รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง
สร้างเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่ายเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์และเพศ ของต้นตาล ในจังหวัดเพชรบุรี

Development of simple marker for classification and sex identification of Palmyra palm in Petchaburi by molecular genetics approach

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร.ประดิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา
อาจารย์ ดร.ญาณพัฒน์ พรมประสิทธิ์
อาจารย์ ดร.สุมิตานันท์ จันทะบุรี

ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2559

สาขาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี
กรกฎาคม 256

บทคัดย่อ

ตาล (*Borassus flabellifer* L.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Arecaceae มีต้นเดี่ยวขนาดใหญ่ดอกแยกเพศต่างต้น การจำแนกเพศและพันธุ์ของตาล จำแนกโดยใช้วิธีสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา ซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาในการจำแนกเพศและพันธุ์ตาล การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกพันธุ์เป็นการลดเวลาในการจำแนกเพศและพันธุ์ของพืช ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจำแนกเพศและพันธุ์ของตาลโดยรวบรวมตัวอย่างตาลในจังหวัดเพชรบุรีทั้งเพศผู้และเพศเมียจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และพืชนอกสกุล *Borassus* จำนวน 1 พันธุ์ คือช้างไห้ โดยใช้ เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) จำแนกเพศและเทคนิค DNA Barcode จำแนกพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตาลในจังหวัดเพชรบุรี รวมทั้งเพื่อหาตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *rbcL* และยีน *matK* ในตาลพันธุ์ต่างๆ สำหรับนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อทำการตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ แบบ RAPD จำนวน 100 ไพรเมอร์ เลือกแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมียของตาล พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ OPD-04 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งไพรเมอร์ OPD-04 มีความจำเพาะกับเพศผู้ ในขณะที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในเพศเมีย ขนาดประมาณ 1.0 kb ไพรเมอร์ OPD-04 สามารถตรวจสอบเพศของตาลได้อย่างถูกต้อง เมื่อนำดีเอ็นเอของตาลไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสด้วยคู่ไพรเมอร์ของยีน *rbcL* และยีน *matK* ได้ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 600 คู่เบส ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ในทุกตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนทั้งสองร่วมกัน ด้วยวิธี Bayesian inference พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์ตาลให้สูงขึ้น และช้างไห้นั้นถูกจัดกลุ่มรวมอยู่กับตาลพันธุ์หม้อ ซึ่งจากผลของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้ แสดงว่าช้างไห้ควรจัดอยู่ในสกุล *Borassus* และไม่พบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในตาลพันธุ์หม้อ และตาลพันธุ์ไข่ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกพันธุ์ตาล

คำสำคัญ: เครื่องหมายอาร์เอพีดี, แผนภูมิวงศ์วานเชิงวิวัฒนาการ, ตาล, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Abstract

Palmyra palm (*Borassus flabellifer* L.) belongs to family Arecaceae. Palmyra palm is dioecious plant with a single trunk. Sex and variety of palmyra palm can be identified by morphology of mature tree which takes a long time about 10–15 years. The attempts of molecular marker seems to be useful in term of time reduction and more precision. Thereby, this research was attempted to identify sex and variety of palmyra palm using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and DNA barcode. The both male and female specimens of 3 palmyra palm varieties were collected from Phetchaburi province including *Borassodendron machadonis* (Ridl.) Becc. the closely related species once belongs to *Borassus*. DNA was extracted from young leaves and performed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polymerase Chain Reaction (PCR) with 100 RAPD primers. The results show that only primer OPD-04 primer was expressed 1 kilobase of DNA band which is specific in males. Thus, primer OPD-04 can use to specify sex of Palmyra palm. The single nucleotide polymorphism (SNP) and phylogenetic analysis were performed from DNA sequences of *rbcL* and *matK* gene with 600 base pairs long. The results show that, interpecies variation of all specimens were under 5% in both genes and the phylogeny of concatenated sequences demonstrated the position of *B. machadonis* associated among *Borassus* species. The SNPs between *Borassus* variety were found only in *matK*. From the results indicated that, *B. machadonis* should be belong to genus *Borassus* instead of *Borassodendron* and the SNP of *matK* can be used to identify the variety of palmyra palm

Keywords: RAPD marker, Phylogenetic, *Borassus flabellifer* L., DNA barcode

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนจากหลายบุคคลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณอำนาจ ภู่เงิน แหล่งการเรียนรู้ภูมิปัญญาตาล กลุ่มอนุรักษ์และสืบสานตาล สวนตาลลุงถนอม หมู่ที่ 4 ตำบลถ้ำรงค์ อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างตาลสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักศึกษา ที่มีส่วนร่วมในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศทางชีววิทยาโมเลกุล สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ที่อำนวยความสะดวกด้านอาคารสถานที่

โครงการวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนทุนวิจัยจาก สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2559

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... จ
สารบัญภาพ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
ที่มาและความสำคัญ..... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3
สมมติฐานของการวิจัย..... 3
ขอบเขตการวิจัย..... 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
สวนตาลนายถนอม ภู่เงิน..... 4
ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับตาล..... 4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตาล..... 5
เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)..... 8
เครื่องหมายดีเอ็นเอ..... 8
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)..... 9
เครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD..... 11
โครโมโซมเพศในพืช..... 13
แผนภูมิวงศ์วานเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic)..... 13
Single nucleotide polymorphism (SNP)..... 14
ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)..... 16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
ตัวอย่างพันธุ์ตาล	21
เครื่องมือและอุปกรณ์	21
สารเคมี	22
วิธีดำเนินการทดลอง	23
การวิเคราะห์ผล	27
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	29
ผลการสกัดแยกดีเอ็นเอ	29
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิครหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode)	31
การเปรียบเทียบตำแหน่ง SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	43
ผลการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR	43
บทที่ 5 สรุปการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	47
สรุปการวิจัย	47
อภิปรายผล	48
ข้อเสนอแนะ	56
เอกสารอ้างอิง	57
ภาคผนวก	65
ก ลำดับนิวคลีโอไทด์	59
ข ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งของยีน *matK*	68
ค ตารางไพรเมอร์ RAPD	81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ไพรเมอรที่ใช้สำหรับเป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode).....	25
3.2	องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	25
3.3	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *rbcL*.....	25
3.4	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *matK*.....	26
4.1	การกำหนดดีหมายเลขของเอ็นเอที่ได้จากตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้.....	30
4.2	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของตาลแต่ละพันธุ์และช้างไห้ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI.....	33
4.3	ค่าทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ตาลเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของความแตกต่างยีน *rbcL*.....	35
4.4	ตารางแสดงความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* กับฐานข้อมูล Genbank.....	37
4.5	ค่าทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ตาลเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของความแตกต่างยีน *matK*.....	39
4.6	ค่าทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ตาลเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของความแตกต่างยีน *rbcL* และ *matK* ร่วมกัน.....	42

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แผนที่สวนตาลนายถนอม ภู่เงิน ตำบลถ้ำรงค์ อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี.....	4
2.2	ตาลพันธุ์หม้อ.....	7
2.3	ตาลพันธุ์ไข่.....	7
2.4	ตาลพันธุ์ผสม.....	7
2.5	การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเบสเพียง 1 เบสที่ตำแหน่งหนึ่งหรือ SNP (Single nucleotide polymorphism) ซึ่งพบได้จากการหาลำดับเบส.....	15
4.1	คุณภาพของดีเอ็นจากการตรวจสอบโดยวิธี Agarose gel Electrophoresis..	29
4.2	วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm).....	31
4.3	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในตาลและช้างไห้.....	32
4.4	แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในรูปแบบของ Bayesian inferences.....	34
4.5	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* ในตาลและช้างไห้.....	36
4.6	แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences.....	38
4.7	แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences.....	40
4.8	ตำแหน่งที่ 513 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเบสเพียง 1 เบสของยีน *matK*.....	43
4.9	ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของไพรเมอร์ OPA-01 ถึง OPA-10.....	44
4.10	ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของไพรเมอร์ OPB-01 ถึง OPB-10.....	45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.11	ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของไพรเมอร์ OPC-01 ถึง OPC-10.....	45
4.12	ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของไพรเมอร์ OPD-01 ถึง OPD-10.....	46
4.13	ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของไพรเมอร์ OPE-01 ถึง OPE-10.....	46

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ตาล (*Borassus flabellifer* L.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Arecaceae มีต้นเดี่ยวขนาดใหญ่ดอกแยกเพศต่างต้น (Dioecious) ออกดอกหลายครั้ง เจริญเติบโตในเขตมรสุมเขตร้อน และเขตกึ่งเขตร้อนตอนใต้แอฟริกา มาดากัสการ์ ปากีสถานตอนใต้ ชายฝั่งอินเดีย เอเชียเฉียงใต้ มาเลเซีย อินโดนีเซีย นิวกินี และออสเตรเลียตอนเหนือ ตาลเป็นปาล์มต้นเดี่ยวมีอายุเป็นร้อยปี (บุญสนอง ช่วยแก้ว และวุฒิชัย ฤทธิ, 2559) ตาลมีบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ โดยเป็นที่อยู่อาศัยของศัตรูธรรมชาติจึงเป็นการลดการใช้สารเคมีในนาข้าว การที่มีรากลึกจะช่วยหมุนเวียนธาตุอาหารให้แก่ดิน ช่วยยึดเกาะลดมลภาวะและปรับปรุงสภาพแวดล้อม (สุรพล จันทร์เรือง, 2545) ผลผลิตจากตาลส่งผลต่อเศรษฐกิจและสังคมของจังหวัดเพชรบุรีมาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ตาลที่มีอยู่ทั่วไปเป็นพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจากธรรมชาติ การคัดเลือกโดยมนุษย์มีน้อยมากด้วยข้อจำกัดหลายๆประการ จึงไม่ได้มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง เนื่องจากการให้ผลผลิตมีระยะเวลากว่าสิบปี (Morton, 1998) ตาลเป็นพืชที่แยกเพศต่างต้น (Dioecious) ตาลที่พบในจังหวัดเพชรบุรีมีความหลากหลายพันธุ์ จากที่มีการสำรวจพบพันธุ์ตาล 3 พันธุ์ ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ และตาลพันธุ์ผสม (อุบล สมทรง, 2556) การประเมินลักษณะ เพศและการคัดเลือกสายพันธุ์มักใช้วิธีสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological character) หรือลักษณะที่ปรากฏ (Phenotype) ซึ่งลักษณะที่ปรากฏเป็นผลจากการแสดงออกของจีโนไทป์ (Genotype) และผลกระทบของสภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตเจริญเติบโตในช่วงเวลานั้น (จรัสศรี นวลศรี, 2548) ดังนั้นการใช้ลักษณะที่ปรากฏจำแนกสิ่งมีชีวิตจึงอาจไม่เพียงพอในการคัดเลือกเพศหรือระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องแม่นยำได้ นอกจากนั้นกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ยังต้องอาศัยระยะเวลานานและใช้แรงงานจำนวนมากอีกด้วย (กรมวิชาการเกษตร, 2543)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (สรพงศ์ เบญจศรี, 2554) จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (Varietal identification) ได้เข้ามาช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น (สุรีพร เกตุงาม, 2546) การใช้วิธีการทางระดับชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้การเปรียบเทียบแบบสุ่ม หรือจำเพาะเจาะจงจากโครโมโซมซึ่งดีเอ็นเอมีคุณสมบัติเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละสิ่งมีชีวิต (Morris, 1994) *Consortium for the Barcode of Life (*CBOL*)* เสนอว่าชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ (Specific site) เหมาะสำหรับการระบุพันธุ์พืช โดยตำแหน่งที่เหมาะสมคือชิ้นดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ได้แก่ยีน *matK, rpoB, rpoC1, rpoC2, accD, ndhA, ndhJ, ndhK,YCF5,YCF9* และ *rbcL*และได้เสนอตำแหน่งมาตรฐาน 2 ยีน คือ ยีน *matK* และ *rbcL* (CBOL Plant Working Group, 2009) โดยการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชสามารถเลือกใช้ชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ภายในแต่ละชนิด (หรือพันธุ์) เดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (หรือพันธุ์) สูง ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะนี้จึงให้ความแม่นยำสูง สะดวก และรวดเร็ว

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะในคลอโรพลาสต์ 2 ยีน คือยีน *matK* และ *rbcL* ซึ่งแต่ละยีนมีความสำคัญดังนี้ ยีน MuturaseK (*matK*) เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์แมทัวเรส (Maturase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการตัดแต่งอาร์เอ็นเอ (RNA splicing) (Reimo *et al*., 2006) ยีน Ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*) เป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์ RuBisCO (Ribulose bisphosphate carbo-xylase oxygenase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการในพืช (Schuettpelz *et al*., 2006) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกพันธุ์ของตาลในจังหวัดเพชรบุรีโดยใช้ DNA Barcode และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตาลในจังหวัดเพชรบุรีเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Genetic relationship) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) รวมทั้งระบุตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ และตาลพันธุ์ผสมรวม 3 ชนิด/พันธุ์ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* รวมทั้งเพื่อหาตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *rbcL* และยีน *matK* ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการระบุพันธุ์ตาลทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก้ พันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ และตาลพันธุ์ผสม ใช้วางแผนการผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกเพศและพันธุ์ของตาลในจังหวัดเพชรบุรี
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตาลในจังหวัดเพชรบุรี

สมมติฐานของการวิจัย

ตาลใช้ระยะเวลานานในการให้ผลผลิต ทั้งเพศและพันธุ์ในตาล ให้ผลผลิตที่แตกต่างกัน ทำให้ไม่ตรงตามความต้องการของเกษตรกร เกษตรกรผู้มีประสบการณ์จะอาศัยการแยกเพศและพันธุ์ของตาลจากลักษณะภายนอก แต่วิธีการดังกล่าวก็ยังไม่ถูกต้องถึง 100% ดังนั้นเพื่อเป็นการลดความเสี่ยงต่อการปลูกตาลผิดไปจากความต้องการ การใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ในการนำมาใช้พันธุ์ของตาล โดยอาศัยทฤษฎีการใช้ความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction)

จะเห็นได้ว่าผลที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่ายใช้ในการจำแนกเพศและพันธุ์ของตาลเพื่อให้เกษตรกรสามารถเลือกปลูกตาลได้อย่างถูกต้อง และตรงตามความต้องการซึ่งจะสามารถพัฒนาต่อยอดไปในระดับของการให้บริการตรวจสอบตาลแก่เกษตรกรในอนาคตต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

1. สำรวจพันธุ์ตาลในจังหวัดเพชรบุรีโดยนำตัวอย่างสายพันธุ์ตาลจากสวนตาลของนาย ถนอม ภู่เงิน ซึ่งตั้งอยู่ในอำเภอบ้านลาด
2. เพื่อพัฒนาและทดสอบความสามารถในการจัดจำแนกเพศของตาลด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD และพันธุ์ของตาลด้วย DNA Barcode

โดยการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพรีเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) ที่หน่วยวิจัยชีววิทยาพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

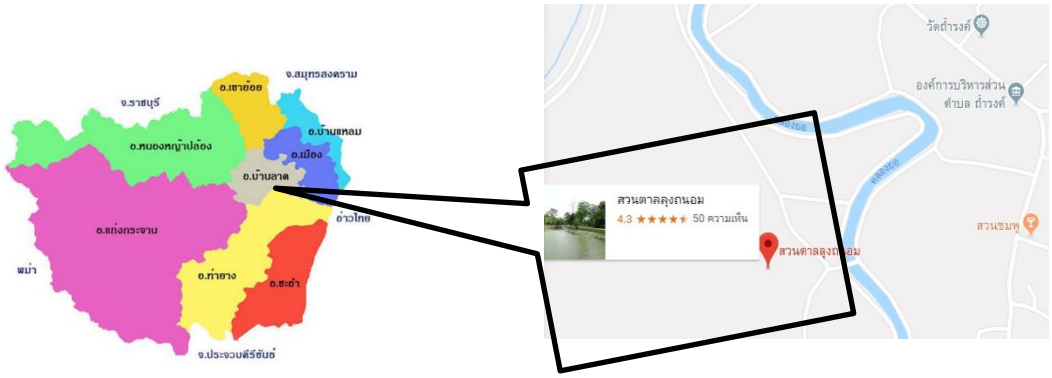
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการศึกษาทางอนุกรมวิธาน การอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และการปรับปรุงพันธุ์พืช
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้จัดจำแนกเพศและชนิดพันธุ์ของตาลต่อไปได้ในอนาคต

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สวนตาลนายถนอม ภู่เงิน

สวนตาลนายถนอม ภู่เงิน เป็นแหล่งเรียนรู้ภูมิปัญญาตาล หรือกลุ่มอนุรักษ์และสืบสานตาล สวนตาลนายถนอม ภู่เงินเป็นพื้นที่ที่ได้รวมพันธุ์ตาลทั้ง 3 พันธุ์ไว้ ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ และตาลพันธุ์ผสม การจำแนกพันธุ์นั้นนายถนอมได้เรียนรู้วิธีสังเกตต้นตาลในธรรมชาติแล้วนำมาปรับใช้กับการลงมือปลูกจริงซึ่งพันธุ์ที่ปลูกส่วนใหญ่จะเป็นตาลพันธุ์ไข่ มีลักษณะเด่นที่อยู่ที่โคนต้นจะอ้วน ขนาดใหญ่กว่าต้นตาลทั่วไป



ภาพที่ 2.1 แผนที่สวนตาลนายถนอม ภู่เงิน ตำบลถ้ำรงค์ อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี

2. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับตาล

ตาลมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Borassus flabellifer* L. เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว วงศ์ Arecaceae มีชุดโครโมโซม 2n=2X=36 (Venkatasubban, 1946 อ้างโดย Kovoor, 1983)

หลักฐานทางประวัติศาสตร์ยืนยันว่าตาลมีถิ่นกำเนิดอยู่บนโลกนานแล้วนับล้านปี อีกทั้งยังมีการสันนิษฐานว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเขตร้อนของทวีปแอฟริกา (Kovoor, 1983) ต่อมามีการแพร่กระจายไปสู่ประเทศต่างๆ ในประเทศทางเขตร้อนภูมิภาคเอเชีย โดยเฉพาะทางฝั่งตะวันออกและทางตอนใต้ของอินเดีย ศรีลังกา เมียนม่าร์ ลาว มาเลเซีย อินโดนีเซียและไทย

ตาลเป็นพืชเศรษฐกิจในระดับท้องถิ่นที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวิตและภูมิปัญญาของคนไทยมาช้านาน พบทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ตาลเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ปาล์ม เช่นเดียวกับมะพร้าว มีลำต้นที่แข็งแรง ทนทาน สูงใหญ่และสามารถมองเห็นได้ในระยะไกลๆ อีกทั้งตาลยังไม่ต้องการ การดูแลเฉกเช่นเดียวกับต้นไม้ชนิดอื่นๆ คือ ไม่จำเป็นต้องรดน้ำ พรวนดิน ใส่ปุ๋ย และพ่นสารเคมี ทำให้เกษตรกรที่

ทำอาชีพเกี่ยวข้องกับตาลทำอาชีพอื่นๆ เป็นอาชีพหลักได้ และทำอาชีพที่เกี่ยวข้องกับตาลเป็นอาชีพรอง

ตาลเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในดินแทบทุกประเภทของเขต อีกทั้งยังสามารถทนทานต่อความแห้งแล้งและสภาพที่ดินมีน้ำท่วมขัง โดยลักษณะรากของตาลจะไม่แผ่ออกด้านข้าง ดังนั้นจึงสามารถปลูกร่วมกับพืชชนิดอื่นๆได้ดี อีกทั้งตาลยังช่วยป้องกันลมพายุและเป็นที่อยู่อาศัยของนกและค้างคาว ซึ่งสามารถช่วยในเรื่องการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ นอกจากนี้ต้นตาลนั้นยังสามารถนำมาสร้างผลิตภัณฑ์ไม่ว่าจะเป็นแบบสดหรือแปรรูปเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เฟอร์นิเจอร์หรืองานหัตถกรรมอื่นๆ นับว่าตาลมีความสำคัญต่อการพัฒนาเกษตรกรรมทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม (สุรพล จันทร์เรือง, 2545) ตาลเป็นพืชสารพัดประโยชน์ชนิดหนึ่งทุกส่วนของตาล ได้แก่ ลำต้น ทางตาล ใบตาล ช่อดอก ผลตาล เมล็ด ราก และน้ำตาล สามารถนำมาใช้ประโยชน์ ทางด้านอาหาร ยารักษาโรค ด้านอุตสาหกรรม การก่อสร้าง เฟอร์นิเจอร์ ด้านหัตถกรรม ด้านการเกษตร และสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงในอนาคตได้อีกด้วย

3. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตาล

3.1 ใบ ใบมีสีเขียวเข้ม (Green 137C) รูปพัด (Palmate leaf) สามารถมองเห็นได้ในระยะไกลๆ ขอบใบหยักคล้ายฟันเลื่อย แต่ละใบมีใบย่อยที่เรียกว่า เซกเมนท์ (Segment) ซึ่งแตกออกจากจุดๆเดียวกันที่ปลายของก้านใบตาล ที่ขอบก้านใบหรือทางตาลทั้งสองด้านมีหนามสีดำแหลมคม ขนาดไม่สม่ำเสมอกัน ยอดตาลแต่ละยอดประกอบด้วยใบประมาณ 25-40 ใบ ขึ้นอยู่กับอายุของตาลต้นหนึ่งสามารถให้ใบตาลได้ 12-15 ใบต่อปี (พรรณิภา โสตถิพันธุ์และคณะ, 2547)

