุ์



ภาพที่ 1 เดนไดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพด 186 สายพันธุ์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว 186 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ที่เลือกใช้ทั้งหมด 24 คู่ ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 228 ตำแหน่ง แต่ละไพรเมอร์มีโอกาสที่จะพบค่าความหลากหลาย (PIC) ตั้งแต่ 0.52-0.91 มีค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 1.00 สามารถจัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้เป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด และเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพดในอนาคตต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ และใช้เป็นข้อมูลเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพด

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบ และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง (References)

- ประสาน สืบสุข ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ กุหลาบ คงทอง กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และพิเชษฐ์ กระจุดลอยมา. 2554. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดทนแล้ง. หน้า 454-459. ใน: การประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35 วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554. ณ โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ. ปูชากร ภูเกตานนท์. 2549. การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ PCR based เพื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของงา (*Sesamum indicum* Linn.). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- รังสัน หล้าพรหม และ สุจิตรา จางตระกูล. 2548. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของใบบางชนิดในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และไมโครแซทเทลไลท์. หน้า 352-367. ใน: รายงานการประชุม ความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ และสัตว์ป่า “ความก้าวหน้าของผลงานวิจัย และกิจกรรมปี 2548” ณ โรงแรมรีเจนท์ ซะอำ เพชรบุรี วันที่ 21-24 สิงหาคม 2548.
- วันชัย เอ็นเพชร ธานี ศรีวงศ์ชัย มณฑิกานธิ์ สงบจิต ศานนท์ สุขสถาน สรรเสริญ จำปาทอง และชบา จำปาทอง. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR. หน้า 70-76. ใน: การประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35 วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554. ณ โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วีระเดช โชนสันเทียะ รัชณี ชันธหัตถ์ เพียงเพ็ญ ศรวัด ประพิศ วงเทียม ศุภชัย สารกาญจน์ และ อัจฉรา ลิมศิลา. 2552. ฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังไทยพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์ต่างประเทศ. หน้า16-30. ใน: ผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Chin, E.C.L., Senior, M.L., Shu, H. and Smith, J.S.C. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39: 866–873.

Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayer, N. and Cartinhour, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100: 713–722.

Eujayl, I., Sorrells, M.E., Baum, M., Wolters, P. and Powell, W. 2001. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 9: 597-602.

Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L. and Zehr, B.E. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1: 365–373.

Liu, Z.W., Biyashev, R.M. and Maroof, M.A.S. 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93: 869–876.

McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T. and Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35: 89–99.

Roder, M.S., Korzun, V., Wandehake, K., Planschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. and Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007–2023.

Russell, J., Fuller, J., Young, G., Tomas, B., Taramino, G., Macaulay, M., Waugh, R. and Powell, W. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40: 442–450.

Senior, M.L., Chin, E.C.L., Lee, M. and Smith, J.S.C. 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize found in the GenBank database: map construction. *Crop Sci.* 36: 1676–1683.

Temnykh, S., Park, W.D., Ayers, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T. and McCouch, S.R. 1999. Mapping and genome organization of microsatellites in rice (*Oryza sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100: 698–712.

ภาคผนวก (Appendix)

ตารางที่ 3 แสดงค่า PIC จำนวนอัลลีล ขนาดของซันตีเอ็นเอและความถี่ของแต่ละอัลลีล ของแต่ละไพรเมอร์ ที่ตรวจสอบกับข้าวโพด 186 สายพันธุ์

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันตีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
bnlg161	0.91	1	140	2.12
		2	149	11.25
		3	154	6.58
		4	157	0.64
		5	160	13.38
		6	169	0.64
		7	172	0.85
		8	178	16.56
		9	180	2.34
		10	184	0.64
		11	186	3.82
		12	188	2.97
		13	190	5.52
		14	192	10.83
		15	194	5.52
		16	196	5.10
		17	198	0.64
		18	200	0.64
		19	206	0.21
		20	241	7.22
		21	243	2.55
bnlg125	0.87	1	333	1.26
		2	339	2.02
		3	341	13.10
		4	343	8.56
		5	345	3.78
		6	373	1.26
		7	377	6.30
		8	393	24.94
		9	397	1.26
		10	405	3.27
		11	409	3.53