3.2 ลำต้น ตาลเป็นพืชที่เป็นลำต้นเดียว (Single stem) ไม่มีหน่อ ลำต้นมีขนาดใหญ่ ความสูงโดยทั่วไปประมาณ 25–30 เมตร โดยตาลจะมีความสูงเพิ่มขึ้นปีละ 30-40 เซนติเมตร เปลือกลำต้นมีลักษณะขรุขระสีดำ เป็นวงปล้องซ้อนๆกัน เนื่องจากก้านใบที่หลุดร่วงไป เนื้อไม้มีลักษณะเป็นเสี้ยนสีดำ แข็ง เหนียว (สุรพล จันทร์เรือง, 2545)

3.3 ดอก ตาลเป็นพืชที่มีดอกไม่สมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียเป็นดอกแยกเพศต่างต้น ช่อดอกออกระหว่างซอกใบ 6-12 ช่อ ช่อดอกเพศผู้ห้อยลง ช่อดอกรวมยาว 1.60 เมตร ก้านช่อดอกอ้วน ยาว 50 เซนติเมตร ช่อดอกยาว 90 เซนติเมตร แยกออกเป็น 5-8 ช่อ ขนาด กว้าง 2-2.5 ยาว 25-40 เซนติเมตร ช่อดอกเพศเมียเป็นแท่ง เป็นช่อเชิงลด หรืออาจแตกกิ่งเล็กน้อยยาว 1-1.20 เมตร ก้านช่อดอกอ้วนยาว 40 เซนติเมตร แยกออกเป็นกิ่งย่อยอ้วน 1-3 กิ่ง ยาว 30-45

เซนติเมตร โค้งลงขณะที่ดอกบาน แต่ห้อยลงเมื่อเป็นผล ลักษณะของผลนั้นค่อนข้างกลม ขนาด 15-20 เซนติเมตร (พูนศักดิ์ วัชรากร, 2548)

3.4 ผล ตาลตัวเมียจะมีลูกตาลต้องตัดเมื่อยังไม่สุก เพื่อให้ได้เต้าตาล หรือลอนตาล ผลของตาลมีขนาดใหญ่เป็นทะลาย ผลกลมมีขนาด 6-8 นิ้ว ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อน ผลแก่มีสีม่วงแก่ผลสุกเต็มที่มีสีม่วงแก่เกือบดำหรือดำ ผิวเป็นมันภายในผลมีเมล็ดขนาดใหญ่แข็งประมาณ 1-4 เมล็ด ส่วนใหญ่มี 3 เมล็ด มีเปลือกหุ้มเป็นเส้นใยละเอียด เมื่อสุกจะมีสีเหลืองสดประกอบด้วยแป้งและน้ำตาล เนื้อนุ่มมีกลิ่นหอมใช้ปรุงแต่งสีและกลิ่นในขนมหวาน ภายในเมล็ดมีเนื้อสีขาวขุ่น เมล็ดแบนกลม (สันติธรรม โชติประทุม, 2557)

3.5 ราก รากจะมีลักษณะเป็นเส้นกลมยาว เป็นกระจุกคล้ายรากมะพร้าวและหยั่งลงไปในดินได้ลึกมาก ไม่แผ่ไปตามผิวดินเหมือนรากมะพร้าว รากตาลจะยึดติดดินได้ดี ดังนั้นโอกาสที่จะโค่นล้มหรือถอนรากเป็นไปได้ยาก (สุรพล จันทร์เรือง, 2545)

ปัจจุบันการแบ่งพันธุ์ตาลยังไม่สามารถจำแนกได้ในขณะที่ต้นตาลยังเล็กอยู่ เนื่องจากการแบ่งพันธุ์ของตาล ได้ทำการแบ่งกลุ่มตามลักษณะสีและขนาดของผลตาลเท่านั้น ซึ่งเกณฑ์การพิจารณาด้วยสีนั้นสามารถแบ่งตาลได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก คือตาลพันธุ์หม้อ เป็นตาลที่มีผลขนาดใหญ่กว่าตาลพันธุ์ไข่ และตาลพันธุ์ผสม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20–25 เซนติเมตร ผิวสีดำเป็นมันไม่มีสีอื่นปน ผลแก่จะมีรอยขีดตามแนวยาวของผล เปลือกหนา มีเนื้อมาก กลุ่มที่สอง คือตาลพันธุ์ไข่เป็นตาลที่มีผลขนาดเล็กกว่าตาลพันธุ์หม้อ และผลสีค่อนข้างเหลืองสามารถแบ่งออกเป็นอีก 2 ชนิด คือ ตาลพันธุ์ไข่เล็ก ผลค่อนข้างเล็ก เปลือกบาง และเต้ามีขนาดเล็ก และตาลพันธุ์ไข่ใหญ่ มีผลและเต้าขนาดใหญ่กว่าตาลพันธุ์ไข่เล็ก และกลุ่มที่สาม คือตาลพันธุ์ผสม เป็นตาลที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างตาลพันธุ์หม้อกับตาลพันธุ์ไข่ ลักษณะผลค่อนข้างใหญ่เกือบเท่าตาลพันธุ์หม้อ ผลมีสีดำปนน้ำตาล หรือสีเหลืองดำ (นรินทร์ พูลเพิ่ม, 2550)

ภาพที่ 2.2 ตาลพันธุ์หม้อ

ภาพที่ 2.3 ตาลพันธุ์ไข่

ภาพที่ 2.4 ตาลพันธุ์ผสม

4. เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)

หมายถึง ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีสามารถนำมาใช้บ่งบอกความเฉพาะเจาะจงทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ลักษณะหรือตัวบ่งชี้นี้สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีการใช้กันมานานแล้วในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การใช้ลักษณะรูปพรรณสัณฐานพืช เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาด รูปร่าง และสีของเมล็ด เครื่องหมายชนิดนี้เรียกว่าเครื่องหมายทางสัณฐาน (Morphological markers) อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวมักแปรผันไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดอื่นเพื่อช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้องยิ่งขึ้น โดยใช้สารชีวโมเลกุลภายในสิ่งมีชีวิตเป็นเครื่องบ่งชี้เรียกเครื่องหมายบ่งชี้นี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) โดยในการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นหลัก เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอในจีโนมซึ่งอาจเป็นตำแหน่งของยีนหรือไม่ใช่ยีน ดีเอ็นเอนี้สามารถนำไปใช้ในกระบวนการไฮบริไดเซชั่น (Hybridization) กับโพรบ (Probe) หรือใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อใช้บ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งจะใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) เพียงคู่เดียวหรือหลายคู่ โดยหลักการจะใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต เมื่อมีความแตกต่างกันจะทำให้ความสามารถของไพรเมอร์เข้าจับสายดีเอ็นเอต้นแบบเกิดความแตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอขึ้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

5. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอนั้นอาจเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งๆบนโครโมโซม (Nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนล (Mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความผันแปร (Variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือเกิดความหลากรูป (Polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบในระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าการตรวจสอบในระดับโมเลกุลของโปรตีน เนื่องจากสามารถเก็บไว้ได้ในระยะเวลาที่ยาวนานกว่า และดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่เกือบทุกเซลล์ในปริมาณที่เท่ากันจึงสามารถตรวจสอบกับเนื้อเยื่อใดๆก็ได้ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม สามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนที่เป็นยีนหรือส่วนที่ไม่ใช่ยีนก็ได้จะมีการแสดงออกของยีนหรือไม่มีการแสดงออกของยีนก็ได้ครอบคลุม

ทั้งจีโนมและมีเครื่องหมายหลายแบบให้เลือกใช้ ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายที่สามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง และสามารถใช้ในด้านต่างๆได้อย่างไม่จำกัด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ Hybridization-based marker และ PCR-based marker

5.1 เครื่องหมายจากการไฮบริดไดซ์ (Hybridization-based marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่กันของลำดับนิวคลีโอไทดีเอ็นเอเป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอติดตาม (Probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไฮบริดไดเซชัน (Hybridization) ตัวอย่าง เช่น อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (McCouch and Tankslay, 1991; Kochert, 1994)

5.2 เครื่องหมายจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR-based marker) เป็นนเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ พีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ อาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) (William *et al*., 1990) เอเอฟแอลพี (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) (Vos *et al*., 1995) และไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือ เอสเอสอาร์ (Simple sequence repeat, SSR) (Brown *et al*., 1996; Powell *et al*., 1996)

6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ขั้นตอนนี้เป็นการนำเอาดีเอ็นเอของพืชที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจ ในที่นี้คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งการเลือกดีเอ็นเอมาตรฐานที่ดีและเหมาะสมสำหรับงานสร้าง DNA barcode เป็นสิ่งสำคัญมาก เพราะจะมีผลต่อการนำไปใช้ระบุชนิดพืชให้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานทำด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะสูงกับบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐาน วิธีการเตรียมปฏิกิริยา PCR สามารถศึกษาได้จากเวปไซต์ของ CBOL Plant Working Group

Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่ง Polymerase คือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการต่อสาย DNA จากสายที่มีอยู่แล้ว Chain reaction คือปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องกันไปเรื่อยๆ PCR ก็คือปฏิกิริยาที่มีการสร้างสาย Nucleotides ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ทำให้เราสามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้มหาศาลจากจำนวนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยภายในเวลาไม่นาน ด้วยหลักการง่ายๆ ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน

1. ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส

2. ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม

3. ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากสาย Primer ในทิศทางจาก 5' ไป 3' อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ Amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA Template) คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอแม่พิมพ์จะมีผลต่อประสิทธิภาพของการทำ PCR ตัวอย่าง ตัวอย่างตรวจที่มีปริมาณ RNA อยู่สูง สามารถแย่งจับกับ Mg^{++} ทำให้ปริมาณ PCR product ลดลง หรือ ตัวอย่างตรวจไม่มีความบริสุทธิ์พอ อาจมีตัวยับยั้ง (Inhibitor) การทำงานของ polymerase เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลดลง ด้วยเหตุผลนี้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอแม่พิมพ์จากตัวอย่างตรวจจึงเป็นสิ่งที่ต้องให้ความสำคัญ ในปัจจุบันมีการเตรียมดีเอ็นเอแม่พิมพ์ตลอดจนชุดน้ำยาสำเร็จรูปจำนวนมากมาย ซึ่งสามารถใช้เตรียมดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์พอสำหรับการทำ PCR ได้โดยไม่ต้องทำการแยกสารสกัดดีเอนเอเพิ่มเติม สำหรับปริมาณดีเอนเอที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR จะอยู่ในช่วง 10^2-10^5copies ส่วน plasmid DNA ใช้ปริมาณเท่ากับ 0.1-1 ไมโครกรัม

Primers เป็นองค์ประกอบสำคัญของความสำเร็จในการทำ PCR ซึ่งขึ้นอยู่กับการเลือกหรือออกแบบ Primers ให้เหมาะสมมีหลักการดังต่อไปนี้

- Primers มีขนาดยาวประมาณ 18-24 เบส
- ประกอบด้วย G+C ประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์
- การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของ Primers ทั้งคู่ไม่ควรมีเบสคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด Primers-dimers
- มีค่า Tm อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และค่า Tm ของ Primers ทั้งคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับความเข้มข้นของ Primers ที่เหมาะสมควรมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1-0.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร การใช้ Primers ในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้โอกาสการเกิด Mispriming primer-dimer และ Non-specific amplified product เพิ่มสูงขึ้น ในทางกลับกัน การใช้ Primers ในปริมาณที่น้อยเกินไปจะทำให้ Primers ถูกใช้หมดก่อนปฏิกิริยาสิ้นสุดลง เป็นผลให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลง (วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ และคณะ, 2551)

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้จำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต นิยมใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลที่ปฏิบัติการได้ง่าย จะให้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่แสดงลักษณะความคล้ายคลึงกัน (Monomorphic) และลักษณะหลากรูป (Polymorphic) ระหว่างตัวอย่าง ซึ่งสามารถนำไปคำนวณตามหลักสมการอัลกอริทึม (Algorithm) ทางคณิตศาสตร์และวิเคราะห์โดยแบบจำลองเพื่อสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หรือแผนภูมิวงศ์วานเชิงวิวัฒนาการ ที่สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Simson *et al*., 2012)

นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณจำเพาะ (Specific site sequencing) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ระดับสูงจากตัวอย่างดีเอ็นเอในบริเวณส่วน “ดีเอ็นเอมาตรฐาน” ที่ต้องการทราบชนิด หรือจัดจำแนก โดยการสกัดดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยจากตัวอย่างแล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยไพรเมอร์จำเพาะของยีน โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส แล้วจึงนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จะถูกนำไปสร้างแผนภูมิสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

7. **เครื่องหมายโมเลกุลแบบ** RAPD

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 8 ถึง 12 นิวคลีโอไทด์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งสะดวกรวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ

เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองดีเอ็นเอ หรือ เทคนิค PCR สุรีพร เกตุงาม (2546) จากการศึกษาวิจัยของ Dhawan *et al*. (2013) ได้ทำการศึกวิจัยการแยกเพศของอินทผลัม เนื่องจากเพศของอินทผลัมจะทราบเมื่ออยู่ในระยะออกดอกซึ่งใช้เวลาหลายปี ทีมวิจัยจึงใช้เทคนิค RAPD และ ISSR ในการตรวจสอบเพศ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ OPA-02 ที่จำเพาะต่ออินทผลัมเพศผู้ซึ่งมีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส และได้ออกแบบ SCAR ไพรเมอร์ จากลำดับดีเอ็นเอบริเวณนั้น จากนั้นนำมาตรวจสอบกับตัวอย่างต้นอ่อนอินทผลัม ผลปรากฏว่าสามารถแยกเพศอินทผลัมได้อย่างถูกต้อง ในลักษณะเดียวกันเดียวกัน Sollimana *et al*. (2017) ได้ทำการศึกษาการแยกเพศของอินทผลัมแต่ใช้เทคนิคการทดสอบโดยการทดสอบการขยายตัวของยีน *sry* ซึ่งเป็นยีนที่พบเฉพาะในเพศผู้ โดยเทคนิค PCR เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเพศอินทผลัมที่ต่างกัน ได้มีการออกแบบ ไพรเมอร์ คู่ใหม่ที่มีความสามารถในการกำหนดเป้าหมายของยีน *sry* เพื่อคัดเลือกพืชเพศผู้ เพราะจะช่วยรับประกันกระบวนการระบุเพศได้อย่างชัดเจนและรวดเร็ว ความถูกต้องตามกฎหมายและความเหมาะสมควบคู่ไปกับความจำเพาะของไพรเมอร์ และการศึกษางานวิจัยของ วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์ (2554) ได้ทำการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ สละสุมาลี สละเนินวง และสละหม้อ เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงทำให้ไม่สามารถแยกพันธุ์ในระยะต้นกล้าได้ จึงพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ โดยใช้เทคนิค

RAPD เช่นเดียวกับงานวิจัยของ เรือนแก้ว ประพฤติ (2553) ได้ทำการศึกษาวิจัยเพื่อแยกสายพันธุ์ของเห็ดหลินจือ เนื่องจากบางสายพันธุ์มีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก ผู้วิจัยจึงได้ใช้เทคนิค ISSR มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือ 9 สายพันธุ์ จากการทดสอบโดยเทคนิค ISSR สามารถระบุพันธุ์ของเห็ดหลินจือได้และผลงานวิจัยของ ภัทรา หงส์ทองดี (2558) ได้ศึกษาการจำแนกพันธุ์และการประเมินความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วย เครื่องหมายดีเอ็นเอ ผู้วิจัยจึงสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอื้องเทียนจำนวน 14 ชนิด โดยใช้ RAPD ไพรเมอร์ 72 ชนิด และ ISSR

ไพรเมอร์ 35 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ RAPD 10 ชนิด และ ไพรเมอร์ ISSR 5 ชนิด สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ด้วย การใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *matK, rpoC1, rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* และ *psbA* เพื่อระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้17, 7, 6 และ 15 ชนิด ตามลำดับ ผลการวิจัยจึงใช้ในการวางแผนการผสมพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ได้อีกทั้งมีการศึกษาผลงานวิจัยของ จันทร์เพ็ญ สะระ และคณะ (2557) ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 กับสีชมพู โดยใช้ RAPD ไพรเมอร์ จำนวน 50 ชนิด จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสบริเวณนั้นและออกแบบไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับลำไยพันธุ์สีชมพู เครื่องหมาย SCAR นี้สามารถใช้ในการจำแนกลำไยพันธุ์สีชมพูและลูกผสมของพันธุ์สีชมพูได้ และยังมีงานวิจัยในลักษณะเดียวกันคือการพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสายสกุล Nymphaea ของ มลิวรรณ นาคขุนทด (2561) พบ RAPD ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมี 18 ไพรเมอร์ (60 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับบัวสายแต่ละสกุลย่อย พบว่าในสกุลย่อย Anecphya จำนวน 7 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 5 เครื่องหมาย โดยมี 2 เครื่องหมาย คือ NYM007 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. atrans* และ *N. immutabilis* และ NYM010 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. gigantea* var. neorosea ในสกุลย่อย Nymphaea จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 2 เครื่องหมาย โดยมี 1 เครื่องหมาย ที่มีความจำเพาะต่อ Nymphaea ‘Sunrise’ และในสกุลย่อยLotos จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 3 เครื่องหมาย แต่ไม่มีเครื่องหมายใดที่จำเพาะต่อบัวสายในสกุลย่อยนี้เลย ดังนั้นสามารถพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR ทั้งหมด 3 เครื่องหมาย สำหรับใช้ระบุชนิดของบัวสายในสกุลย่อย Anecphya และ Nymphaea เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Baruah *et al*. (2019) ได้ทำการการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของขิง โดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR ในการทดสอบใช้

ไพรเมอร์ (RAPD 40 ไพรเมอร์ และ ไพรเมอร์ ISSR 50 ไพรเมอร์) ผลวิจัยพบว่าไพรเมอร์เหล่านี้สามารถใช้สำหรับการศึกษาโปรแกรมการพัฒนาสายพันธุ์ในอนาคตได้ และ การศึกษาการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสน Grevillea สายพันธุ์ลูกผสม Pharmawati and Macfarlane (2013) ด้วยใช้เทคนิค PCR-RAPD พบว่าสน Grevillea ลูกผสมนี้ มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับสน Robyn Gordon เนื่องจากเป็นลูกผสมของ *G. Banksii* และ *G. bipinnatifida* Grevillea (Proteaceae) และงานวิจัยของแยกเพศมะละกอของ Modi *et al.* (2018) ได้ศึกษาการแยกเพศของมะละก่อนตั้งแต่เป็นต้นอ่อนโดยใช้เทคนิค RAPD เนื่องจากมะละกอเป็นพืชเศรษฐกิจและไม่สามารถแยกเพศได้ตั้งแต่ต้นอ่อน จากงานวิจัยเครื่องหมาย SCAR จากเทคนิค RAPD นี้สามารถแยกเพศมะละกอตั้งแต่ต้นอ่อนได้อย่างแม่นยำ และลดค่าใช้จ่ายให้กับเกษตรกรได้

8. โครโมโซมเพศในพืช (Plant sex chromosome)

ระบบการกำหนดเพศในพืชโดยเฉพาะในพืชที่มีเพศแยก (Dioecious plant) จะคล้ายคลึงกับในสัตว์ กล่าวคือมีโครโมโซมเพศเป็น XX ในเพศเมีย และ XY ในเพศผู้ (Westergaard, 1958) แต่อย่างไรก็ดี พืชที่มีลักษณะเพศแยกนี้พบได้เพียงร้อยละ 5 ของจำนวนพืชดอกทั้งหมด (Charlesworth, 2002) ยกตัวอย่างเช่น พืชในวงศ์ Arecaceae ได้แก่ ตาล อินทผลัม เป็นต้น

9. แผนภูมิวงศ์วานเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic)

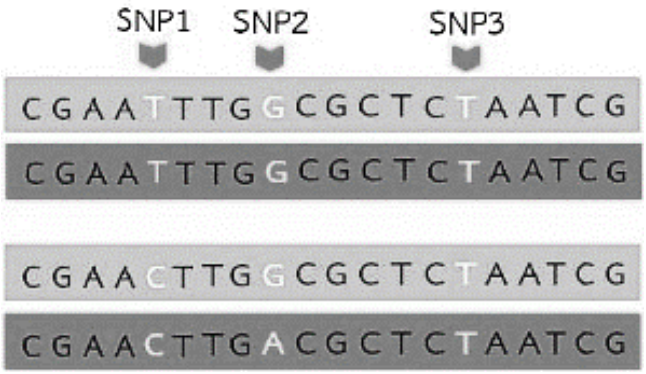
แผนภูมิวงศ์วานเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic) คือการใช้แผนภาพคล้ายต้นไม้ ศึกษาหรืออธิบายวิวัฒนาการ (Evolution) เป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของยีน หรือโปรตีนจนกระทั่งก่อให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ก่อให้เกิดสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆที่แตกแขนงออกไปจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน โดยเป็นการศึกษาจากข้อมูลจริงที่มีอยู่ในปัจจุบัน และใช้ข้อมูลเหล่านั้นเพื่อศึกษาย้อนกลับไปเพื่อหาที่มาและความสัมพันธ์ที่เคยมีอยู่ในอดีต นอกจากนั้นการศึกษาดังกล่าวอาจทำให้เราสามารถเรียนรู้ถึงสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมที่ทำให้สิ่งมีชีวิตบางชนิดสูญพันธุ์ไป หรือทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งความรู้เหล่านี้อาจมีประโยชน์อย่างมากมายสำหรับการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน หรือการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลพันธุศาสตร์ เพื่อให้พืชหรือสัตว์มียีนในรูปแบบที่เราต้องการได้

ผลจากการศึกษาในความสัมพันธ์เหล่านี้จะชัดเจนได้ด้วยแผนภูมิที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ หรือจุดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปเป็นสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง โดย

แผนภูมิดังกล่าวจะมีโครงสร้างคล้ายกับต้นไม้ ซึ่งประกอบด้วยกิ่งก้านสาขาที่แตกแขนงออกจากจุดรวมเดียวกัน ดังนั้นจึงเรียกแผนภูมินี้ว่า แผนภูมิต้นไม้ Phylogenetic tree หรือ Tree of life หรือ Evolutionary tree ในอดีตการสร้าง Phylogenetic tree มักสร้างจากข้อมูลของลักษณะที่ปรากฏ หรือ Phenotypic data เนื่องจากเป็นข้อมูลที่เก็บบันทึกได้ โดยไม่ยุ่งยากมากนักอย่างไรก็ตาม ลักษณะที่ปรากฏหลายๆ ลักษณะมีอิทธิพลอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแสดงออกด้วย ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวที่จะใช้ในการ Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตจึงมีความคลาดเคลื่อนค่อนข้างสูง ดังนั้นการใช้ลำดับดีเอ็นเอในการศึกษาความสัมพันธ์จึงเป็นที่นิยมหลังจากที่เทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลได้ถูกพัฒนาจนมีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วดังที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน (อมรรัตน์ โมฬี, 2549)

8. Single nucleotide polymorphism (SNP)

การกลายเฉพาะจุด (Point mutation) คือ การที่เบสที่จุดหนึ่งภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป หรือมีรูปแบบที่แตกต่างกัน ซึ่งมักจะกล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในส่วนของยีน โดยจะรวมถึงการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของเบส (Insert / Deletion) ที่จุดหนึ่งๆ จำนวน 1-2 (หรือจำนวนน้อย ๆ) เบสด้วย การเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส (Base substitution) ที่จุดหนึ่งๆ ทำให้เกิดรูปแบบที่แตกต่างกันของดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว อาจจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ไม่ใช่ยีน หรือภายในยีนแต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนภายหลังการแปลรหัส จึงมีคำเรียกแบบกลางๆ ว่า เป็นสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเบสเพียง 1 เบสที่ตำแหน่งหนึ่ง คือ **SNP** (Single nucleotide polymorphism) ซึ่งพบได้บ่อยมาก เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสในจีโนมของคนพบว่ามี SNP ประมาณทุกๆ 250-400 คู่เบส การแทนที่เบสหรือ SNP บางตำแหน่งทำให้เกิด RFLP ถ้าเกิดที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่ส่วนใหญ่ไม่ทำให้เกิด RFLP การเกิด SNP ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ มักมีรูปแบบของเบสเพียง 2 ชนิด คือมีเพียง 2 แอลลีล เพราะโอกาสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสที่จุดเดิมเป็นไปได้ยาก



ภาพที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเบสเพียง 1 เบสที่ตำแหน่งหนึ่งหรือ SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ซึ่งพบได้จากการหาลำดับเบส ที่มา: http://biology.ipst.ac.th/wp-content/uploads /sites/16/2014/07/55-11-3.jpg 6 มีนาคม 2562

การตรวจสอบ SNP ได้จากการหาลำดับเบส หรือการเปรียบเทียบลำดับเบสจากข้อมูลที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล การตรวจสอบ SNP หรือการหาจีโนไทป์ของ SNP แบบต่างๆ (SNP genotyping) โดยตรง คือ การหาลำดับเบส แล้วเปรียบเทียบระหว่างแต่ละตัวอย่าง หรือการตรวจสอบทางอ้อมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบางชนิด ประโยชน์ของการศึกษา SNP คือ

1. ช่วยในการวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ในกรณีที่แอลลีลของ SNP อยู่ใกล้ (linkage) หรือเป็นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคพันธุกรรมนั้น

2. ใช้ทำนายความเสี่ยงหรือแนวโน้มในการเกิดโรคทางพันธุกรรมทางพันธุกรรมที่เกิดจากพหุปัจจัย โดยเปรียบเทียบ SNP ของคนปกติกับผู้ป่วย เช่น เบาหวาน มะเร็ง ไมเกรน หอบหืด ภูมิแพ้

3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ SNP กับการตอบสนองต่อยา หรือการศึกษา SNP ที่อยู่ในส่วนของยีน (Coding region) ที่มีผลต่อโครงสร้างของโปรตีน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

รายงานวิจัยของ หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และคณะ (2560) วิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันโดยการอ่านและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MADS-box* ในผลแบบ Dura Pisifera และ Tenera ของ 10 กลุ่มพันธุ์ จำนวน 129 ตัวอย่าง พบสนิปที่สามารถแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้ คือ SNP_{ENGC}(T/C) ใน Ekona Ghana Nigeria และ Calabar SNP_{TaYa}(A/T) ใน Tanzania และ Yangambi SNP_{DA}(C/G) ใน DAMI, SNP_{LaAv} (C/A) ใน La Me และ AVROS, SNP_{Tan} (C/G) ใน Tanzania จากข้อมูล SNP ที่พบได้พัฒนาไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันได้แม่นยำและรวดเร็วด้วยเครื่อง Real-time PCR เพื่อประโยชน์ในการ ตรวจควบคุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อประโยชน์ในการตรวจความตรงตาม

พันธุ์ แล้วยังสามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์กรณีที่มีเรื่องฟ้องร้องเรื่องชนิดของกล้าพันธุ์และความตรงตามพันธุ์ได้คุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้แล้วยังพบรายงานวิจัยของ ประสาน สืบสุขและคณะ (2558) ที่ได้ศึกษาสนิปของยีน *COMT* (Caffeate O-methyl-transferase) ในยางพารา 12 พันธุ์ พบว่ามีการเปลี่ยนเบสแบบสนิปจำนวน 15 ตำแหน่ง คือ C116T, A239G, A251G, G272T, A302T, C340T, C572T, G590T, A854T, A856T, C866T, C1101T, C1062G, A1158G และ G1179C มีลำดับเบสแตกต่างกันในยางพาราแต่ละพันธุ์ ยกเว้น PB235 และ PB260 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราเพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมคุณสมบัติของไม้ และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้

10. ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีวัตถุประสงค์ที่สำคัญคือการระบุชนิดของตัวอย่างที่ไม่ทราบสปีชีส์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Hebert *et al*., 2003) นักวิทยาศาสตร์นั้นได้พัฒนาเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อช่วยในการระบุชนิดและบอกความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เช่น การใช้ข้อมูลโปรตีนและข้อมูลดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะข้อมูลระดับ DNA ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นหลักฐานแสดงถึงสายวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันได้ (Chaveerach, 2009) การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดนักวิทยาศาสตร์ได้แนวคิดจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่างๆแล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิตเพื่อลดความผิดพลาดมีความรวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆโดยอาศัยหลักการว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหนึ่งแตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตอื่นและสามารถจำแนกได้ทุกระยะของพัฒนาการชีวิต (Kositrattana, 2009) นักวิทยาศาสตร์จึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นๆของ DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูงแต่มีความแตกต่างระหว่างชนิดเดียวกันตามมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันองค์กร The Consortium for the Barcode of Life (CBOL), Canadian Centre for DNA Barcoding, Global Biodiversity Information Facility (GBIF) กำลังจัดทำมาตรฐานและคู่มือในการทำ DNA Barcode มาตรฐานที่จัดทำขึ้นใช้ส่วนของยีน Cytochrome C oxidase I (*COI*) ของไมโทคอนเดรียเป็นบาร์โค้ดสำหรับสัตว์และค่อนข้างประสบความสำเร็จอย่างมากสำหรับกลุ่มพืชมีงานวิจัยที่เลือกศึกษายีน *COI* ในการจำแนกสัตว์

แล้วประสบความสำเร็จ ทำให้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในสัตว์ แต่กลับไม่ประสบความสำเร็จในพืช เนื่องจากยีนมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของลำดับ นิวคลีโอไทด์ต่ำมาก จึงไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการแยกและระบุชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการห่างไกลกัน (ต่างสกุลหรือต่างวงศ์) (Ford *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงต้องค้นหาดีเอ็นเอมาตรฐานที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพลาสติด เนื่องจากเชื่อถือว่าน่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการเพียงพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วยให้จำแนกพืชคนละชนิดออกจากกันได้คือบริเวณ *matK, rpoB, rpoC1, rpoC2, accD, ndhA, ndhJ, ndhK, YCF5, YCF9* และ *rbcL* ต่อมาได้มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนและบริเวณที่ไม่ถอดรหัสของพืช 3 บริเวณต่อพืช 1 ชนิด โดยเสนอทางเลือกเป็น 2 แนวทางคือ *rpoC1, matK* และ *trnH -psbA* intergenic spacer หรือ *matK, rpoB* และ *rpoC1* (Chase *et al.*, 2007) และล่าสุดได้มีการเสนอบริเวณมาตรฐานคือ 2 บริเวณ คือ *rbcL* และ *matK* เป็น Core barcode regions (Hollingsworth *et al.*, 2009) งานวิจัยของ วุฒิพงศ์ มหาคำ (2554) ศึกษายีน *rbcL* เป็นยีนที่เหมาะสำหรับการจำแนกพืช ยีน *matK* เป็นยีนที่มีความยาวประมาณ 1500 คู่เบส ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ Maturase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Group II introns splicing (Hilu & Liang, 1997) แม้ว่าจะมีรายงานวิจัยเสนอให้ใช้ดีเอ็นเอ เพียงตำแหน่งเดียวเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชได้ แต่ก็พบข้อจำกัดที่ยังไม่สามารถใช้กับพืชได้ทุกชนิด จึงทำให้มีหลายงานวิจัยแนะนำให้ใช้ DNA Barcode สำหรับพืชมากกว่า 1 ตำแหน่งร่วมกันโดยกลุ่ม CBOL plant working group ได้เสนอให้ใช้ดีเอ็นเอตำแหน่ง *matK* และ *rbcL* ร่วมกันเพื่อใช้เป็น DNA Barcode ของพืช

หลักการของ DNA Barcode มีแนวคิดจากรูปแบบการเรียงตัวที่แตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดคือ อะดีนีน (Adenine, A) ไทมีน (Thymine, T) ไซโทซีน (Cytosine, C) และกวานีน (Guanine, G) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ บริเวณใดบริเวณหนึ่งจะมีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกันออกไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดซึ่งจัดเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นอาจเกิดจากการแทนที่ของเบส (Substitution) การขาดหายของเบส (Deletion) และการเพิ่มของเบส (Insertion) ซึ่งเป็นผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic variation) ขึ้นในการเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้จึงจำเป็นต้องเลือกดีเอ็นเอมาตรฐาน หรือยีนมาตรฐานที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตขนาดสั้นๆ ที่มีความผันแปรสูงและมีความแตกต่างกันมากพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดได้ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อทำหน้าที่ในการระบุชนิด

ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว การออกแบบไพรเมอร์จะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุตำแหน่งของยีนได้ดีและมีความจำเพาะมากขึ้น ซึ่งพบว่ามีหลายงานวิจัยที่ได้มีการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีนที่ใช้ในการระบุตำแหน่ง เช่นงานวิจัยของ Juwattanasomran *et al*. (2010) ได้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับยีน ณ ตำแหน่งที่ต้องการเพิ่ม หรือ ขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ Multiplexed PCR Ramkumar *et.al* (2010) ได้นำไปศึกษากับยีน *GS3* ที่ควบคุมความยาวของเมล็ดข้าว โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับเบสคู่สมกับยีน *GS3* ใน Exon 2 และนำไปช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าว และสุวรรณี ปาลี และคณะ (2558) ได้ศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *BADH2* ในถั่วเหลืองฝักสด ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่ใช้ในการจำแนกพืชย่อมทำให้ผลในการจำแนกพืชนั้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น

งานศึกษาวิจัยเรื่องดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชส่วนใหญ่ เป็นการศึกษาเพื่อหาและทดสอบส่วนของดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นบาร์โค้ดเป็นสำคัญ แม้ว่าจะมีการทดสอบกับพืชจำนวนหลากหลายสปีชีส์ แต่เป้าหมายยังมิใช่การเก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อการใช้งาน อย่างไรก็ตามการใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในช่วงดีเอ็นเอสั้นๆ เพื่อจำแนกสปีชีส์นั้นมีการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อจำแนกพืชหลายชนิด (Vischi *et al*., 2006) โดยมีรายงานวิจัยด้านดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ทำในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เพื่อใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ สำหรับการระบุพืชสกุล *Alpinia* พบว่าข้อมูลลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK* สามารถจำแนกพืชได้ 85.97 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่สามารถจำแนกพืชชนิดที่มีลำดับดีเอ็นเหมือนกันออกจากกันได้ ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีความเหมาะสมในการใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ (มัทนา จองกา และคณะ 2552) ในงานวิจัยของณัฐกร เพชรชาและคณะ (2554) ศึกษาและประเมินความสามารถของยีนในพลาสติด *rpoB* และ *rpoC1* ในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุล *Alpinia* พบว่ายีน *rpoB* สามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ คิดเป็น 62.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน *rpoC1* สามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ คิดเป็น 53.3 เปอร์เซ็นต์ การจำแนกชนิดโดยใช้ *rpoB* หรือ *rpoC19* เพียงชนิดเดียวพบว่าจำแนกได้ไม่ดี เมื่อใช้ข้อมูลจากยีนหลายตำแหน่งมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อจำแนกพืช พบว่าสามารถจำแนกพืชได้ดีขึ้นโดยยีนคู่ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน คือยีน *rpoB* และ *matK* ซึ่งสามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ทุกชนิด ต่อมาพรรษา มนต์แข็งและคณะ (2556) ได้ศึกษารหัสแท่งดีเอ็นเอสำหรับใช้ระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุล *Senna* พบว่าชิ้นดีเอ็นที่อยู่ระหว่างยีน *trnH-psbA* สามารถระบุชนิดของพืชสกุล *Senna* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ 0.04-0.60 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* มีค่าความผันแปร 0.02-0.33 และ

0.04-0.25 ตามลำดับ หรือการศึกษาในข้าวโดย จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และคณะ (2557) พบว่าข้าวมีสีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสูง แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *rpoC1* ในข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ มีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวมีสีได้

การศึกษาเพิ่มเติมในด้านดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้แสดงให้เห็นว่ามีผู้วิจัยให้ความสนใจที่จะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในพืชไปใช้อย่างแพร่หลายในการจำแนกพืช ได้แก่ งานวิจัยการจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ยีนวิเคราะห์ คือยีน *trnK* ร่วมกับยีน *matK* ที่สามารถจำแนกพืชในวงศ์บัวสายออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวญี่ปุ่น (Nuphar) กลุ่มไส้ปลาไหล (Barclaya) บัวสาย บัวกระด้ง ยูริอาเร่ และออนดิเนีย (Nymphaea, Victoria, Euryale and Ondinea (ณัฐกานต์ โกเสนตอ และคณะ, 2557) หรืองานวิจัยของปิยดา บุสดี และคณะ (2558) ได้ศึกษาการจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทย จากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcL* พบว่าไม่สามารถแยกมะม่วงทั้ง 18 พันธุ์ ออกจากกันนอกจากนั้นในการระบุสายพันธุ์หน้าวัว พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของต้นหน้าวัวเพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีความคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่น (ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร และคณะ, 2559) และทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์ และคณะ (2561) ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจำแนกทุเรียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ไม่สามารถแยกความแตกต่างของทุเรียน 40 พันธุ์ ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่นหรือวิเคราะห์ร่วมกันหลายบริเวณ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์และประสิทธิภาพในการจำแนกให้สูงขึ้น ซึ่งในการจับคู่ของยีนนั้นหากไม่เหมาะสมกันก็ไม่มีประสิทธิภาพในการจำแนกได้หรือขึ้นอยู่กับชนิดของพืชในการจำแนกด้วย

จากการสืบค้นจากฐานข้อมูลการตีพิมพ์ผลงานวิจัย ยังไม่พบรายงานการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตาล แต่จากการสืบค้นนั้นมีงานวิจัยทางด้านกล้วยไม้ที่มีผู้วิจัยหลายท่านให้ความสนใจในการศึกษาด้านเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ นฤมล ธนานันต์ และคณะ (2557) ศึกษาวิเคราะห์จีโนมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด พบว่าไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณใดสามารถแยก กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด ออกจากกันได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* ร่วมกันสามารถแยกกล้วยไม้สกุลกลอกตาหมู่สิงโตสยามออกจากกันได้ ยกเว้นสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดงซึ่งสามารถแยกด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอทด์ของยีน *rpoC1* หรือชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* จินต์ ทองสม และคณะ (2558) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ

ที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถแยกชนิดกล้วยไม้ได้ดี แต่แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณร่วมกันสามารถแยกชนิดกล้วยไม้เป็น 3 กลุ่ม ที่มีความสัมพันธ์กันภายในกลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องกับแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ ต่อมา นฤมล ธนานันต์ และคณะ (2559) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถใช้จำแนกกลุ่มกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ครบทุกชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนยีน *matK* และ *rpoC1* สามารถแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้อย่างน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานและการจัดกลุ่มใหม่ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* มีความเหมาะสมต่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งนอกจากนี้ นฤมล ธนานันต์ และคณะ (2559) ยังพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *matK* และ *rbcL* สามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ 17 และ 6 ชนิด ตามลำดับ โดยไม่สามารถจำแนกเอื้องเทียนทั้ง 24 ชนิด ออกจากกันได้ หรือในงานวิจัยการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์ให้สูงขึ้นได้ แต่ระบุได้เพียง 15 ชนิด/พันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 71.4 เปอร์เซ็นต์ (ธีระชัย ธนานันต์ และคณะ, 2560) จากงานวิจัยทั้งสองนี้เพื่อให้งานวิจัยมีความน่าเชื่อถือได้มากขึ้น ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการระบุพันธุ์ให้สูงยิ่งขึ้น ในการศึกษาการจำแนกกล้วยไม้โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นยังมีผู้ให้ความสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมโดย ฐิตาพร มณีเนตร และคณะ (2561) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาได้ 7 และ 15 ชนิด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน ร่วมกัน พบว่าจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตาได้ทั้ง 17 ชนิด แล้วมีรายงานการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* จำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และ *mat*K สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตา 8 และ 11 ชนิด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน ร่วมกัน พบว่าจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตาได้ 15 ชนิด (นฤมล ธนานันต์ และคณะ, 2561) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลาย เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ *matK* และ *rbcL* ร่วมกันพบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (ทีปกา มีเสงี่ยม และคณะ, 2561)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพันธุ์ตาล

ชนิดพืชที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มี 2 ชนิด คือตาล (*Borassus flabellifer* L.) และช้างไห้ (*Borassodendron machadonis* (Ridl.) Becc.) ตาลในจังหวัดเพชรบุรี เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม (ถนอม ภู่เงิน, 2534) และช้างไห้ โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อนของตาลที่ทราบพันธุ์แน่ชัด อายุ 15–20 ปี ที่สวนตาลลุงถนอม ตำบลถ้ำรงค์ อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี และใบอ่อนของช้างไห้ ที่สวนพฤกษศาสตร์เพชรวนาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

1. ชุดโกร่งบดตัวอย่าง (Mortar และ Pestle)
2. กระบอกตวง (Cylinder)
3. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipettes) และทิปขนาดต่างๆ
5. ตู้ดูดควัน (Fume hood)
6. เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed refrigerated centrifuge)
8. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งไฟฟ้า (Electric balance)
9. เครื่องทำความเย็น (Freezer) ได้แก่ ตู้แช่ –20 $^{\circ}$C และตู้เย็น 4 $^{\circ}$C
10. ตู้อบแห้ง (Hot air oven)
11. เครื่องผสม (Vortex mixer)
12. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
13. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (Nano drop) เป็นต้น

2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1. หลอดสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR tube)
2. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipettes) และทิปขนาดต่างๆ
4. เครื่องผสม (Vortex mixer)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler machine)
6. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)
7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งไฟฟ้า (Electric balance)
8. ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis set)
9. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)
10. เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel documentation)
11. เครื่องถ่ายภาพเจล (UV trans-illuminator)

3. สารเคมี

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

1. 4% ซิทิลไตรเมทธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (CTAB, cetyltrimethyl ammonium bromide)
2. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) ความเข้มข้น 2.8 โมลาร์
3. เอทิลีนไดอามีนเตตราอะซิติก (Ethylene diamine tetra acetic acid, EDTA) พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์
4. ทริสคลอไรด์ (Tris-HCl) พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์
5. ตาเมอแคปโตเอทานอล (β –mercaptoethanol)
6. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
7. ไอโซ-เอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcochol)
8. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
9. เอทานอลบริสุทธ์ (Absolute ethanol)
10. เอนไซม์ Proteinase K
11. ฟีนอล (phenol)
12. สารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
13. ไนโตเจนเหลว (Liquid nitrogen)