ชื่อไพรมเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันดิเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		12	413	15.87
		13	423	3.27
		14	430	11.59
bnlg572	0.78	1	112	25.56
		2	120	2.56
		3	122	6.71
		4	124	27.48
		5	126	23.64
		6	128	2.88
		7	130	11.18
bmc1655	0.700	1	131	5.56
		2	132	43.33
		3	140	5.19
		4	160	20.37
		5	162	25.56
bnlg238	0.86	1	141	2.20
		2	150	12.31
		3	155	6.59
		4	161	15.60
		5	170	1.10
		6	174	0.66
		7	179-180	17.36
		8	181.9	2.20
		9	187	8.57
		10	193	19.56
		11	197	12.09
		12	200	0.88
		13	242	0.88
nc004	0.74	1	159	22.12
		2	161	19.63
		3	165	2.18
		4	167	40.50
		5	174	5.30
		6	178	3.74
		7	187	0.31
		8	191	1.56
		9	198	4.67

ชื่อไพรมเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันดิเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
umc1726	0.10	1	128	0.53
		2	129	2.13
		3	131	96.28
		4	133	1.06
phi027	0.71	1	159	2.19
		2	161	1.88
		3	164	42.50
		4	167	5.63
		5	169	20.00
		6	174	0.31
		7	178	26.25
		8	184	1.25
umc2028	0.61	1	105	7.14
		2	106	26.40
		3	108	0.62
		4	128	55.90
		5	130	0.62
		6	135	1.86
		7	137	1.86
		8	142	4.66
		9	145	0.93
umc1776	0.66	1	154	47.45
		2	156	3.82
		3	159	14.33
		4	160	30.89
		5	162	2.87
		6	164	0.64
umc1535	0.52	1	180	33.46
		2	184	5.95
		3	192	60.59
phi034	0.70	1	143	19.07
		2	153	2.45
		3	156	1.36
		4	158	4.63
		5	161	35.15
		6	164	37.33
umc1207	0.81	1	140	2.85

ชื่อไพรมเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันดิเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		2	149	30.20
		3	153	0.85
		4	156	22.79
		5	158	17.09
		6	160	5.98
		7	166	1.99
		8	172	2.28
		9	175	1.14
		10	177	7.98
		11	179	2.56
		12	181	1.42
		13	184	2.85
		umc1185	0.74	1
2	134			0.29
3	141			27.73
4	142			23.60
5	144			4.72
6	147			10.32
umc1065	0.91	1	150	16.77
		2	153	4.55
		3	154	0.16
		4	156	6.27
		5	158	2.04
		6	161	4.55
		7	164	1.41
		8	167	4.86
		9	170	6.58
		10	173	4.23
		11	176	8.62
		12	178	10.34
		13	181	7.21
		14	184	14.42
		15	187	5.17
		16	189	2.82
phi041	0.70	1	217	5.54
		2	220	50.16
		3	221	6.51

ชื่อไพรมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันดิเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		4	222	12.38
		5	224	11.07
		6	225	2.93
		7	226	0.65
		8	230	1.30
		9	236	9.45
umc1003	0.820	1	129	0.97
		2	131	0.97
		3	133	16.18
		4	135	0.24
		5	137	6.04
		6	139	0.97
		7	142	26.09
		8	146	10.39
		9	148	0.48
		10	150	21.50
		11	152	0.24
		12	154	15.70
		13	155	0.24
umc2101	0.821	1	156	0.92
		2	158	27.42
		3	159	2.07
		4	162	0.46
		5	163	19.82
		6	164	0.46
		7	165	2.53
		8	167	12.67
		9	169	1.38
		10	171	20.28
		11	172	5.99
		12	182	4.84
		13	183	1.15
umc2106	0.66	1	87	1.33
		2	89	53.16
		3	95	4.32
		4	97	10.30
		5	99	14.62

ชื่อไพรมเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดซันดิเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		6	101	15.61
		7	103	0.33
		8	149	0.33
phi053	0.81	1	158	9.02
		2	163	1.50
		3	165	0.25
		4	167	1.00
		5	168	0.75
		6	171	1.50
		7	172	0.50
		8	189	29.82
		9	191	0.50
		10	194	1.00
		11	196	10.03
		12	202	13.03
		13	206	0.50
		14	210	4.26
		15	213	24.31
		16	230	1.50
		17	302	0.50
umc1088	0.85	1	184	0.63
		2	190	9.49
		3	194	10.44
		4	200	12.34
		5	204	30.38
		6	210	1.27
		7	218	4.11
		8	224	4.43
		9	234	6.65
		10	240	3.48
		11	250	12.97
		12	256	1.58
		13	260	1.27
		14	270	0.63
		15	274	0.32
umc1008	0.71	1	173	10.05
		2	175	39.95

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		3	176	7.47
		4	178	2.58
		5	187	33.76
		6	189	4.38
		7	196	1.80
umc1389	0.60	1	163.7-164	31.56
		2	167	52.82
		3	168.04-169	15.61
phi057	0.45	1	175	70.72
		2	178	19.77
		3	184	9.51