3.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1. ชุดสารเคมีสำเร็จรูป Taq DNA polymerase (Recombinant, Vivantis®) ประกอบด้วย เอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์
2. dNTPs (Deoxyribonucleotide triphosphate) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
3. น้ำกลั่น

3.3 การวิเคราะห์เจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. เจลอะกาโรส (Agarose gel)
2. สารละลายบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า (Tris-base, EDTA pH 8.0 และ glacial acetic acid)
3. สารละลายบัฟเฟอร์ DNA loading ความเข้มข้น 6 เท่า (Glyceral และ bromophenol blue)
4. สารเรืองแสง (RedSafe DNA Stain)
5. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder, (InvitrogenTM Life Technology, USA)
6. น้ำกลั่น

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

1. สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของตาลและช้างไห้โดยประยุกต์ตามวิธีการของ Doyle *et al.* (1987) โดยบดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด นำผงใบตาลบด 0.1 กรัม ตักใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติมบัฟเฟอร์สกัด (Extraction buffer) (2% cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 1.4 M NaCl, 20 mM Ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) และ 100 mM Tris-HCl pH 8.0 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี β-mercaptoethanol เข้มข้น 2%) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

2. เมื่อครบเวลาเติม ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol = 25: 24: 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน ประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

3. จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform: Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (ดูดน้ำใสจากข้อ 2 ได้เท่าไหร่เติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 เท่าของน้ำใสที่ดูดได้) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

4. เมื่อครบเวลาดูดน้ำใสส่วนบน ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม ไอโซ-โพรพานอล (Isopropanol) 0.6 เท่า ของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

5. จากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol จำนวน 2 ครั้ง แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง

6. ละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร หรือละลายด้วยน้ำ 100 ไมโครลิตร

7. ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (Gel electrophoresis) 1.5 เปอร์เซ็นต์

4.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงตรวจสอบปริมาณดีเอ็นได้ด้วย เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (Nano drop) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรโดยดูอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (O.D260/O.D280) และนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผสมกับสารเรืองแสง (Red safe) ในการย้อม และใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 25 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิครหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode)

เจือจางดีเอ็นเอจากตาลทั้ง 3 พันธุ์และช้างไห้ ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) เพื่อเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcL* และ *matK* โดยวิธี Polymerase chain

reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดที่ออกแบบให้มีความจำเพาะดังที่แสดงในตารางที่ 3.1 และมีรายละเอียดของปริมาณและสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดังตารางที่ 3.2 , 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode)

Name	Forward primer (5'⟶3')	Reverse primer (5'⟶3')	Product size (bp)	Annealing Temp (°C)
rbcL	ATGTCACCACAAAC AGAGACTAAAGC	GTAAAATCAAGTCC ACCRCG	600	62.5
matK	ATCGATTCGTTGGG CACAAC	GCATGAAGGGATC CTGAAG	600	64

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สาร	**ปริมาตร (µl)**
ddH_2O	7.31
50 ng/µl genomic DNA	4
10 µM F Primer	0.6
10 µM R Primer	0.6
50 mM $MgCl_2$	0.6
2 mM dNTP	0.3
10X บัฟเฟอร์	1.5
5 unit/µl Taq DNA polymerase	0.09
ปริมาตรรวม	**15**

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *rbcL*

ขั้นตอน	**อุณหภูมิ (°C)**	**ระยะเวลา(นาที)**	**จำนวนรอบ**
Initiation Denaturation	95	5	-
Denaturation	95	0.30	35
Annealing	62.5	0.40	
Extension	72	1	
Final Extension	72	10	-

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *matK*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา(นาที)	จำนวนรอบ
Initiation Denaturation	95	5	-
Denaturation	95	0.30	35
Annealing	64	0.30	
Extension	72	1.20	
Final Extension	72	10	-

4.4 การตรวจสอบคุณภาพของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) โดยวิธี Electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำการตรวจสอบคุณภาพโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นด้วยตู้ไมโครเวฟ นาน 3 นาที นำออกมาให้อุณหภูมิลงลด เทใส่ถาดแล้วเสียบหวี ทิ้งให้เจลแข็ง 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งดึงหวีออกนำเจลวางลงบนชั้นวางเจล เท 1X TAE ลงในถาดให้ท่วมเจล นำ PCR Product ผสมกับสารเรืองแสง (Red safe) และ Loading dye ที่เตรียมไว้หยอดลงไปในหลุมเจล ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เวลานาน 25 นาที แล้วตรวจสอบผลโดยนำแผ่นเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel documentation บันทึกภาพผลการทดลอง

4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์มักใช้เป็นขั้นตอนสุดท้ายเพื่อหาผลสรุปที่แน่นอนและยังถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) เพราะให้ผลถูกต้องเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ รายละเอียดขั้นตอนการทำประกอบด้วยการนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วย EXOSAP-IT (Thermo fisher scientific, USA) โดยใช้ผลิตผล PCR จำนวน 5 µl ผสมกับ ExoSAP-IT จำนวน 2 µl จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที และตามด้วยบ่มที่อุณหภูมิ 80°C นาน 15 นาที ทำการวัดความเข้มข้นที่ได้โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA) ผลผลิต PCR ที่ได้ถูกส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากบริษัทผู้ให้บริการ (First base, ประเทศมาเลเซีย) ด้วยเครื่องอ่านแบบอัตโนมัติ (Direct DNA sequencing) โดยใช้แสงเลเซอร์และเครื่องตรวจจับสัญญาณสาย DNA ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นทีละหนึ่งนิวคลีโอไทด์และมีสารเรืองแสงตามชนิดของ Dideoxynucleotide เมื่อเคลื่อนที่ผ่านแสงเลเซอร์และจะถูกอ่านเป็นลำดับเบสของสาย DNA

5. การวิเคราะห์ผล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK* ในตาลและช้างไห้ มาตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อยืนยันความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม nBLAST (Altschul *et al*., 1990) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) หลังจากนั้นจึงนำลำดับของนิวคลีโอไทด์ *rbcL* และ *matK* ของตาลและช้างไห้มาเปรียบเทียบด้วยการจัดให้ตรงตำแหน่ง (Alignment) โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0) (Tamura *et al*., 2013) และทดสอบโมเดลที่เหมาะสมก่อนการนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยทำการคำนวณหาโมเดลที่เหมาะสม จากโปรแกรม Kakusan4 (Tanabe, 2007) และสร้าง Phylogenetic tree ในรูปแบบของ Bayesian inferences โดยใช้โปรแกรม MrBayes; Bayesian inference of phylogeny (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) เพื่อทำการจำลอง Phylogenetic tree 10 ล้านครั้งจำนวน 100,000 tree นำข้อมูล Phylogenetic tree ที่ได้มาผสานเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Tree Annotator (Drummond *et al*., 2012) ตรวจสอบและตกแต่งโดยใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4 (Page, 1996)

6. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของตาลเพศเมีย โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของตาลเพศเมีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ และตาลพันธุ์ผสม มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 และตัวอย่างดีเอ็นเอของตาลเพศผู้ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของเพศผู้ทั้ง 3 สายพันธุ์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ทั้ง 2 ตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR ดังตารางที่ 3.2

แล้วนำไปใส่ในเครื่อง Thermal Cycler ที่เป็นเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้อุณหภูมิตามขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

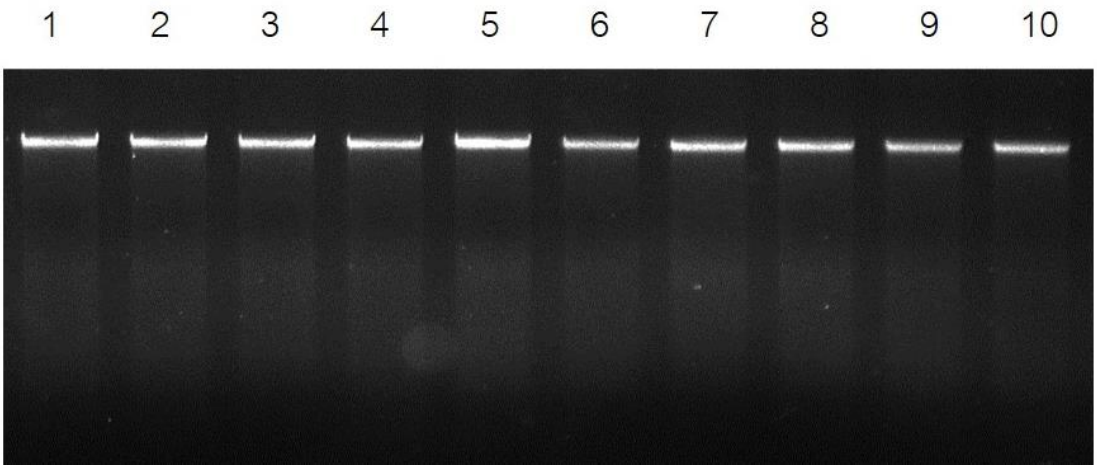
Pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5.00 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 0.30 นาที	34 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 0.30 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1.00 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5.00 นาที	

แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Electrophoresis ดังในหัวข้อที่ 4.4

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการสกัดแยกดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของตาล เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์จะพบว่าดีเอ็นเอมีแถบชัดเจน เมื่อนำไปวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Nanodrop พบว่าดีเอ็นเอมีความเข้มข้นตั้งแต่ 348 ถึง 980 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง (Redsafe) แล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีการแตกหักเล็กน้อยและมีคุณภาพดีเพราะดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นแถบชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 4.1 โดยกำหนดหมายเลขของดีเอ็นเอที่ได้จากตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ ดังตารางที่ 4.1



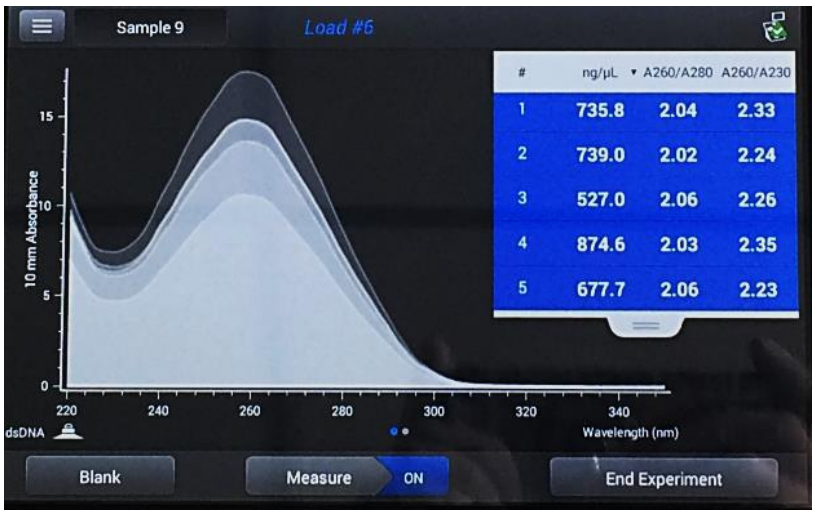
ภาพที่ 4.1 คุณภาพของดีเอ็นจากการตรวจสอบโดยวิธี Agarose gel electrophoresis

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) หมายเลข 1-10 คือดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ รายละเอียดดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การกำหนดดีหมายเลขของเอ็นเอที่ได้จากตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้

พันธุ์ตาล	ต้นที่	หมายเลข
พันธุ์หม้อ	1	1
	2	2
	3	3
พันธุ์ไข่	1	4
	2	5
	3	6
พันธุ์ผสม	1	7
	2	8
	3	9
ช้างไห้	1	10

การสกัดดีเอ็นเอจากใบตาล ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ พบว่าสารละลายที่ได้จากใบตาล มีลักษณะใส ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) จะเห็นตะกอนสีขาว ละลายตะกอนด้วยน้ำ เมื่อนำไปตรวจสอบปริมาณด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกดีเอ็นเอจากใบตาลได้ทุกพันธุ์ แถบดีเอ็นเอที่แยกได้มีความคมชัด เมื่อดูจากแถบดีเอ็นเอของไรโบโซมที่แยกจากกันอย่างเห็นได้ชัด และไม่มีการปนเปื้อนของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสในระหว่างขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ แต่จะต้องใช้การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย ดังแสดงภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm)

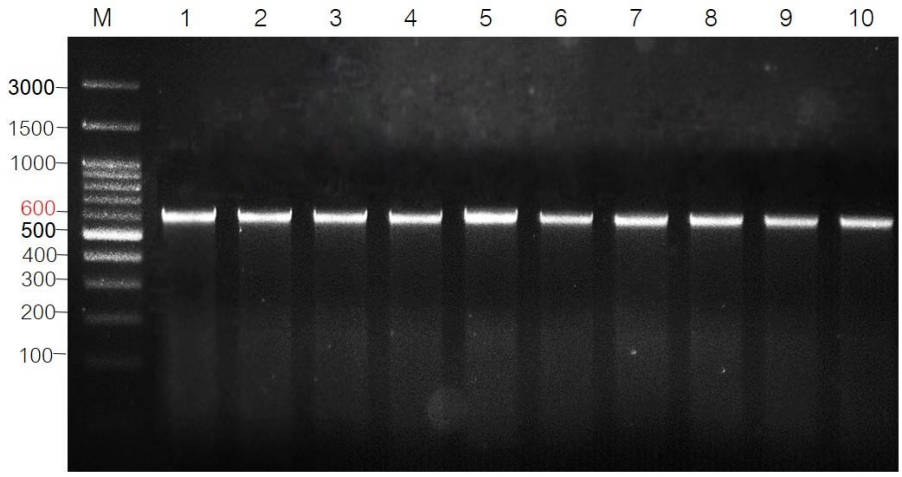
วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (DNA concentration) ความบริสุทธิ์ (DNA purity) และคุณภาพของดีเอ็นเอ (DNA quality) ดูผล จากการนำ DNA ไปวัด OD และหาอัตราส่วน (Ratio) ของ OD 260/280

2. ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิครหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode)

2.1 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*

2.1.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของตาลทั้ง 3 พันธุ์ และช้างไห้ รวม 10 ตัวอย่าง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rbcL* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง โดยแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมดนี้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในตาลและช้างไห้

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในตาลและช้างไห้ 10 ตัวอย่างด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอรเส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (InvitrogenTM Life Technology, USA), 1-10 คือ (1) ตาลพันธุ์หม้อ 1 (2) ตาลพันธุ์หม้อ 2 (3) ตาลพันธุ์หม้อ 3 (4) ตาลพันธุ์ไข่ 1 (5) ตาลพันธุ์ไข่ 2 (6) ตาลพันธุ์ไข่ 3 (7) ตาลพันธุ์ผสม 1 (8) ตาลพันธุ์ผสม 2 (9) ตาลพันธุ์ผสม 3 (10) ช้างไห้]

2.1.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *rbcL* จากบริษัทผู้ให้บริการ (Firstbase, ประเทศมาเลเซีย) ด้วยเครื่องอ่านแบบอัตโนมัติ (Direct DNA sequencing) โดยใช้แสงเลเซอร์และเครื่องตรวจจับสัญญาณสาย DNA ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นทีละหนึ่งนิวคลีโอไทด์และมีสารเรืองแสงตามชนิดของ Dideoxynucleotide เมื่อเคลื่อนที่ผ่านแสงเลเซอร์และจะถูกอ่านเป็นลำดับเบสของสาย DNA ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 4.1 - 4.10 เป็นลำดับเบสที่ได้จากยีน *rbcL* ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์หม้อ 2 ตาลพันธุ์หม้อ3 ตาลพันธุ์ไข่ 1 ตาลพันธุ์ไข่ 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ผสม1 ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ผสม 3 และช้างไห้ ตามลำดับ ซึ่งได้ผลการหาลำดับเบสดังแสดงในภาคผนวก ก ผลลำดับ นิวคลีโอไทด์

2.1.3 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

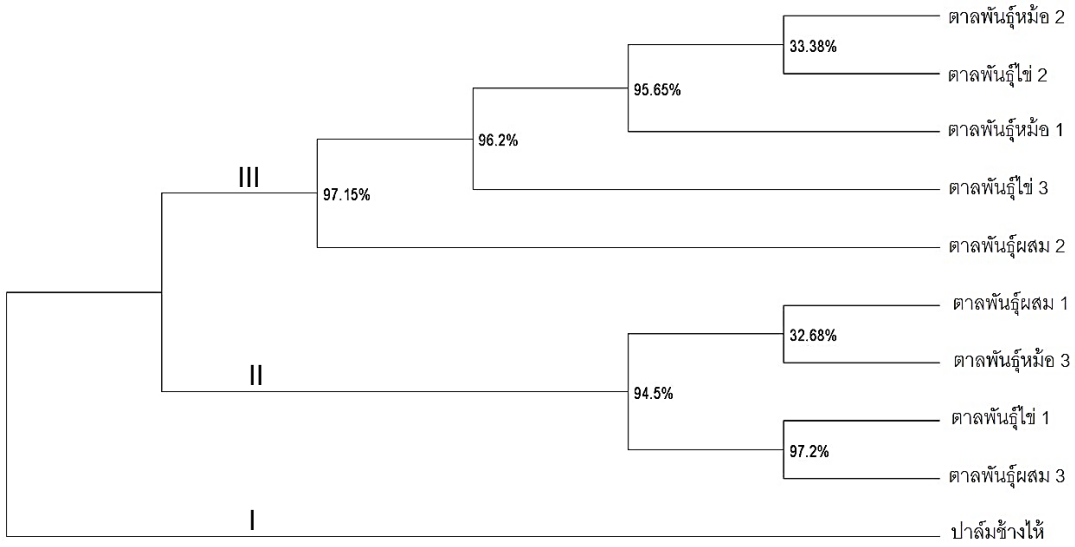
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของตาลแต่ละพันธุ์และช้างไห้ที่ได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล Genbank (NCBI, National Center for Biotechnology Information) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในตาลทั้ง 9 ตัวอย่าง ตรงกับพืชในฐานข้อมูล คือ *Borassus flabellifer* และในช้างไห้ตรงกับพืชในฐานข้อมูล คือ *Borassodendron machadonis* ผลการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank ตรงกับชนิดของพืชที่นำมาศึกษาโดยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าอยู่ที่ระดับ 97%-100% แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของตาลแต่ละพันธุ์และช้างไห้ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank มีความถูกต้อง ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของตาลแต่ละพันธุ์และช้างไห้ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI

ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง	ชนิดของพืชที่ตรงกับฐานข้อมูล	Accession #	% ความเหมือน
1	ตาลพันธุ์หม้อ 1	*Borassus flabellifer*	LC377173.1	99%
2	ตาลพันธุ์หม้อ 2	*Borassus flabellifer*	AM903205.1	99%
3	ตาลพันธุ์หม้อ 3	*Borassus flabellifer*	AM903205.1	99%
4	ตาลพันธุ์ไข่ 1	*Borassus flabellifer*	AM903205.1	99%
5	ตาลพันธุ์ไข่ 2	*Borassus flabellifer*	AM903205.1	99%
6	ตาลพันธุ์ไข่ 3	*Borassus flabellifer*	AM903205.1	99%
7	ตาลพันธุ์ผสม 1	*Borassus flabellifer*	AM903205.1	99%
8	ตาลพันธุ์ผสม 2	*Borassus flabellifer*	AM903205.1	99%
9	ตาลพันธุ์ผสม 3	*Borassus flabellifer*	LC377175.1	100%
10	ช้างไห้	*Borassodendron machadonis*	AJ404768.1	97%

2.1.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตาลและช้างไห้ รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ของยีน *rbcL* มาทำการคำนวณหาโมเดลที่เหมาะสมจากโปรแกรม Kakusan4 (Tanabe, 2007) และสร้าง Phylogenetic tree ในรูปแบบของ Bayesian inferences โดยใช้โปรแกรม MrBayes; Bayesian inference of phylogeny โดยทำการจำลอง Phylogenetic tree 10 ล้านครั้ง จำนวน 100,000 tree นำข้อมูล Phylogenetic tree ที่ได้มาผสานเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Tree Annotator ตรวจสอบและตกแต่งโดยใช้โปรแกรม FigTree V.1.4.4 ซึ่งผลของ tree ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.029 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *rbcL* ที่ใช้แตกต่างกันไม่เกิน 5% แสดงให้เห็นว่าช้างไห้ ไม่ควรถูกจัดเป็น *Borassodendron machadonis*



ภาพที่ 4.4 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในรูปแบบของ Bayesian inferences

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ช้างไห้ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 1 ตาลพันธุ์หม้อ 3 ตาลพันธุ์ผสม 3 และตาลพันธุ์ไข่ 1 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์ไข่ 2 และตาลพันธุ์หม้อ 2

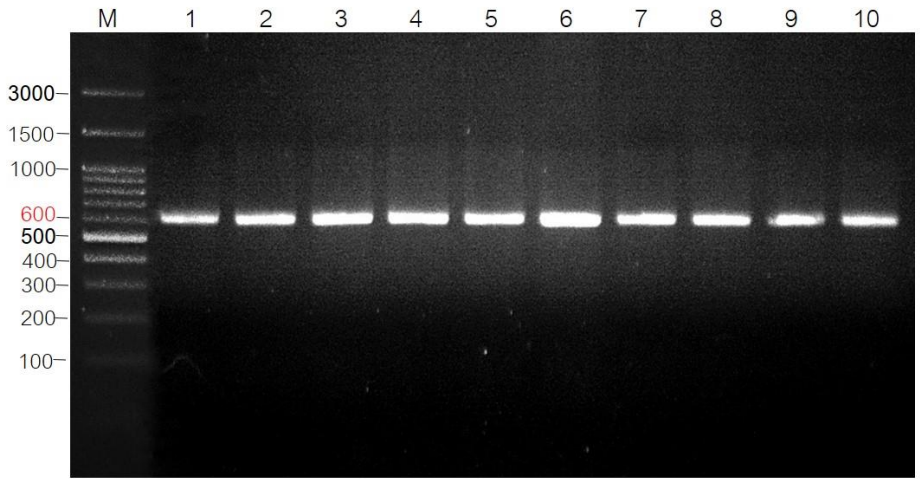
ตารางที่ 4.3 ค่าทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ตาลเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของความแตกต่างยีน *rbcL*

	ตาลพันธุ์หม้อ 1	ตาลพันธุ์หม้อ 2	ตาลพันธุ์หม้อ 3	ตาลพันธุ์ไข่ 1	ตาลพันธุ์ไข่ 2	ตาลพันธุ์ไข่ 3	ตาลพันธุ์ผสม 1	ตาลพันธุ์ผสม 2	ตาลพันธุ์ผสม 3	ช้างไห้
ตาลพันธุ์หม้อ 1	0.000									
ตาลพันธุ์หม้อ 2	0.002	0.000								
ตาลพันธุ์หม้อ 3	0.005	0.007	0.000							
ตาลพันธุ์ไข่ 1	0.007	0.009	0.005	0.000						
ตาลพันธุ์ไข่ 2	0.002	0.000	0.007	0.009	0.000					
ตาลพันธุ์ไข่ 3	0.004	0.002	0.005	0.011	0.002	0.000				
ตาลพันธุ์ผสม 1	0.005	0.007	0.000	0.005	0.007	0.005	0.000			
ตาลพันธุ์ผสม 2	0.005	0.004	0.004	0.009	0.004	0.002	0.004	0.000		
ตาลพันธุ์ผสม 3	0.004	0.005	0.002	0.004	0.005	0.007	0.002	0.005	0.000	
ช้างไห้	0.026	0.027	0.024	0.029	0.027	0.026	0.024	0.024	0.026	0.000

2.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

2.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของตาลทั้ง 3 พันธุ์ และช้างไห้ รวม 10 ตัวอย่าง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *matK* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง โดยแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมดนี้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* ในตาลและช้างไห้

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* ในตาลและช้างไห้ 10 ตัวอย่างด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอรเส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-10 คือ (1) ตาลพันธุ์หม้อ 1 (2) ตาลพันธุ์หม้อ 2 (3) ตาลพันธุ์หม้อ 3 (4) ตาลพันธุ์ไข่ 1 (5) ตาลพันธุ์ไข่ 2 (6) ตาลพันธุ์ไข่ 3 (7) ตาลพันธุ์ผสม 1 (8) ตาลพันธุ์ผสม 2 (9) ตาลพันธุ์ผสม 3 (10) ช้างไห้]

2.2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *matK* จากบริษัทผู้ให้บริการ (Firstbase, ประเทศมาเลเซีย) ด้วยเครื่องอ่านแบบอัตโนมัติ (Direct DNA sequencing) โดยใช้แสงเลเซอร์และเครื่องตรวจจับสัญญาณสาย DNA ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นทีละหนึ่งนิวคลีโอไทด์และมีสารเรืองแสงตามชนิดของ Dideoxynucleotide เมื่อ

เคลื่อนที่ผ่านแสงเลเซอร์และจะถูกอ่านเป็นลำดับเบสของสาย DNA ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 4.11 - 4.20 เป็นลำดับเบสที่ได้จากยีน *matK* ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์หม้อ 2 ตาลพันธุ์หม้อ3 ตาลพันธุ์ไข่ 1 ตาลพันธุ์ไข่ 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ผสม1 ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ผสม 3 และช้างไห้ ตามลำดับ ซึ่งได้ผลการหาลำดับเบสดังแสดงในภาคผนวก ก ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

2.2.3 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

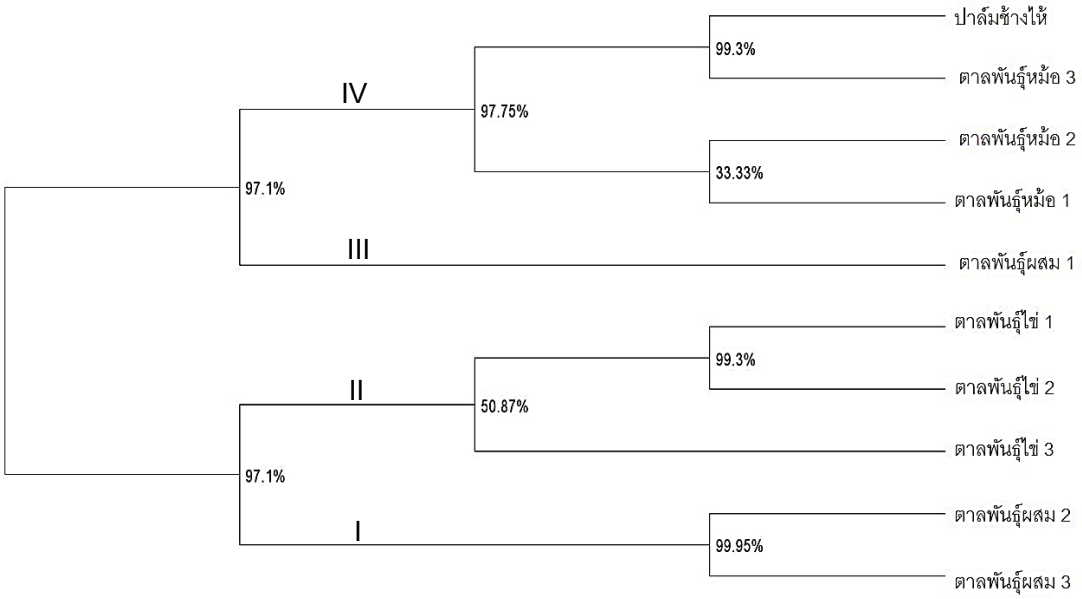
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของตาลแต่ละพันธุ์และช้างไห้ที่ได้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล Genbank (NCBI, National Center for Biotechnology Information) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในตาลทั้ง 9 ตัวอย่าง ตรงกับพืชในฐานข้อมูล คือ *Borassus flabellifer* และในช้างไห้ตรงกับพืชในฐานข้อมูล คือ *Borassodendron machadonis* ผลการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank ตรงกับชนิดของพืชที่นำมาศึกษาโดยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าอยู่ที่ระดับ 98%-100% แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของตาลแต่ละพันธุ์และช้างไห้ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank มีความถูกต้อง ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* กับฐานข้อมูล Genbank

ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง	ลักษณะของพืชสกุลที่ใกล้เคียง	Accession #	% ความเหมือน
1	ตาลพันธุ์หม้อ 1	*Borassus flabellifer*	AM114604.1	100%
2	ตาลพันธุ์หม้อ 2	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	98%
3	ตาลพันธุ์หม้อ 3	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	99%
4	ตาลพันธุ์ไข่ 1	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	99%
5	ตาลพันธุ์ไข่ 2	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	99%
6	ตาลพันธุ์ไข่ 3	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	99%
7	ตาลพันธุ์ผสม 1	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	99%
8	ตาลพันธุ์ผสม 2	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	98%
9	ตาลพันธุ์ผสม 3	*Borassus flabellifer*	KP901247.1	99%
10	ช้างไห้	*Borassodendron machadonis*	KT312937.1	99%

2.2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตาลและช้างไห้ รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ของยีน *matK* มาทำการคำนวณหาโมเดลที่เหมาะสมจากโปรแกรม Kakusan4 และสร้าง Phylogenetic tree ในรูปแบบของ Bayesian inferences โดยใช้โปรแกรม MrBayes; Bayesian inference of phylogeny โดยทำการจำลอง Phylogenetic tree 10 ล้านครั้ง จำนวน 100,000 tree นำข้อมูล Phylogenetic tree ที่ได้มาผสานเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Tree Annotator ตรวจสอบและตกแต่งโดยใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4 ซึ่งผลของ tree ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.040 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *matK* ที่ใช้แตกต่างกันไม่เกิน 5% แสดงให้เห็นว่าช้างไห้ ไม่ควรถูกจัดเป็น *Borassodendron machadonis*



ภาพที่ 4.6 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ตาล ตาลพันธุ์ผสม 2 และตาลพันธุ์ผสม 3 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ไข่ 1 และตาลพันธุ์ไข่ 2 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 1 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์หม้อ 2 ตาลพันธุ์หม้อ 3 และช้างไห้

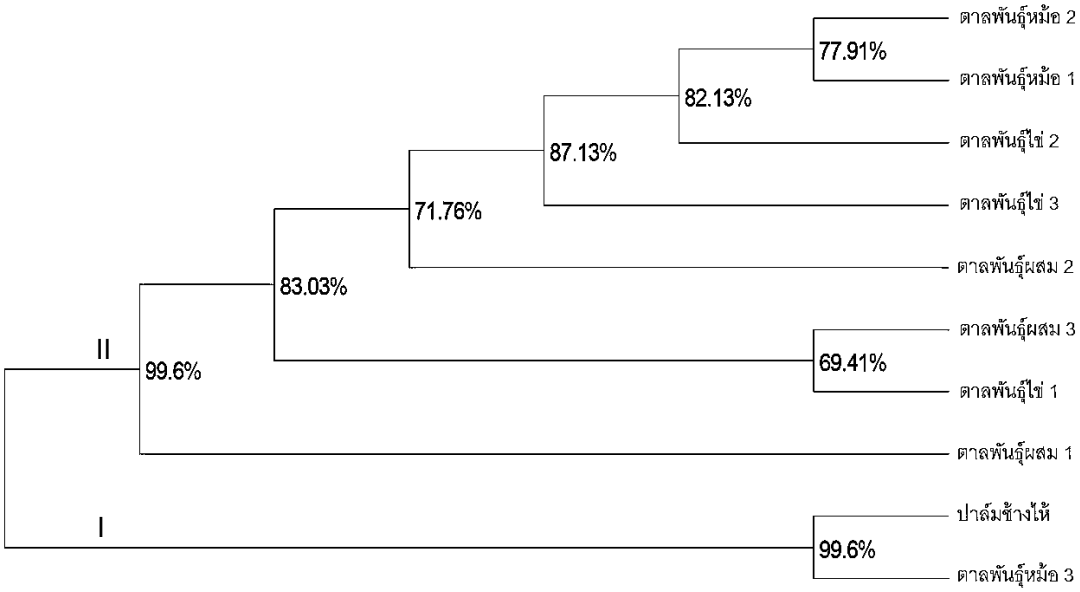
ตารางที่ 4.5 ค่าทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ตาลเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของความแตกต่างยีน *matK*

	ตาลพันธุ์หม้อ 1	ตาลพันธุ์หม้อ 2	ตาลพันธุ์หม้อ 3	ตาลพันธุ์ไข่ 1	ตาลพันธุ์ไข่ 2	ตาลพันธุ์ไข่ 3	ตาลพันธุ์ผสม 1	ตาลพันธุ์ผสม 2	ตาลพันธุ์ผสม 3	ช้างไห้
ตาลพันธุ์หม้อ 1	0.000									
ตาลพันธุ์หม้อ 2	0.005	0.000								
ตาลพันธุ์หม้อ 3	0.005	0.007	0.000							
ตาลพันธุ์ไข่ 1	0.014	0.016	0.014	0.000						
ตาลพันธุ์ไข่ 2	0.011	0.013	0.007	0.007	0.000					
ตาลพันธุ์ไข่ 3	0.025	0.027	0.023	0.023	0.027	0.000				
ตาลพันธุ์ผสม 1	0.004	0.005	0.005	0.011	0.011	0.022	0.000			
ตาลพันธุ์ผสม 2	0.009	0.011	0.011	0.013	0.013	0.023	0.005	0.000		
ตาลพันธุ์ผสม 3	0.009	0.011	0.011	0.013	0.013	0.023	0.005	0.000	0.000	
ช้างไห้	0.022	0.023	0.016	0.031	0.023	0.040	0.022	0.020	0.020	0.000

2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK* ร่วมกัน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตาลและช้างไห้ รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง *rbcL* และ *matK* ร่วมกัน มาทำการคำนวณหาโมเดลที่เหมาะสมจากโปรแกรม Kakusan4 และสร้าง Phylogenetic tree ในรูปแบบของ Bayesian inferences โดยใช้โปรแกรม MrBayes; Bayesian inference of phylogeny โดยทำการจำลอง Phylogenetic tree 10 ล้านครั้ง จำนวน 100,000 tree นำข้อมูล Phylogenetic tree ที่ได้มาผสานเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Tree Annotator ตรวจสอบและตกแต่งโดยใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4

ดังนั้นนำตำแหน่งที่ทำการตรวจสอบทั้งหมดมาวิเคราะห์ร่วมกัน โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่ง มาสร้าง Phylogenetic tree ซึ่งผลของ tree ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.033 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *rbcL* และ *matK* ที่ใช้ร่วมกันแตกต่างไม่เกิน 5% แสดงให้เห็นว่าช้างไห้ ไม่ควรแยกออกเป็น *Borassodendron machadonis*



ภาพที่ 4.7 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1

ประกอบด้วย ตาลพันธุ์หม้อ 3 และช้างไห้ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 1 ตาลพันธุ์ไข่ 1 ตาลพันธุ์ผสม 3 ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ไข่ 2 ตาลพันธุ์หม้อ 1 และตาลพันธุ์หม้อ 2

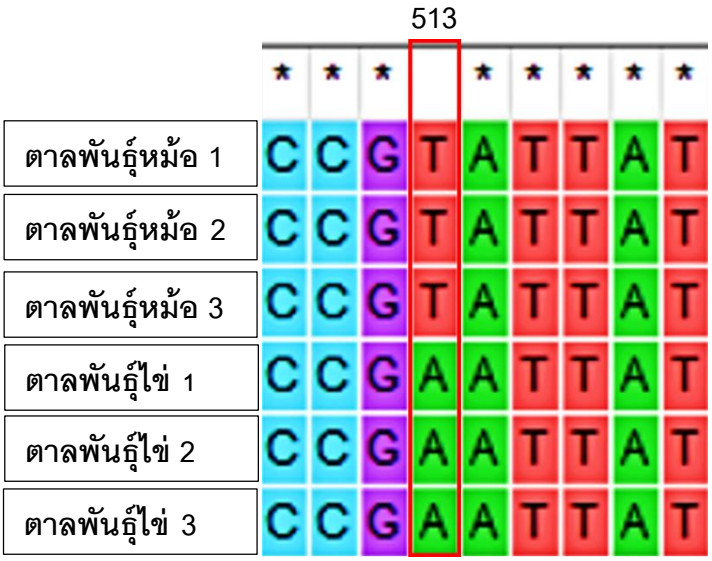
จาก Phylogenetic tree ของตาลที่นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 4 กลุ่มซึ่งใน 4 กลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ได้คือ กลุ่มของตาลพันธุ์หม้อ และกลุ่มของตาลพันธุ์ไข่ โดยช้างไห้นั้นถูกจัดรวมในกลุ่มของตาลพันธุ์หม้อ แสดงให้เห็นว่าช้างไห้น่าจะยังจัดอยู่ในกลุ่มของตาลเหมือนเดิม และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK* ร่วมกันในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกความสัมพันธ์ของตาลได้ดีกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีนเพียงตัวเดียว และจากการศึกษาค่าทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ตาลและช้างไห้พบว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนที่ใช้แตกต่างกันไม่เกิน 5% แสดงให้เห็นว่าช้างไห้ ไม่ควรถูกแยกออกเป็น *Borassodendron machadonis* ควรจัดไว้ในสกุลเดียวกับตาล

ตารางที่ 4.6 ค่าทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ตาลเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของความแตกต่างยีน *rbcL* และ *matK* ร่วมกัน

	ตาลพันธุ์หม้อ 1	ตาลพันธุ์หม้อ 2	ตาลพันธุ์หม้อ 3	ตาลพันธุ์ไข่ 1	ตาลพันธุ์ไข่ 2	ตาลพันธุ์ไข่ 3	ตาลพันธุ์ผสม 1	ตาลพันธุ์ผสม 2	ตาลพันธุ์ผสม 3	ช้างไห้
ตาลพันธุ์หม้อ 1	0.000									
ตาลพันธุ์หม้อ 2	0.004	0.000								
ตาลพันธุ์หม้อ 3	0.005	0.007	0.000							
ตาลพันธุ์ไข่ 1	0.011	0.013	0.010	0.000						
ตาลพันธุ์ไข่ 2	0.006	0.006	0.007	0.008	0.000					
ตาลพันธุ์ไข่ 3	0.015	0.015	0.015	0.017	0.015	0.000				
ตาลพันธุ์ผสม 1	0.005	0.006	0.003	0.008	0.009	0.014	0.000			
ตาลพันธุ์ผสม 2	0.007	0.007	0.007	0.011	0.008	0.013	0.005	0.000		
ตาลพันธุ์ผสม 3	0.006	0.008	0.006	0.008	0.009	0.015	0.004	0.003	0.000	
ช้างไห้	0.024	0.025	0.020	0.030	0.025	0.033	0.023	0.022	0.023	0.000

3. การเปรียบเทียบตำแหน่ง SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

การเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งลำดับเบสแบบ SNP ของยีน *matK* ที่เกิดกับตาล 2 พันธุ์ คือ ตาลพันธุ์หม้อ และตาลพันธุ์ไข่ โดยพบตำแหน่งของ SNP ทั้งหมด 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 513 ของในตาลพันธุ์หม้อมีลำดับเบส T ในตาลพันธุ์ไข่ลำดับเบส A แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเบสเพียง 1 เบสดังแสดงในภาพที่ 4.8 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งลำดับเบสแบบ SNP ในส่วนของยีนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ไม่พบการเปลี่ยนของตำแหน่งลำดับเบสแบบ SNP

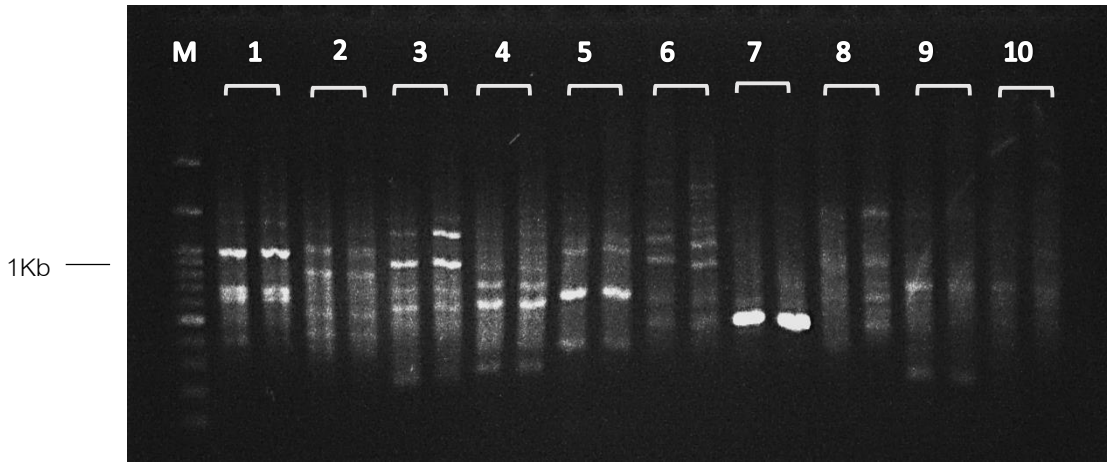


ภาพที่ 4.8 ตำแหน่งที่ 513 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเบสเพียง 1 เบสของยีน *matK*

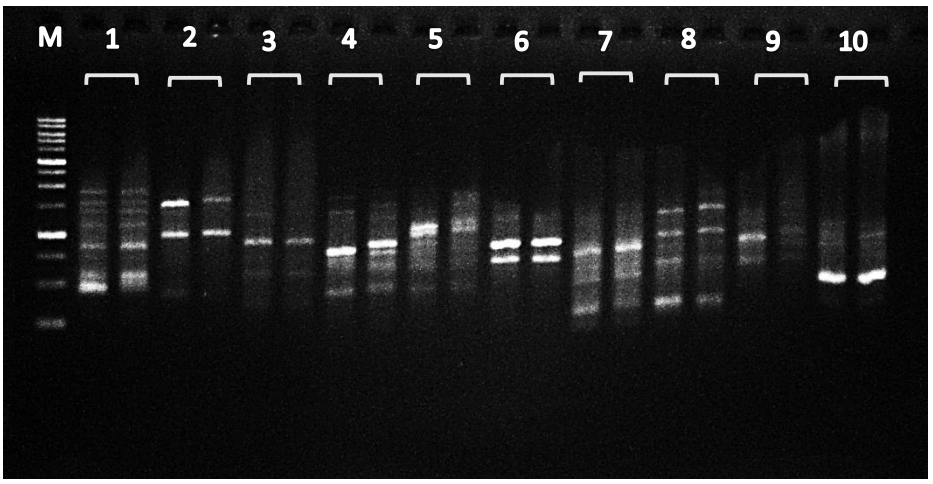
4. ผลการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD **และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี** PCR

ทำการตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยา PCR โดยรวมดีเอ็นเอของตาลแต่ละเพศทั้งหมดเข้าด้วยกันเป็นตัวอย่างเดียวกันและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียอย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของตาลที่ทราบเพศแน่ชัดโดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดย มี 3 ขั้นตอน คือ (1) ทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (2) ไพรเมอร์เข้ามาจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ โดยลดอุณหภูมิลงมาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ (3) สังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โดยทำซ้ำทั้งหมด 34 รอบ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4

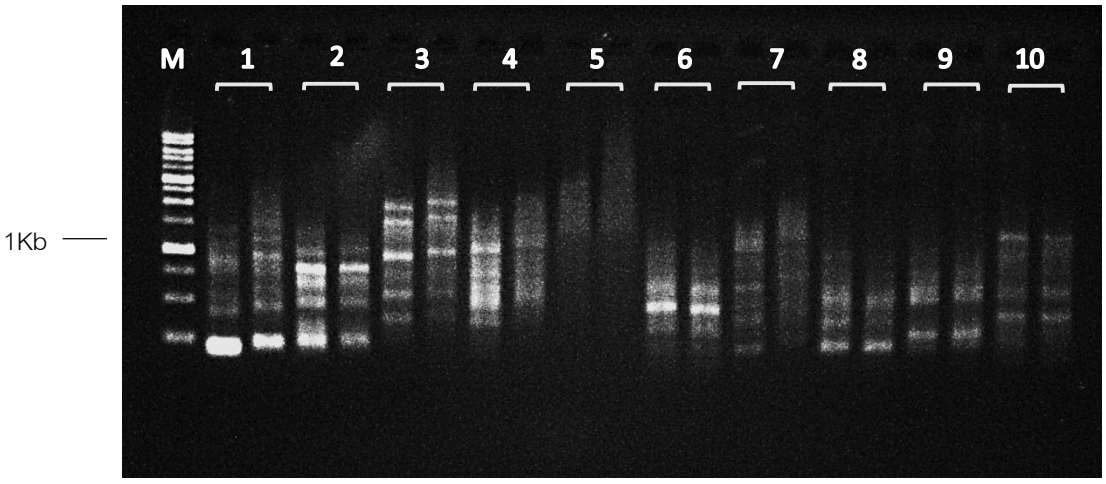
องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Electrophoresis ใน Agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ OPA-OPE ดังแสดงในภาพที่ 4.9-4.12 พบว่าที่ไพรเมอร์ OPD-04, OPD-7 และ OPD-10 ให้ลักษณะลายพิมพ์ ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของ ไพรเมอร์ OPD-01 ถึง OPD-10 จากนั้นนำคู่ดีเอ็นเอที่ให้ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย มาทำ PCR ซ้ำเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนยิ่งขึ้นพบว่า ที่ไพรเมอร์ OPD-04 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 4.13 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ซ้ำ



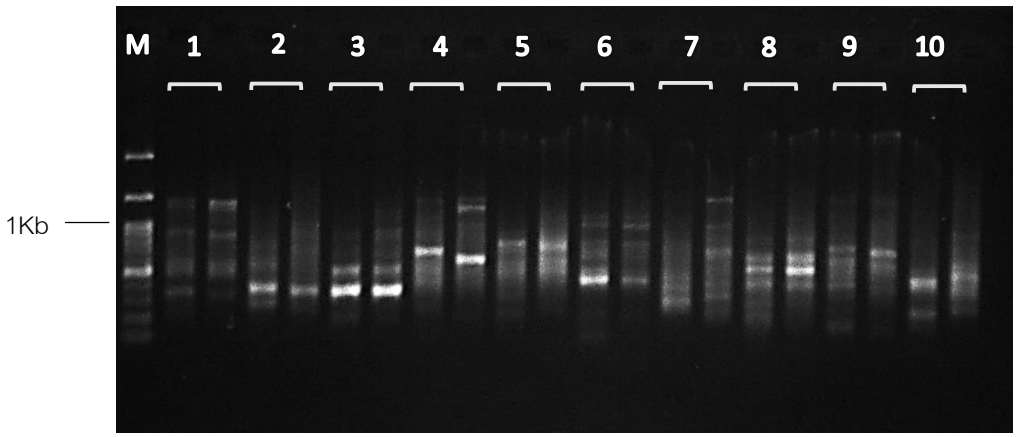
ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของ ไพรเมอร์ OPA-01 ถึง OPA-10 โดย M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หมายเลข 1-10 คือ คู่ตาลเพศเมียและเพศผู้ของ ไพรเมอร์ OPA-01 ถึง OPA-10 ตามลำดับ



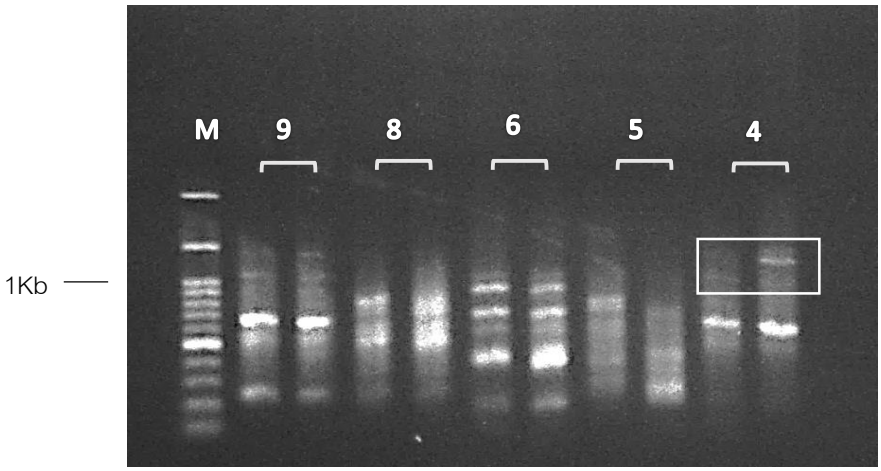
ภาพที่ 4.10 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของ ไพรเมอร์ OPB-01 ถึง OPB-10 โดย M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หมายเลข 1-10 คือ คู่ตาลเพศเมียและเพศผู้ของ ไพรเมอร์ OPB-01 ถึง OPB-10 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของ ไพรเมอร์ OPC-01 ถึง OPC-10 โดย M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หมายเลข 1-10 คือ คู่ตาลเพศเมียและเพศผู้ของ ไพรเมอร์ OPC-01 ถึง OPC-10 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ของ ไพรเมอร์ OPE-01 ถึง OPE-10 โดย M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน หมายเลข 1-10 คือ คู่ตาลเพศเมียและเพศผู้ของ ไพรเมอร์ OPE-01 ถึง OPE-10 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.13 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ซ้ำ ของไพรเมอร์ OPD-09, OPD-08, OPD-06, OPD-05 และ OPD-04

บทที่ 5
อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. สรุปการวิจัย

การใช้เทคนิครหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในการตรวจสอบเพื่อจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลในจังหวัดเพชรบุรีทั้ง 3 พันธุ์และช้างไห้ เมื่อสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rbcL* และยีน *matK* พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวทั้ง 2 ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของตาลและช้างไห้โดยใช่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ทุกตัวอย่างโดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดตรงตามที่คาดไว้

ยีน *rbcL* สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ในทุกตัวอย่าง ซึ่งเห็นได้ว่าตาลและช้างไห้ที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์ที่จัดเป็นSpeciesเดียวกัน และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบสนิปในลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcL* ที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างพันธุ์ตาลหม้อและพันธุ์ตาลไข่

ยีน *matK* สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ในทุกตัวอย่าง เห็นได้ว่าตาลและช้างไห้ที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์ที่จัดเป็น Species เดียวกัน และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *matK* ในตาลพันธุ์หม้อ และตาลพันธุ์ไข่ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการจำแนกพันธุ์ตาล

การวิเคราะห์แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rbcL* และยีน *matK*ร่วมกันด้วยวิธี Bayesian inference พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์ตาลให้สูงขึ้น และช้างไห้นั้นถูกจัดกลุ่มรวมอยู่กับตาลพันธุ์หม้อ ซึ่งจากผลของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้ แสดงว่าช้างไห้น่าจะยังคงจัดอยู่ในสกุล *Borassus* เช่นเดิม และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบสนิปในลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *matK* 1 ตำแหน่ง ในตาลพันธุ์หม้อ และตาลพันธุ์ไข่ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการจำแนกพันธุ์ตาล จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้

ประโยชน์ในการศึกษาทางอนุกรมวิธาน การอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และการปรับปรุงพันธุ์พืช อีกทั้งยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้ในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของตาลต่อไปได้ในอนาคต

จากการศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่ายเพื่อใช้ในการแยกชนิดเพศของตาล (*Borassus flabellifer* L.) ในจังหวัดเพชรบุรี จากตัวอย่างตาล 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์หม้อ พันธุ์ไข่ และพันธุ์ผสม โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD ทั้งหมด 100 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ OPD-4 สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตาลเพศผู้และเพศเมียได้ โดยไพรเมอร์ OPD-4 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อตาลเพศผู้ และไม่ปรากฏในตาลเพศเมีย เทคนิค RAPD สามารถแยกเพศของตาลได้และเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการแยกเพศตาลได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น

2. อภิปรายผล

การใช้เทคนิครหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในการตรวจสอบเพื่อจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลในจังหวัดเพชรบุรีทั้ง 3 พันธุ์และช้างไห้ มีงานวิจัยที่เลือกศึกษายีน *COI* ในการจำแนกสัตว์แล้วประสบความสำเร็จ ทำให้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในสัตว์ แต่กลับไม่ประสบความสำเร็จในพืช เนื่องจากยีนมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำมาก จึงไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการแยกและระบุชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการห่างไกลกัน (ต่างสกุลหรือต่างวงศ์) (Ford *et al.,* 2009) ดังนั้นจึงต้องค้นหาดีเอ็นเอมาตรฐานที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการระบุจำแนกชนิดพืชของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ยีนที่มีความจำเพาะในการจำแนกพืช ได้แก่ยีน *rbcL* และยีน *matK* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rbcL* และยีน *matK* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วุฒิพงศ์ มหาคำ (2554) ที่ได้ศึกษาว่ายีน *rbcL* เป็นยีนที่เหมาะสำหรับการจำแนกพืช Ribulose bisphosphate carboxylase (*rbcL*) เป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์ RuBisCO (Ribulose bisphosphate carbo-xylase oxygenase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) ส่วนยีน *matK* เป็นยีนที่มีความยาวประมาณ 1500 คู่เบส ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ Maturase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Group II introns splicing (Hilu & Liang, 1997) ในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานจะเลือกเพียงบางบริเวณของยีนให้มีความยาว 700-800 คู่เบส (Ford *et al.,* 2009) ข้อดีของยีนนี้คือมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพียงพอที่จะนำมาใช่ระบุชนิดได้ อีกยังให้คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ดีเช่น เดียวกับยีน *rbcL*

ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ในงานวิจัยนี้พบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวทั้ง 2 ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของตาลและช้างไห้ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดตรงตามที่คาดไว้ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้นั้นได้ถูกออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ให้คู่สมกับยีน *rbcL* และยีน *matK* กำหนดขนาดที่จำเพาะซึ่งกำหนดขนาดที่ต้องการไว้ที่ประมาณ 600 คู่เบสทำให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 600 คู่เบส การออกแบบไพรเมอร์ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีน *rbcL* และยีน *matK* จากฐานข้อมูล Genbank และฐานข้อมูล Barcode of life และหาโอกาสที่ไพร์เมอร์จะจับกันเองระหว่างเกิดปฏิกิริยา (Self-dimer) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Oligoanalyzer แล้วทดสอบความจำเพาะด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งพบวิธีเดียวกันกับหลายงานวิจัยเช่นงานวิจัยของ Juwattanasomran *et al*. (2010) พบว่าได้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับยีน ณ ตำแหน่งที่ต้องการเพิ่ม หรือ ขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ Multiplexed PCR Ramkumar *et.al* (2010) ได้นำไปศึกษากับยีน *GS3* ที่ควบคุมความยาวของเมล็ดข้าว โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับเบสคู่สมกับยีน *GS3* ใน Exon 2 และนำไปช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าว และสุวรรณี ปาลี และคณะ (2558) ได้ศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *BADH2* ในถั่วเหลืองฝักสด ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่ใช้ในการจำแนกพืชย่อมทำให้ผลในการจำแนกพืชนั้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น

งานวิจัยนี้ได้สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของตาลจำนวน 3 พันธุ์ ประกอบด้วยตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ โดยใช้การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ที่เติมบัพเฟอร์สกัด (Extraction buffer) และสกัดโปรตีนด้วยเติมฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol) สารละลายที่ได้มีลักษณะใสตกตะกอนแยกเฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอและโปรตีน ด้วยไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ละลายตะกอนด้วยน้ำ (ddH_2O) และนำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีการแตกหักเล็กน้อย มีคุณภาพดีและมีความบริสุทธิ์สามารถนำไปตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ซึ่งสิ่งสำคัญในการสกัดดีเอ็นเอ คือการป้องกันการแตกตัวของดีเอ็นเอระหว่างขั้นตอนการสกัด วิธีการสกัดดีเอ็นเอในพืชเริ่มจากการทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ซึ่งประกอบด้วย Cellulose, Pectin และ Xyloglucans การใช้วิธีกลเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ โดยการบดชิ้นส่วนพืชที่ต้องการแยกดีเอ็นเอด้วยไนโตรเจนเหลวในสภาพอุณหภูมิต่ำ สามารถยับยั้งการไม่ให้เอนไซม์

Ribonuclease ทำงานได้ การสกัดจะร่วมกับการเติม Extraction buffer ที่ประกอบไปด้วยสารเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ *Nuclease* เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอ และทำลายโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน ที่ประกอบด้วยโปรตีน และไขมัน เพื่อทำให้เซลล์แตกออก แล้วปลดปล่อยดีเอ็นเอออกสู่นอกเซลล์ ซึ่งการทำลายเซลล์เมมเบรนนี้มีผลต่อปริมาณของดีเอ็นเอที่แยกได้ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอหลังจากทำลายผนังเซลล์ด้วยการบดตัวอย่างพืชในไนโตรเจนเหลวแล้วผนังเซลล์จะถูกทำลายนำตัวอย่างที่ได้เติม Extraction buffer เพื่อสกัดเอาสารภายในเซลล์ เมมเบรนออกมารวมทั้งอาร์เอ็นเอด้วย ต่อมาสกัดแยกเอาโปรตีนออกด้วยสารในกลุ่ม Phenol, Chloroform และ Isoamyl alcohol ซึ่งมีคุณสมบัติทำลายโครงสร้างโปรตีนและต่อมาจะตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย NaCl เพื่อแยกตกตะกอนเฉพาะดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอนด้วย Alcohol เพื่อล้างสารสกัดที่ตกค้างออกเช่น Phenol เนื่องจากสารเหล่านี้มีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพ หากปนเปื้อนกับดีเอ็นเอจะทำให้เอนไซม์ที่จะใช้ทำการทดลองต่อไปเสียสภาพได้ (อัญชรีย์ ตั้งจิตมั่นธรรม, 2549) ในการวิจัยนี้จึงใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ Dolye and Dolye (1987) คล้ายกับงานวิจัยของณัฐพงษ์ ศรีสมุทรและคณะ (2559)ที่ได้ใช้การสกัดดีเอ็นเอ Dolye and Dolye (1987)พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอขนาดใหญ่ (Genomic DNA) สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *matK* ต่อไปด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และงานวิจัยของชมนาถ เกิดคง และเนตรชนก นุ้ยสีรุ่ง (2561) ที่ได้ศึกษาการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบโคลงเคลง *(Melastoma malabathricum* L.) 3 วิธี ได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Dellaporta และคณะ (1983) วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) และวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lim และคณะ (1997) เมื่อตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสและสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบสดของโคลงเคลงด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) ให้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดีที่สุด ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการนี้มีคุณภาพดีสามารถยืนยันผล ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Doyle และ Doyle (1987) นั้นมีประสิทธิภาพสามารถนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโคลงเคลงได้ ซึ่งมีรายงานการประยุกต์ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Doyle และ Doyle (1987) กับพืชชนิดอื่น ได้แก่ กล้วยไม้ หม้อข้าวหม้อแกงลิง มะม่วง สบู่ดำ อินทผลัม เป็นต้น ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ต่อมาใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *rbcL* และยีน *matK* ที่ได้ออกแบบแล้วนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าสามารถเพิ่ม

ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง โดยแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมดนี้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจน ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และยีน *matK* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ยีน *matK* ในตาลทั้ง 9 ตัวอย่าง ตรงกับพืชในฐานข้อมูล คือ *Borassus flabellifer* และในช้างไห้ตรงกับพืชในฐานข้อมูล คือ *Borassodendron machadonis* ผลการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank ตรงกับชนิดของพืชที่นำมาศึกษา โดยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าอยู่ที่ระดับ 97% - 100% ในยีน rbcL ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าอยู่ที่ระดับ 98% - 100% แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนยีน *rbcL* และ *matK* ของตาลแต่ละพันธุ์และช้างไห้ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank มีความถูกต้อง ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธีระชัย ธนานันต์และคณะ (2560) ที่ได้ศึกษาการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* พบว่าได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม แต่ละ ชนิด/พันธุ์มาตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อ ยืนยันความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank หรือในงานวิจัยของ นฤมล ธนานันต์ และคณะ (2559) ศึกษาการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* โดยได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และ *rbcL* กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK ในพืชอื่น

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และยีน *matK* เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Interspecies variation) ของตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ในทุกตัวอย่างซึ่งเห็นได้ว่าตาลและช้างไห้ที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์ที่จัดเป็นspeciesเดียวกัน จากการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของตาลพันธุ์หม้อ ตาลพันธุ์ไข่ ตาลพันธุ์ผสม และช้างไห้ พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปิยดา บุสดี และคณะ (2558) ในการศึกษาการจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทย จากลำดับดีเอ็นเอของ *rpoC1* และ *rbcL* ที่ได้ศึกษาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.003 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์แสดงให้ว่ามะม่วงที่ได้นำมาศึกษามีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก ตามทางการปฏิบัตินั้นจะพบว่าหากเป็นพืชที่มีระดับชนิด หรือมีสปีชีส์เดียวกันนั้นจะสามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ยาก เนื่องจากพืชเหล่านั้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากดังนั้นหากต้องการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ควรทำการวิเคราะห์ในพืชที่มี