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลงานวิจัย การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ พบว่า เป็นไปตามตามวัตถุประสงค์และเป้าหมาย ดังนี้

1. โคลนยีนและถ่ายฝากยีน 3 ชนิดได้แก่ endoglucanase, cellobiohydrolase และ beta-D-glucosidase เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* และ เซลล์ยีสต์ *Pichia pastoris* สามารถผลิตโปรตีนได้
2. สามารถถ่ายฝากยีนไลเปส 4 ยีน ได้แก่ *lip* ของ *P. aeruginosa*, *lip A* ของ *S. marcescens*, *lip A* ของ *B. subtilis* และ *alkaline lip* ของ *B. cepacia* เข้าใน pET TOPO เวกเตอร์ ได้ไลเปสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์มอย่างสมบูรณ์ ได้ไบโอดีเซล B100
3. สามารถโคลนยีนและถ่ายฝากยีนโคติเนสของแบคทีเรียเข้าใน pET 100/D-TOPO vector ได้ 6 ยีน และโคลนยีนราได้ 1 ยีน เมื่อทำการเชื่อมต่อโปรตีนกับ polyethylene glycol เพื่อทำให้โปรตีนเสถียรมากขึ้น สามารถยับยั้งโรคแอนแทรกซ์ในสบนผลพริกและผลมะม่วงได้อย่างมีประสิทธิภาพ
4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเห็ด 6 ชนิด 10 ตัวอย่าง เห็ดแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชในแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน
5. สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 13 ไอโซเลท จำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในส่วนของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 11 คู่ พบว่า สายพันธุ์สีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณและศึกษาเทคโนโลยีการผลิตเป็นไบโอเอทานอลจากสายพันธุ์
6. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยจากชีวมวล จำนวน 144 ไอโซเลท ไอโซเลท AC-10 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces* sp ส่วนไอโซเลท PV4-15x มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* พบว่าเอนไซม์อย่างหายาที่ได้จากการชักนำโดยใช้รำข้าว นั้น มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดี สามารถย่อยอาหารแข็งที่มี เซลลูโลส (CMC-Na) และ ไชแลน และสามารถเชื่อมต่อขึ้นยีนไซลานเนสเข้ากับ Protein Expression Vector แล้วถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมที่ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม *E. coli* BL21 (DE3) ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
7. เชื้อราทั้งหมด 32 สายพันธุ์นำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส พบว่ามี 10 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีบนอาหารทั้ง 4 ชนิด การโคลนยีนพบว่าเมื่อมีการเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ที่พลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO มียีน β -D-xylosidase ได้แก่ XldC1, Xld2C1 และ XldC4 ที่กระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน พบว่า มีการย่อยบนอาหารไซเลน ข้าวโพดและอากาเว่ได้ดี
8. คัดเลือกแบคทีเรียทนเย็นได้ 5 สกุล สามารถโคลนยีนแบคทีเรียได้ 3 ยีน โปรตีนต้านการเกิดผลึกน้ำแข็ง ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ สามารถลดความเสียหาย เนื่องจากการแช่แข็ง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