ความแตกต่างกันในระดับชนิดหรือสปีชีส์ขึ้นไป จึงจะเห็นความผันแปรทางพันธุกรรม เนื่องจากพืชที่มีระดับชนิดหรือสปีชีส์เดียวกันนั้นจะมีความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำจึงไม่สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชนั้นได้ และการใช้เทคนิครหัสแท่งดีเอ็นเอในการจำแนกพืชนั้นควรที่จะใช้จำนวนยีนตั้งแต่ 2 ยีนขึ้นไปสำหรับการวิเคราะห์ร่วมกัน เหมือนกันงานวิจัยนี้ที่ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตาลและช้างไห้ โดยพิจารณายีน *rbcL* และยีน *matK* ทีละ 1 ยีน แล้วจึงพิจารณายีนร่วมกันทั้ง 2 ยีน โดยในยีน *rbcL* นั้นทำการคำนวณหาโมเดลที่เหมาะสมจากโปรแกรม Kakusan4 และสร้าง Phylogenetic tree ในรูปแบบของ Bayesian inferences ใช้โปรแกรม MrBayes; Bayesian inference of phylogeny โดยทำการจำลอง Phylogenetic tree 10 ล้านครั้ง จำนวน 100,000 tree นำข้อมูล Phylogenetic tree ที่ได้มาผสานเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Tree Annotator ตรวจสอบและตกแต่งโดยใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4 ซึ่งผลของ tree ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000 - 0.029 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ช้างไห้ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 1 ตาลพันธุ์หม้อ 3 ตาลพันธุ์ผสม 3 และตาลพันธุ์ไข่ 1 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์ไข่ 2 และตาลพันธุ์หม้อ 2และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เมื่อนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ของตาลและช้างไห้ รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ของยีน *matK* ใช้วิธีการเดียวกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *rbcL* และมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.049 ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ตาลตาลพันธุ์ผสม 2 และตาลพันธุ์ผสม 3 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ไข่ 1 และตาลพันธุ์ไข่ 2 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 1 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์หม้อ 2 ตาลพันธุ์หม้อ 3 และช้างไห้ ซึ่งช้างไห้ที่ถูกจัดในกลุ่มรวมอยู่กับตาลพันธุ์หม้อจากผลของวงศ์วานวิวัฒนาการนี้ แสดงให้เห็นว่าช้างไห้น่าจะยังคงจัดอยู่ในสกุล *Borasus* เช่นเดิม และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และยีน *matK* ร่วมกัน ในรูปแบบของ Bayesian inferences สามารถแยกกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์หม้อ 3 และช้างไห้ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ตาลพันธุ์ผสม 1 ตาลพันธุ์ไข่ 1 ตาลพันธุ์ผสม 3 ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ไข่ 2 ตาลพันธุ์หม้อ 1 และตาลพันธุ์หม้อ 2 แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และยีน

matK มาทำการคำนวณหาโมเดลที่เหมาะสมจากโปรแกรม Kakusan4 และสร้าง Phylogenetic tree ในรูปแบบของ Bayesian inferences โดยใช้โปรแกรม MrBayes; Bayesian inference of phylogeny โดยทำการจำลอง Phylogenetic tree 10 ล้านครั้ง จำนวน 100,000 tree นำข้อมูล Phylogenetic tree ที่ได้มาผสานเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม Tree Annotator ตรวจสอบและตกแต่งโดยใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4 ดังนั้นนำตำแหน่งที่ทำการตรวจสอบทั้งหมดมาวิเคราะห์ร่วมกันโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 2 ตำแหน่ง มาสร้าง Phylogenetic tree ซึ่งผลของ tree ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.064 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ยีน *rbcL* และยีน *matK* ร่วมกันนี้ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกตาลได้ดีกว่าการใช้ตำแหน่งของยีนเพียงตำแหน่งเดียวในการจำแนก ผลการวิจัยนี้สนับสนุนแนวคิดใช้ข้อมูลจากยีนหลายตำแหน่งในการประยุกต์เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งมีรายงานวิจัยของณัฐกร เพชรชาและคณะ (2554) ศึกษาและประเมินความสามรถของยีนในพลาสติด *rpoB* และ *rpoC1* ในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุล *Alpinia* พืชที่ใช้ในการศึกษามี 17 ชนิด 19 ตัวอย่าง พบว่ายีน *rpoB* สามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ 10 ชนิด จากทั้งหมด 16 ชนิดคิดเป็น 62.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน *rpoC1* สามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ 8 ชนิด จากทั้งหมด 15 ชนิด คิดเป็น 53.3 เปอร์เซ็นต์ การจำแนกชนิดโดยใช้ *rpoB* หรือ *rpoC19* เพียงชนิดเดียวพบว่าจำแนกได้ไม่ดี อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ข้อมูลจากยีนหลายตำแหน่งมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อจำแนกพืช พบว่าสามารถจำแนกพืชได้ดีขึ้นโดยยีนคู่ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน คือยีน *rpoB* และ *matK* ซึ่งสามารถจำแนกพืชออกจากกันได้ทุกชนิด หรือในงานวิจัยของจินต์ ทองสม และคณะ (2558) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่เข็มด้วยลำดับดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธี neighbor-joining, maximum parsimony และ maximum likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถแยกชนิดกล้วยไม้ได้ดี แต่แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า คือ สามารถแยกชนิดกล้วยไม้ได้น้อยกว่า ซึ่งเกิดจากมีอัตราการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำอย่างไรก็ตามเมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณร่วมกันสามารถแยกชนิดกล้วยไม้เป็น 3 กลุ่ม ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องกับแหล่งกระจายพันธุ์ และในรายงานการวิจัยของ นฤมล ธนานันต์ และคณะ (2557) ศึกษาวิเคราะห์จีโนมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด โดยตรวจสอบลำดับนิวลีโอไทด์ของยีน *matK, rbcL, rpoB, rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์

บริเวณใดสามารถแยก กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด ออกจากกันได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* ร่วมกันสามารถแยกกล้วยไม้สกุลกลอกตา หมู่สิงโตสยามออกจากกันได้ ยกเว้นสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดงซึ่งสามารถแยกด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอทด์ของยีน *rpoC1* หรือชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ไม่พบการเปลี่ยนของตำแหน่งลำดับเบสแบบ SNP ที่ให้ความแตกต่างระหว่างตาลพันธุ์หม้อและตาลพันธุ์ไข่ แต่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งลำดับเบสแบบ SNP ของยีน *matK* ที่เกิดกับตาล 2 พันธุ์ คือ ตาลพันธุ์หม้อ และตาลพันธุ์ไข่ โดยพบตำแหน่งของ SNP ทั้งหมด 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 513 ในตาลพันธุ์หม้อมีลำดับเบส T ในตาลพันธุ์ไข่ลำดับเบส A ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ หรือในการระบุชนิดพืช โดยมีรายงานวิจัยของ หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และคณะ (2560) วิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันโดยการอ่านและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ชนิด Dura Pisifera และ Tenera ของ 10 กลุ่มพันธุ์ จำนวน 129 ตัวอย่างพบสนิปที่สามารถแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้ คือ SNP_{ENGC} (T/C) ใน Ekona Ghana Nigeria และ Calabar SNP_{TaYa}(A/T) ใน Tanzania Yangambi, SNP_{DA}(C/G) ใน DAMI, SNP_{LaAv}(C/A) ใน La Me และ AVROS, SNP_{Tan}(C/G) ใน Tanzania จากข้อมูล SNP ที่พบได้พัฒนาไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4ชุด สำหรับตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันได้แม่นยำและรวดเร็วด้วยเครื่อง Real-time PCR เพื่อประโยชน์ในการ ตรวจควบคุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อประโยชน์ในการตรวจความตรงตามพันธุ์ แล้วยังสามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์กรณีที่มีเรื่องฟ้องร้องเรื่องชนิดของกล้าพันธุ์ และความตรงตามพันธุ์ได้คุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้แล้วยังพบรายงานวิจัยของ ประสาน สืบสุขและคณะ (2558) ที่ได้ศึกษาสนิปของยีน *COMT* (Caffeate O-methyl-transferase) ในยางพารา 12 พันธุ์ พบว่ามีการเปลี่ยนเบสแบบสนิปจำนวน 15 ตำแหน่ง คือ C116T A239G A251G G272T A302T C340T C572T G590T A854T A856T C866T C1101T C1062G A1158G และ G1179C มีลำดับเบสแตกต่างกันในยางพาราแต่ละพันธุ์ ยกเว้น PB235 และ PB260 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราเพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมคุณสมบัติของไม้ และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ ซึ่งงานวิจัยของ หทัยรัตน์ อุไรรงค์

และคณะ (2560)และประสาน สืบสุขและคณะ (2558) นี้สอดคล้องกับงานของผู้วิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกพันธุ์ตาลโดยศึกษาตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสนิป

การใช้เทคนิค RAPD ในการแยกเพศของตาลในจังหวัดเพชรบุรี มีงานวิจัยที่เลือกใช้เทคนิค RAPD ในการแยกเพศของพืชที่ประสบความสำเร็จสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dhawan *et al.* (2013) ได้ศึกวิจัยการแยกเพศของอินทผลัม โดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR ในการตรวจสอบเพศ พบว่าไพรเมอร์ OPA-02 จำเพาะต่ออินทผลัมเพศผู้ และได้ออกแบบ SCAR ไพรเมอร์ และนำมาตรวจสอบกับตัวอย่างต้นอ่อนอินทผลัม และงานวิจัยของ รัตนา นาคสิงห์และคณะ (2558) ได้ศึกษาการระบุเพศของมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ด้วยไพรเมอร์ W-11 ซึ่งใช้เทคนิค RAPD และออกแบบเครื่องหมาย SCAR พบว่า สามารถใช้จำแนกเพศมะละกอได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RAPD ใช้วิธีสังเคราะห์ขึ้นแบบสุ่ม ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย ในงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ RAPD ทั้งหมด 100 ไพรเมอร์ พบ 1 ไพรเมอร์ คือ OPD-4 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน และให้แถบที่มีความแตกต่างกันระหว่างตาลเพศผู้และเพศเมีย สอดคล้องกับงานวิจัยของ วุฒิชัย ศรีช่วย (2557) ได้ศึกษาการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราในหลอดทดลองโดยเครื่องหมาย RAPD ใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01, OPAD-01, OPAD-10, OPB-17, OPN-16,OPR-02 และ OPZ-04 พบว่า ไพรเมอร์ OPZ-04 สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการตรงตามพันธุ์ของต้นยางพาราจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ และงาวิจัยของ วราภรณ์ หิดฉิม (2557) ได้ทำการวิจัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย RAPD กับการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง สำหรับการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 ไพรเมอร์ พบว่า มี 3 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในต้นกล้าปาล์มน้ำมันดังกล่าวได้ โดยไพรเมอร์ OPA-14 ให้ อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมสูงที่สุด 60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือไพรเมอร์ OPA-03 และ OPR-11 ซึ่งให้อัตราการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม 50 และ 14.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สรุปได้ว่าการใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบความผิดปกติของต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้ผลที่น่าเชื่อถือกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากการใช้เทคนิค RAPD ในการแยกเพศของพืชงานวิจัยนี้ ยังพบงานวิจัยที่ใช้เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการแยกสายพันธุ์ของพืชอีกหลายงานวิจัย เช่น งานวิจัยของ วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์ (2554) ใช้เทคนิค RAPD ในการแยกได้ทำการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี โดยใช้ RAPD ไพรเมอร์จำนวน 500 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ NAPS062 ที่มีความจำเพาะกับระกำพันธุ์เศรษฐกิจ และงาย

วิจัยของ Pharmawati and Macfarlane (2013) ศึกษาการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสน Grevillea สายพันธุ์ลูกผสม ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าสน Grevillea ลูกผสมนี้ มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ สน Robyn Gordon รวมไปถึงงานวิจัยของ มลิวรรณ นาคขุนทด (2561) ได้ศึกษาการพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสายสกุล Nymphaea พบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมี 18 ไพรเมอร์ (60 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับบัวสายแต่ละสกุลย่อย พบว่าในสกุลย่อย Anecphya จำนวน 7 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 5 เครื่องหมาย โดยมี 2 เครื่องหมาย คือ NYM007 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. atrans* และ *N. immutabilis* และ NYM010 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. gigantea* var. neorosea ในสกุลย่อย Nymphaea จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้2 เครื่องหมาย โดยมี 1 เครื่องหมาย ที่มีความจำเพาะต่อ Nymphaea ‘Sunrise’ และในสกุลย่อย Lotos จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 3 เครื่องหมาย แต่ไม่มีเครื่องหมายใดที่จำเพาะต่อบัวสายในสกุลย่อยนี้เลย ดังนั้นสามารถพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR ทั้งหมด 3 เครื่องหมาย สำหรับใช้ระบุชนิดของบัวสายในสกุลย่อย Anecphya และ Nymphaea ได้

3. ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบพันธุ์พืชโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์นั้น หากเป็นระดับชนิดหรือมีสปีชีส์เดียวกันนั้นจะสามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ยาก เนื่องจากพืชเหล่านั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก ดังนั้นหากต้องการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ควรทำการวิเคราะห์ในพืชที่มีความแตกต่างกันในระดับสปีชีส์ขึ้นไป และในการทำวิจัยนี้สามารถทำการต่อยอดวิจัยได้ด้วยการใช้การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบสนิปร่วมกับเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ในการจำแนกพันธุ์ของตาลโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดในตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบสนิปเพื่อจำแนกพันธุ์ของตาลได้ และหากจะนำงานวิจัยไปทำต่อ ให้นำแถบ Polymorphic ที่ได้จาก OPD-04 ไปหาลำดับดีเอ็นเอและพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่ายในการแยกเพศของตาลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2543). **การพัฒนาการเกษตรไทยยุค เทคโนโลยีชีวภาพ**. กรุงเทพฯ: สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ชีวภาพ.

จรัสศรี นวลศรี. (2548). **เอกสารคำสอนการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน**. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์.

จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2557). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ*rpoC*1. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 22(5)(ฉบับพิเศษ): 674-682.

จันทร์เพ็ญ สะระ, ฉันทนา วิชรัตน์, ธีรนุช เจริญกิจ และแสงทอง พงษ์เจริญกิต. (2557). การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 กับ สีชมพู. **Thai Journal of Genetics**: 244-247.

จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ้มภัย และธีระชัย ธนานันต์. (2558). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ สกุลแวนด้าหมู่เข็ม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 23(6): 995 -1005.

ชมนาถ เกิดคง และเนตรชนก น้อยสีรุ่ง. (2561). **การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบโคลงเคลง (*Melastoma malabathricum* L.)**. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 49(2) (พิเศษ): 653-656.

ฐิตาพร มณีเนตร, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2561). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*. **Thai Journal of Science and Technology**. 7(2): 181-190.

ณัฐกร เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข. (2554). การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *rpoC1* และ *rpoB* ในการใช้เป็น DNA barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae). **การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ**, 554-563.

ณัฐกานต์ โกเสนตอ, สุณิสา ณัฐพรณิชกุล และมลิวรรณ นาคขุนทด. (2557). การจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ. **วารสารวิทยาสาสตร์บูรพา**. ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6 20-21 มีนาคม.

ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร, กิตติศักดิ์ เฉนียง และอลงกลด แทนออมทอง. (2559). การระบุสายพันธุ์หน้าวัวโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด. **วารสารแก่นเกษตร**. 44 (ฉบับพิเศษ): 838-843.

ทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2561). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจำแนกทุเรียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 7(2): 202-212.

ทีปกา มีเสงี่ยม, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2561). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK*. Thai Journal of Science and Technology. 26(1): 103-112.

ธีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธ์รูปท้าว และนฤมล ธนานันต์. (2560). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL*. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 25(4): 579-590.

นรินทร์ พูลเพิ่ม. (2550). **ตาลโตนด**. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยพืชสวน.

นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์. (2557). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 22(4): 523-530.

นฤมล ธนานันต์, จินต์ ทองสม, ชนิตโชต ปิยพิทยานันต์ และธีระชัย ธนานันต์. (2559). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ*rpoC1*. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 24(4): 599-612.

นฤมล ธนานันต์, ฐิตาพร มณีเนตร, ภัทรพร คุ้มภัย และธีระชัย ธนานันต์. (2561). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK*. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 7 (1): 81-88.

นฤมล ธนานันต์, ภัทรา หงส์ทองดี และธีระชัย ธนานันต์. (2559). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL*.**วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 5(2): 170-180.

นฤมล ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธ์รูปท้าว และธีระชัย ธนานันต์. (2560). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 6(1): 33-43.

บุญสนอง ช่วยแก้ว และวุฒิชัย ฤทธิ. (2559). ชีววิทยาตาล (*Borassus Flabellifer* L.). ใน อุบล สมทรง (บรรณาธิการ), **ตาล ทรัพย์สินเมืองเพชร**, (หน้า 9-10). นครปฐม: เพชรเกษมพริ้นติ้ง กรุ๊ป.

ประสาน สืบสุข, กุหลาบ คงทอง และจีราพร แก่นทรัพย์. (2558). **การศึกษาสนิปของยีน caffeate o-methyl-transferase ในยางพารา**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยดา บุสดี, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์. (2558). การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทย จากลำดับดีเอ็นเอของ *rpoC1* และ *rbcL*. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 23(6) (ฉบับพิเศษ): 983-993.

พรรณิภา โสตถิพันธุ์, สอาด สินไชย, ทวิช ปริศวงศ์, สมปอง ยอดมณี, ไพฑูรย์ ศิริรักษ์ และพรชัย ศรีไพบูลย์. (2547). **วัฒนธรรมตาลโตนด กระบวนการสร้างชุมชนเข้มแข็ง**. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

พรรษา มนต์แข็ง, อรุณรัตน์ ฉวีราช, ธวัดชัย ธานี และรุ่งลาวัลย์ สุดมูล. (2556). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุล *Senna*. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น (บศ.)**. 13(2): 18-30.

พูนศักดิ์ วัชรากร. (2548). **ปาล์มและปรงในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.

ภัทรา หงษ์ทองดี. (2558). **การจำแนกพันธุ์และการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ**. วท. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

มลิวรรณ นาคขุนทด, อิษยา แคนติ, ธิดา มาชัยงาม และนันทวิภา คำมา. (2561). การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสายสกุล *Nymphaea.* **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. ปีที่ 26 (2):215-223.

มัทนา จองกา, ดวงกมล แม้นศิริ และ สุรพล แสนสุข. (2552). **ดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK* สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดพืชสกุล *Alpinia*** Roxb. การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิต ศึกษา ครั้งที่ 12 (สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ). ขอนแก่น. มหาวิทยาลัยขอนแก่น: 1403-1412.

เรือนแก้ว ประพฤติ. (2553). การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์. **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก**.1:29-38.

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์. (2554). **การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี**. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. (2551). **พื้นฐานเทคนิค** polymerase chainreaction. ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

วุฒิพงศ์ มหาคำ. (2554). DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้และข้อจำกัด. **วารสารพฤกษศาสตร์ไทย**. 3(1): 1-30.

สรพงศ์ เบญจศรี. (2554). เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข**. 39: 350-363.

สันติธรรม โชติประทุม. (2557). **เอกสารประกอบการอบรมการผลิตน้ำผลไม้พาสเจอไรส์ น้ำตาลโตนด พาสเจอไรส์และลอดช่องลูกตาล**. กรุงเทพฯ: สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม.

สุรพล จันทร์เรือง. (2545). ตาลโตนด. **วารสารกสิกร**. 74: 33-52.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**. 5: 37-59.

สุวรรณี ปาลี, ศุกระกาญจน์ ศรีบุญ และพรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. (2558). การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน BADH2 ในถั่วเหลืองฝักสด. Thai Journal of Genetics. 8(1): 38–45.

หทัยรัตน์ อุไรรงค์, อรรัตน์ วงศ์ศรี และนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. (2560). การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. **วารสารวิชาการเกษตร**. 35(2): 117-135.

อมรรัตน์ โมพี้. (2549). **ชีวสารสนเทศศาสตร์ทางสัตว์**. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม. (เอกสารไม่ตีพิมพ์).

อัญชรีย์ ตั้งจิตมั่นธรรม. (2548). **การเปรียบเทียบวิธีสกัด RNA และการแสดงออกของยีน ACC synthase, ACC oxidase และ Ethylene Receptor ในส่วนต่างๆของกล้วยไม้สกุลหวาย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุบล สมทรง. (2556). **พืชพันธุ์ในวิถีชีวิตลุ่มน้ำเพชรบุรี**. เพชรบุรี: ปัญญาชนการพิมพ์.

Brown, S.M., Szewc-McFadden, A. K., and Kresovish, S. (1996). **Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis**. Florida: CRS Press.

CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 106: 12794-12797.

Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. **Heredity**. 88: 94-101.

Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van den Berg C., Madrinan, S., Petersen, G. (2007). New trends in plant systematics: a proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. **Taxon.** 56(2): 295-299.

Chaveerach, A. (2009). **Plant molecular systematics**. Faculty of Science Khon Kaen University: Khon Kaen.

Dhawan, C., Kharb, P., Sharma, R., Uppal, S. and Aggarwal R. K. (2013). Development of male-specific SCAR marker in date palm (Phoenix dactylifera L.). **Tree Genetics & Genomes**. 9:1143-1150.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. 19: 11-15.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, M.A., Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetic with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**. 29:1969-1973.

Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Van Alphen Stahl, J., Kelly, L.J., Wikstrom, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R.S., Chase, M.W. & Wilkinson, M.J. (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 159: 1-11.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**. Series B. 270: 313–321.

Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 106(31):12794-12797.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**. 17:754–755.

Juwattanasomran, R., Somta, P., Chankaew, S., Shimizu, T., Wongpornchai, S., Kaga, A., Srinives, P. (2010). A SNP in GmBADH2 gene associates with fragrance in vegetable soybean variety ''Kaori'' and SNAP marker development for the fragrance. **Theoretical and Applied Genetics**. 122: 533-541.

Kochert, G. (1994). **RFLP technology in DNA-based markers in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Kositrattana, W. (2009). **DNA Barcode**. AG-BIO Newsletter. 1(3): 14-15. Thai.

Kovoor, A. (1983). **The Palmyra Palm: Potential and perspectives FAO plant production and protection paper 52**. Rome: Food and Agriculture organization of United Nations.

McCouch, S., Tankslay, S.D. (1991). **Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic in rice biotechnology**. Wallingford: Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. (eds.) CAB International.

Modi, A., Suthar, K., Thakkar, P., Mankad, M.C., Kumari, S., Narayanan, S., Singh, A.S. and Kumar, N. (2018) Evaluation of sex specific RAPD and SCAR markers linked to papaya (*Carica papaya* L.). **Biocatalysis and agricultural biotechnology** 16, 271-276.

Morris, B. (1994). **Science and future biotechnology**. Australia: Cambridge University.

Morton, J. F. (1988). Notes on distribution, propagation and products of *Borassus* palms (Arecaceae). **Economic Botany**. 42(3): 420-441.

Page, R.D.M. 1996. Tree View: An Application to Display Phylogenetic Trees on Personal Computers. **Canadian Associates of BIOS**. 12: 357–358.

Pharmawati, M. and Macfarlane, I.J., 2013, The genetic relationships of *Grevillea* hybrids determined by RAPD marker. **HAYATI J. Biosci**. 20(4): 196-200.

Powell, W., Machray, C., and Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Sciences**. 1: 215-222.

Ramkumar G., Sivaranjani A.K.P., Pandey Mannisk K., Sakthivel K., Shobha Rani N., Sudarshan I., Prasad G.S.V., Neeraja C.N., Sundaram R.M., Viraktamath B.C., Madhav M.S. (2010). Development of a PCR-based SNP marker system for effective selection of kernel length and kernel elongation in rice. **Molecular breeding.** 26: 735–740.