9. ได้เทคโนโลยีกระบวนการหมักสาหร่ายสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติกับตัวอย่างพืชจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าคิงเนเปีย ต้นเลา และ อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า สาหร่ายมีการย่อยสลายเป็นน้ำตาลได้เร็วที่สุด
10. สามารถถ่ายยีน *yap1* เข้าสู่จีโนมของยีสต์และได้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและเร็วกว่ายีสต์ WT นอกจากนี้ยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ Cycloheximide ทนทานต่อสารมีพิษ HMF ได้ ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนกระบวนการกลั่นเอทานอลการ และสามารถสังเคราะห์ Over expression vector สำหรับ Cellulase Enzymes พร้อมใช้เพื่อถ่ายเข้าสู่ยีสต์ในการนำไปใช้ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้
11. การจำแนกเชื้อราเขียว *Metarhizium* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยใช้ยีนไคตินเนส สามารถจำแนกเชื้อราเขียว 9 ตัวอย่างเป็นชนิด *M. majus* ทั้งหมด ในขณะที่การจำแนกด้วยส่วนของ ITS จะสามารถจำแนกเชื้อได้ทั้ง 14 ตัวอย่าง แยกได้เป็น *M. anisopliae*, *M. majus* และ *M. flavoviride*
12. สามารถถ่ายฝากสู่หน้าวัวประสบความสำเร็จ เมื่อนำต้นมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้
13. การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน 9 ยีน ในยางพารา 12 พันธุ์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสนิปรวม 90 ตำแหน่ง สามารถจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวน haploid genome ของยางพารา การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้
14. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับ ดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว 186 สายพันธุ์ สามารถจัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้เป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด และเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพดในโอกาสต่อไป
15. การศึกษาครั้งนี้พบเห็ดเรืองแสง 4 ชนิด จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเห็ดเรืองแสงที่สามารถจำแนกได้ทั้ง genus และ species คือ พบคือ *Mycena chlorophos* และ *Neonothopanus nimbi* อีก 2 ชนิด สามารถจำแนกได้เพียง genus คือ *Favolaschia spp.* และ *Mycena spp.*
16. ได้ไพรเมอร์จำนวน 28 คู่ ที่เหมาะสมในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของงุ่น 63 พันธุ์ สามารถแบ่งงุ่นออกเป็น 2 กลุ่ม อย่างชัดเจนโดย กลุ่ม A คือ งุ่นรับประทานสด กลุ่ม B คือ งุ่นทำไวน์และงุ่นที่ใช้เป็นต้นตอ นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุกรรมของงุ่นทำไวน์ มีความหลากหลายมากกว่างุ่นรับประทานสดมาก และได้จัดทำและพัฒนาระบบฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของงุ่นจำนวน 7 โปรแกรม
17. การประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 25 ตัวอย่าง จาก 12 สายพันธุ์ พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 61 คู่สาย การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้รองเท้านารีสามารถใช้ยีน *matK* ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล

รองเท่านั้น 13 ตัวอย่าง จากตัวแทนชนิดจำนวน 7 ชนิด พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท่านั้นขาวพังกา รองเท่านั้นขาวสตูล รองเท่านั้นเหลืองปราจีน รองเท่านั้นกรวย และรองเท่านั้นฟ้าหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท่านั้นเหลืองกระบี่ และไม้ป่าเกาะพนัง

ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำจุลินทรีย์ที่พัฒนาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในขบวนการผลิตเอทานอล
2. โคตินเนสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโคโคซาน และโคตินดีมาก สามารถนำไปใช้ในการผลิตโคโคซานสายสั้น เพื่อใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรและอุตสาหกรรม
3. สามารถนำสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นชีวมวลเพื่อผลิตไบโอเอทานอล
4. เชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ไอโซเลท PV4-15x สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายวัสดุจำพวกเอมิเซลลูโลสได้ดี เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท AC-10 สามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายวัสดุจำพวกเซลลูโลสได้ดี การกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลส ในเชื้อแบคทีเรีย สามารถใช้รำข้าว 1 เปอร์เซ็นต์ทดแทนการใช้ไซแลนและ CMC-Na ได้ รีคอมบิแนนท์โปรตีน (เอนไซม์ไซลานเนส) ที่ผลิตได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม มีศักยภาพในการย่อยไซแลนหรือเอมิเซลลูโลสได้ดี สามารถนำไปพัฒนากระบวนการผลิตในปริมาณมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมได้
5. สามารถนำสายพันธุ์ยีสต์ที่ได้รับการควบคุมการแสดงออกของ ยีน *YAP1* และตัดต่อยีนดัดแปลง สำหรับย่อย Lignocellulase ในยีสต์ *S.cerevisiae* ไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการ หมักเอทานอล
6. สามารถนำชุดยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* จากดอกหน้าวัวที่อยู่ในรูปควบคุมการแสดงออกของยีนแบบกลับทิศ ที่เป็นของกรมวิชาการเกษตรสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับแต่งสีหน้าวัวโดยวิธีการถ่ายยีน เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอก
7. สามารถนำตำแหน่งการเกิดเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ยางพาราไปใช้ในการทำ marker เพื่อจำแนกสายพันธุ์ยางพารา
8. สามารถนำข้อมูลเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมไปใช้บ่งบอกลักษณะประจำพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว
9. สามารถนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ด อังุ่น และกล้วยไม้รองเท่านั้น ไปใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้
10. ได้เทคนิคและฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอังุ่นสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์และตรวจสอบพันธุ์อังุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ตรงตามที่ระบุในฉลากหรือไม่
11. ได้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของอังุ่นที่ปลูกในประเทศไทย ทั้งอังุ่นทำไวน์และอังุ่นรับประทานสด นักวิจัยท่านอื่นสามารถนำไปใช้อ้างอิงและต่อยอดได้ และ นำระบบฐานข้อมูลของอังุ่นที่ได้มาใช้เป็นเพื่อปรับปรุงพันธุ์อังุ่นในประเทศไทย
12. สามารถนำไพรเมอร์ที่ได้จากการทดลองนี้ รวมถึงเทคนิค SSR ISSR และดีเอ็นเอบาร์โค้ด ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท่านั้นที่เก็บรวบรวมไว้ตามหน่วยงานต่างๆ ได้ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* จากกล้วยไม้สกุลรองเท่านั้น

สามารถนำไปลงในฐานข้อมูล BLAST เพื่อเป็นฐานข้อมูลของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีของประเทศไทย
ต่อไป

13. สามารถนำระบบฐานข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้ไปใช้ปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ใน
ประเทศไทย

บรรณานุกรม

- นฤมล ตั้งธีระสุนันท์, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, เกษม สร้อยทอง, พิมพ์พรรณ สมมาตย์ และเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2552. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS. หน้า 396-403 ในเรื่องเติมการประชุมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี เชียงกุล, ททัยรัตน์ อุไรรงค์ และบุญเรือน เรืองวิเศษ. 2551. วิจัยและพัฒนาการจัดสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเห็ดในสกุลเห็ดหอม
- อุไร จิรมงคลการ. 2550. กล้วยไม้ร่องเท่านั้น ฉบับปรับปรุงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 224 น.
- Chin, E.C.L., Senior, M.L., Shu, H. and Smith, J.S.C. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39: 866–873.
- Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayer, N. and Cartinhour, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100: 713–722.
- Chu, K.T., L. Xia, and T.B. Ng. 2005. Pleurostrin, an antifungal peptide from oyster mushroom. *Peptides* 26: 2098-2103.
- Destefano R., S. Destefano and C. Messiae. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var *Anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidopera, Pyralidae) using specific primers. *Genetic and Molecular Biology.* 27: 245-252.
- Enkerli J., V. Ghormade, C. Oulevey and F. Widmer. 2009. PCR-RFLP analysis of chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*. *J. of invertebrate Pathol.* 102: 185-188.
- Eujayl, I., Sorrells, M.E., Baum, M., Wolters, P. and Powell, W. 2000. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. *Theor. Appl. Genet.*
- Gbolagade, J., L. Kigigha, and E. Ohimain. 2007. Antagonistic effect of extracts of some Nigerian higher fungi against selected pathogenic microorganisms. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2(4): 364-368.
- Guo, Y., H. Wang, and T.B. Ng. 2005. Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 26: 575-580.

- Iwalokun, B.A., U.A. Usen, A.A. Otunba, and D.K. Olukoya. 2007. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. African Journal of Biotechnology 6(15): 1732-1739.
- Jagadish, L.K., V.V. Krishnan, R. Shenbhagaraman, and V. Kaviyaran. 2009. Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) imbach before and after boiling. African Journal of Biotechnology 8 (4): 654-661.
- Murray, M. G. and W. F. Thomson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic acid Research. 8: 4321-4325.
- Muzzarelli R. A. A. 1977. Human enzymatic activities related to therapeutic administration of chitin derivatives. Cell Mol. Life Sci. 53: 131-140.
- Ng, T.B. 2004. Peptides and proteins from fungi. Peptides 25: 1055-1073.
- Ngai, P.H.K., and T.B. Ng. 2003. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. Life Sciences 73: 3363-3374.
- Omar, I.C., N. Nishio and S. Nagai. 1987 b. Production of a thermastable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol corn steep liquor medium. Agr. Biol. Chem. 51(8): 214ium. Agr. Biol. Chem. 51(8): 214o,T. Sugiura and Y. Minoda. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. Agr. Biol. Chem. 46(12): 2885-2893.
- Russell, J., Fuller, J., Young, G., Tomas, B., Taramino, G., Macaulay, M., Waugh, R. and Powell, W. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. Genome 40: 442-450.
- Rosa, L.H., K.M.G. Machado, C.C. Jacob, M. Capelari, C.A. Rosa, and C.L. Zani. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 98(7): 967-974.
- Tangthirasunun N., S. Poeaim, K. Soyton, P. Sommartya and S. Popoonsak. 2010. Variation in morphology and ribosomal DNA among Isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. J of Agricultural Technology. 6(2) : 317-329.
- Urbanelli, S., V. Della Rosa, F. Punelli, D. Porretta, M. Reverberi, A.A. Fabbri and C. Fanelli. 2007. DNA-fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the *Pleurotus eryngii* complex. Appl Microbiol Biotechnol 74: 532-600.

- Velasquez V.B., M.P. Carcamo, C.R. Merino, A.F. Iglesias and J. F. Duran. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetic and Molecular Biology*. 30:89-99.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4007-4414.