Reimo, Z., Oren, O., Thomas, B., Christian and Schmitz, L. (2006). Analysis of the regulation of matK gene expression Endocytobiosis, **Cell Research.** 19: 127-135.

Schuettpelz, E., Korall, P. and Pryer, K.M. (2006). Plastid at data provide improved support for deep relationships among ferns. **Taxon**. 55: 897-906.

Simson, M.G., (2012). Plant Systematics 2nd Edition. **Elsevier & Academic press**. London.

Sinha, P., Nanda, S., Joshi, R. K., and Panda, P. C. (2017). Development of a sequence-tagged site (STS) marker for sex identification in the dioecious rattan species Calamus guruba Buch. -Ham. **Mol Breeding**: 37-22.

Solliman, M. EL-Din., Mohasseb, H. A., Al-Khateeb, A. A., Al-Khateeb, S. A., Chowdhury, K. and El-Shemy, H. A., Aldaej, M. I. (2017). Identification and sequencing of Date-SRY Gene: A novel tool for sex determination of date palm (Phoenix dactylifera L.). **Saudi Journal of Biological Sciences** :1-10.

Tanabe, A.S. (2007). Kakusan: A Computer Program to Automate the Selection of Nucleotide Substitution Model and the Configuration of a Mixed Model on Multilocus Data. **Molecular Ecology Notes**. 7(6): 962–964.

Venkatasubban, K. R. (1946). A preliminary survey of chromosome numbers in *Scitamineae* of Bentham and Hooker. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B**. 23: 281-300.

Vischi, M., Arzenton, F., dePaoli, E., Paselli, S., Tomat, E., Olivieri, A.M. (2006). Identification of wild species of sunflower by specific plastid DNA sequence. **HELIA 29**. (45): 11-18.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zebeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. 23: 4407-4414.

Westergaard, M. 1958. The mechanism of sex determination in dioecious plants. **Adv.Genet**. 9: 217-281.

William, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.U. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 8(22): 6531-6535.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

1.1. ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *rbcL* จากบริษัทผู้ให้บริการ (Firstbase, ประเทศมาเลเซีย) ด้วยเครื่องอ่านแบบอัตโนมัติ (Direct DNA sequencing) ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 4.1 - 4.10 เป็นลำดับเบสที่ได้จากยีน *rbcL* ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์หม้อ 2 ตาลพันธุ์หม้อ3 ตาลพันธุ์ไข่ 1 ตาลพันธุ์ไข่ 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ผสม1 ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ผสม 3 และช้างไห้ ตามลำดับ

4.1 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์หม้อ 1

AGTTACAATGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

4.2 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์หม้อ 2

AGTTACAATGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

4.3 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์หม้อ 3

AATCACATAGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

4.4 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์ไข่ 1

AGTTACAATGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CTTTGTAGGTAATGTATTGGGGTTTCCATCACTCCACACATTGTCCATG
TACCATTAGAAAATTCCGCCTACAGCTGCCTGTTTCCTCGGGCGGAACT
CCGGGTTGAGGAGTTACTCGAATGCTGCCAAAATATGTATCTTTGGTTG
CGTACTCCGAGTATAATAAGTCGAGTTTAATCTTTAACACCACCGTTAA
AACCGACAATTGGTGTGTCGCGGTGGAATAAAAGA

4.5 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์ไข่ 2

AGTTACAATGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

4.6 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์ไข่ 3

AATCACATAGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

4.7 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์ผสม 1

AATCACAGAGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

4.8 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์ผสม 2

AATCACATAGACTTAACTCCTGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGAATTA

4.9 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของตาลพันธุ์ผสม 3

ACCAACAGAGACTAAGCTGGTGGACTTGATTTTACAGTCACCACAAACA
TAGACTAAAGCGGGATGGACTTGATTTTACATTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

4.10 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rbcL* ของช้างไห้

ACCCACATAGACTAAACTCCTGAATTACATTTACCAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG
GGGCAGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACCGGTACATGGACAACTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC
ATCGAAACCGTTGTCGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTT
ATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
CATTGTAGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTG
GAGGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCAAACTTTCCAAGGCCCGCCT
CATGGCATCCAGGTTGAAAAGATGTTGAACAAGTATTCGTCCTCTATTG
GGATGTACATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAGAACTACGGTAG
AGCGGTTTATGAATGTTACGCGGTGGACTGGATTA

1.2. ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *matK* จากบริษัทผู้ให้บริการ (Firstbase, ประเทศมาเลเซีย) ด้วยเครื่องอ่านแบบอัตโนมัติ (Direct DNA sequencing) ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ 4.11 - 4.20 เป็นลำดับเบสที่ได้จากยีน *matK* ได้แก่ ตาลพันธุ์หม้อ 1 ตาลพันธุ์หม้อ 2 ตาลพันธุ์หม้อ3 ตาลพันธุ์ไข่ 1 ตาลพันธุ์ไข่ 2 ตาลพันธุ์ไข่ 3 ตาลพันธุ์ผสม1 ตาลพันธุ์ผสม 2 ตาลพันธุ์ผสม 3 และช้างไห้ ตามลำดับ

4.11 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์หม้อ 1

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTTTATTAGCTTTTCTTCGTAAACTCTTCTTATTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA

4.12 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์หม้อ 2

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTAGTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTGTATTAGCTTTTCTTCGTAAACTCTTCTTATTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA

4.13 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์หม้อ 3

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTTTATTAGCTTTTCTTCGTAAACTCTTCTTATTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA

4.14 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์ไข่ 1

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGGGAAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACTTTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTGTATTATCTTTTCTTCGTAAACACTTCTTATTTACTATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAAAACAT
CTTGCTTTAATAATAATGCGCCGAAATTATTTAAAAAAAA

4.15 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์ไข่ 2

TTTTTTCTGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGAAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTTTATTAGCTTTTCTTCGTAAACTCTTCTTATTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAAAAAA

4.16 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์ไข่ 3

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTAGTGCGATTCGTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAGTAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTGTTTTCAAAAG
AAAATACAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATGTGAATG
CATTGTATTAGCTTTTCTTCGTAAACACATCTTAGTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTTGTAGTGCGCCAAAATTATTTTCAGAAGA

4.17 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์ผสม 1

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTAGTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTGTATTAGCTTTTCTTCGTAAACTCTTCTTATTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA

4.18 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์ผสม 2

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAAAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCAAAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTGTATTATCTTTTCTTCGTAAACACTTCTTATTTACTATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAATAGTGCGCCGAAATTATTTTCAAAAAA

4.19 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของตาลพันธุ์ผสม 3

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCTGGATCCGAGA
TGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTTTATTAGCTTTTCTTCGTAAACTCTTCTTATTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA

4.20 ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *matK* ของช้างไห้

TTATTCTCGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCAT
TCTTGCTGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATC
TCAGAATTTGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAG
GACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGTCAGATATACTAATACCTTATC
CCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATTCTGAGATTCTGGATCCAAGA
TGTTCCTTCTTTACTTTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAAT
TGGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAG
AAAATAAAAGACTATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATG
CATTTTATTAGCTTTTCTTCGTAAACTCTTCTTATTTACGATTAACATC
TTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAACAT
CTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCATAATTATTTTCAAAAAA

ภาคผนวก ข
ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ
ตำแหน่งของยีน *matK*

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งของยีน *matK*

Primers เป็นองค์ประกอบสำคัญของความสำเร็จในการทำ PCR ซึ่งขึ้นอยู่กับการเลือกหรือออกแบบ Primers ให้เหมาะสมมีหลักการดังต่อไปนี้

1. Primers มีขนาดยาวประมาณ 18-24 เบส
2. ประกอบด้วย G+C ประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์
3. การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของ Primers ทั้งคู่ไม่ควรมีเบสคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด Primers-dimers
4. ค่า Tm อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และค่า Tm ของ Primers ทั้งคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกัน

จากหลักการข้างต้นสามารถเลือกตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ได้ดังนี้

```
AM114603.1                GACCATATTGCACTATGTATCATTTGATAACCTAAAAAATGAAATAGGTCCCGCCTCTGG   60
GBVS3610-13.matKBorassus  ------------------------------------------------------------   0
Borassus                  ------------------------------------------------------------   0
HQ720244.1                ------------------------------------------------------------   0
AM114604.1:1-1628         GACCATATTGCACTATGTATCATTTGATAACCTAAAAAATGAAATAGGTCCCGCCTCTGG   60
KP901247.1:c3294-1744     ------------------------------------------------------------   0
AM114604.1                GACCATATTGCACTATGTATCATTTGATAACCTAAAAAATGAAATAGGTCCCGCCTCTGG   60
HQ265564.1:1-1534         ------------------------------------------------------------   0
GBVA2695-11.matKCocos     ------------------------------------------------------------   0
HG969989.1:72-1605        ------------------------------------------------------------   0
AM114637.1:1-1619         GACCATATTGCACTATGTATCATTTGATAACCCAAAAAATGAAATGGGTCCTGTCTCTGG   60
NC_022417.1:c3129-1588    ------------------------------------------------------------   0
GBVA2690-11.matKCocos     GACCATATTGCACTATGTATCATTTGATAACCCAAAAAATGAAATGGGTCCTGTCTCTGG   60

AM114603.1                TTCAAGTAGAAATGTAAATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTTGGC   120
GBVS3610-13.matKBorassus  -----------------ATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTTGGC   43
Borassus                  -----------------ATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTTGGC   43
HQ720244.1                --------GAAATGTAAATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTTGGC   52
AM114604.1:1-1628         TTCAAGTAGAAATGTAAATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTTGGC   120
KP901247.1:c3294-1744     -----------------ATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTTGGC   43
AM114604.1                TTCAAGTAGAAATGTAAATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTTGGC   120
HQ265564.1:1-1534         --------------------------ATTACAAGGATATTTAGAAGAAGATGGATCTCGGC   35
GBVA2695-11.matKCocos     --------------------------ATTACAAGGATATTTAGAAGAAGATGGATCTCGGC   35
HG969989.1:72-1605        -----------------ATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTCGGC   43
AM114637.1:1-1619         TTCAAGTAGAAATGTAAATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTCGGC   120
NC_022417.1:c3129-1588    -----------------ATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTCGGC   43
GBVA2690-11.matKCocos     TTCAAGTAGAAATGTAAATGGAAGAATTACAAGGATATTTAGAAAAAGATAGATCTCGGC   120
                                            ****************** ***** ***** ***

AM114603.1                AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATATTTACCCATTTGCTCATGATC   180
GBVS3610-13.matKBorassus  AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATTTTTACCCATTTGCTCATGATC   103
Borassus                  AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATTTTTACCCATTTGCTCATGATC   103
HQ720244.1                AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATTTTTACCCATTTGCTCATGATC   112
AM114604.1:1-1628         AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATTTTTACCCATTTGCTCATGATC   180
KP901247.1:c3294-1744     AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATTTTTACCCATTTGCTCATGATC   103
AM114604.1                AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATTTTTACCCATTTGCTCATGATC   180
HQ265564.1:1-1534         ANCAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTAAAGGAGTATATTTACNCATTTGCTCATGATC   95
GBVA2695-11.matKCocos     ANCAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTAAAGGAGTATATTTACNCATTTGCTCATGATC   95
HG969989.1:72-1605        AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATATTTACACATTTGCTCATGATC   103
AM114637.1:1-1619         AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATATTTACACATTTGCTCATGATC   180
NC_022417.1:c3129-1588    AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATATTTACACATTTGCTCATGATC   103
GBVA2690-11.matKCocos     AACAACACTTTCTATATCCGCTTCTCTTTAAGGAGTATATTTACACATTTGCTCATGATC   180
                          * ************************* ********* ***** ***************

AM114603.1                GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTACGAATCCACGGAAATTTTTGGTTATGACAATAAAT   240
GBVS3610-13.matKBorassus  GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTACGAATCCACGGAAATTTTTGGTTATGACAATAAAT   163
Borassus                  GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTACGAATCCACGGAAATTTTTGGTTATGACAATAAAT   163
HQ720244.1                GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTACGAATCCACGGAAATTTTTGGTTATGACAATAAAT   172
AM114604.1:1-1628         GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTACGAATCCACGGAAATTTTTGGTTATGACAATAAAT   240
KP901247.1:c3294-1744     GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTACGAATCCACGGAAATTTTTGGTTATGACAATAAAT   163
AM114604.1                GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTACGAATCCACGGAAATTTTTGGTTATGACAATAAAT   240
HQ265564.1:1-1534         GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTATGAATCCACGGAAATTTTTTGTTATGACAATAAAT   155
GBVA2695-11.matKCocos     GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTATGAATCCACGGAAATTTTTTGTTATGACAATAAAT   155
HG969989.1:72-1605        GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTATGAATCCACGGAAATTTTTTGTTATGACAATAAAT   163
AM114637.1:1-1619         GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTATGAATCCACGGAAATTTTTTGTTATGACAATAAAT   240
NC_022417.1:c3129-1588    GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTATGAATCCACGGAAATTTTTTGTTATGACAATAAAT   163
GBVA2690-11.matKCocos     GTGGTTTAAATGGTTCGATTTTTTATGAATCCACGGAAATTTTTTGTTATGACAATAAAT   240
                          ************************ ****************** ***************
```

```
AM114603.1                CTAGTTCATTACTTGTGAAACGCTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  300
GBVS3610-13.matKBorassus  CTAGTTCATTACTTGTGAAACGCTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  223
Borassus                  CTAGTTCATTACTTGTGAAACGCTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  223
HQ720244.1                CTAGTTCATTACTTGTGAAACGCTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  232
AM114604.1:1-1628         CTAGTTCATTACTTGTGAAACGCTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  300
KP901247.1:c3294-1744     CTAGTTCATTACTTGTGAAACGCTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  223
AM114604.1                CTAGTTCATTACTTGTGAAACGCTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  300
HQ265564.1:1-1534         CTAGTTCAGTACTTGTGAAACGTTCAATTATTCGAATGNATCAACAGAATTATTNGATTT  215
GBVA2695-11.matKCocos     CTAGTTCAGTACTTGTGAAACGTTCAATTATTCGAATGNATCAACAGAATTATTNGATTT  215
HG969989.1:72-1605        CTAGTTCAGTACTTGTGAAACGTTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  223
AM114637.1:1-1619         CTAGTTCAGTACTTGTGAAACGTTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  300
NC_022417.1:c3129-1588    CTAGTTCAGTACTTGTGAAACGTTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  223
GBVA2690-11.matKCocos     CTAGTTCAGTACTTGTGAAACGTTCAATTATTCGAATGTATCAACAGAATTATTTGATTT  300
                          ******** ************* *************** *************** *****

AM114603.1                ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTTTTTTTATTTTC  360
GBVS3610-13.matKBorassus  ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTTTTTTTATTTTC  283
Borassus                  ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTTTTTTTATTTTC  283
HQ720244.1                ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTTTTTTTATTTTC  292
AM114604.1:1-1628         ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTTTTTTTATTTTC  360
KP901247.1:c3294-1744     ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTTTTTTTATTTTC  283
AM114604.1                ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTTTTTTTATTTTC  360
HQ265564.1:1-1534         ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTATTTTGATTTTC  275
GBVA2695-11.matKCocos     ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTATTTTGATTTTC  275
HG969989.1:72-1605        ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTATTTTGATTTTC  283
AM114637.1:1-1619         ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTATTTTGATTTTC  360
NC_022417.1:c3129-1588    ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTATTTTGATTTTC  283
GBVA2690-11.matKCocos     ATTCGGTTAATGATTCTAACCAAAATCGATTCGTTGGGCACAACAATTATTTTGATTTTC  360
                          ************************************************* **** ******

AM114603.1                ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  420
GBVS3610-13.matKBorassus  ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  343
Borassus                  ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  343
HQ720244.1                ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  352
AM114604.1:1-1628         ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  420
KP901247.1:c3294-1744     ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  343
AM114604.1                ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTTATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  420
HQ265564.1:1-1534         ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTCATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  335
GBVA2695-11.matKCocos     ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTCATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  335
HG969989.1:72-1605        ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTCATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  343
AM114637.1:1-1619         ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTCATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  420
NC_022417.1:c3129-1588    ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTCATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  343
GBVA2690-11.matKCocos     ATTTTTATTCTCAGATGATATTGGAAGGTTTTGCAGTCATTGTGGAAATTCCATTCTTGC  420
                          ************************************ ***********************

AM114603.1                TGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  480
GBVS3610-13.matKBorassus  TGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  403
Borassus                  TGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  403
HQ720244.1                TGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  412
AM114604.1:1-1628         TGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  480
KP901247.1:c3294-1744     TGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  403
AM114604.1                TGCGATTAGTATCCTCCCTCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  480
HQ265564.1:1-1534         TGCGATTAGTATCTTCCCCCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  395
GBVA2695-11.matKCocos     TGCGATTAGTATCTTCCCCCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  395
HG969989.1:72-1605        TGCGATTAGTATCTTCCCCCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  403
AM114637.1:1-1619         TGCGATTAGTATCTTCCCCCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  480
NC_022417.1:c3129-1588    TGCGATTAGTATCTTCCCCCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  403
GBVA2690-11.matKCocos     TGCGATTAGTATCTTCCCCCGAAGAAAAAAAAATACCAAAATCTCAGAATTTGAATTTAC  480
                          ************* **** ****************************************

AM114603.1                GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  540
GBVS3610-13.matKBorassus  GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  463
Borassus                  GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  463
HQ720244.1                GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  472
AM114604.1:1-1628         GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  540
KP901247.1:c3294-1744     GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  463
AM114604.1                GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  540
HQ265564.1:1-1534         GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  455
GBVA2695-11.matKCocos     GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  455
HG969989.1:72-1605        GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  463
AM114637.1:1-1619         GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  540
NC_022417.1:c3129-1588    GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  463
GBVA2690-11.matKCocos     GATCTATTCATTCAATATTTCCCTTTTTGGAGGACAAATTATCGCATTTAAATTATGTGT  540
                          ************************************************************

AM114603.1                CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATTCTGAGATTCT  600
GBVS3610-13.matKBorassus  CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCT  523
Borassus                  CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCT  523
HQ720244.1                CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCT  532
AM114604.1:1-1628         CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCT  600
KP901247.1:c3294-1744     CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCT  523
AM114604.1                CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATTCT  600
HQ265564.1:1-1534         CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCT  515
GBVA2695-11.matKCocos     CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCT  515
HG969989.1:72-1605        CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCT  523
AM114637.1:1-1619         CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCT  600
NC_022417.1:c3129-1588    CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCT  523
GBVA2690-11.matKCocos     CAGATATACTAATACCTTATCCCATCCATCTGAAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCT  600
                          ************************************************** **   ** **
```

```
AM114603.1                GGATCCAAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   660
GBVS3610-13.matKBorassus  GGATCCGAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   583
Borassus                  GGATCCGAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   583
HQ720244.1                GGATCCGAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   592
AM114604.1:1-1628         GGATCCGAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   660
KP901247.1:c3294-1744     GGATCCGAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   583
AM114604.1                GGATCCGAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   660
HQ265564.1:1-1534         GGATCCAAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   575
GBVA2695-11.matKCocos     GGATCCAAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   575
HG969989.1:72-1605        GGATCCAAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   583
AM114637.1:1-1619         GGATCCAAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   660
NC_022417.1:c3129-1588    GGATCCAAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   583
GBVA2690-11.matKCocos     GGATCCAAGATGTTCCTTCTTTACATTTATTGCGATTCTTTCTTCACGAATATCATAATT   660
                          ****** ******************************************************

AM114603.1                GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   720
GBVS3610-13.matKBorassus  GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   643
Borassus                  GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   643
HQ720244.1                GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   652
AM114604.1:1-1628         GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   720
KP901247.1:c3294-1744     GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   643
AM114604.1                GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTTCTTTTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   720
HQ265564.1:1-1534         GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTT---TTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   632
GBVA2695-11.matKCocos     GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTT---TTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   632
HG969989.1:72-1605        GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTT---TTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   640
AM114637.1:1-1619         GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTT---TTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   717
NC_022417.1:c3129-1588    GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTT---TTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   640
GBVA2690-11.matKCocos     GGAATAGTCTTATTACTCCGAATAATTCTATTTTT---TTTTCAAAAGAAAATAAAAGAC   717
                          ************************************   **********************

AM114603.1                TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGCTTTTCTTC   780
GBVS3610-13.matKBorassus  TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGCTTTTCTTC   703
Borassus                  TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGCTTTTCTTC   703
HQ720244.1                TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGCTTTTCTTC   712
AM114604.1:1-1628         TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGCTTTTCTTC   780
KP901247.1:c3294-1744     TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGCTTTTCTTC   703
AM114604.1                TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGCTTTTCTTC   780
HQ265564.1:1-1534         TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGTTTTTCTTC   692
GBVA2695-11.matKCocos     TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGTTTTTCTTC   692
HG969989.1:72-1605        TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGTTTTTCTTC   700
AM114637.1:1-1619         TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGTTTTTCTTC   777
NC_022417.1:c3129-1588    TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGTTTTTCTTC   700
GBVA2690-11.matKCocos     TATTTCGGTTCCCATATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATTTGTATTAGTTTTTCTTC   777
                          ************************************************** ********

AM114603.1                GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   840
GBVS3610-13.matKBorassus  GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   763
Borassus                  GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   763
HQ720244.1                GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   772
AM114604.1:1-1628         GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   840
KP901247.1:c3294-1744     GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   763
AM114604.1                GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   840
HQ265564.1:1-1534         GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   752
GBVA2695-11.matKCocos     GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   752
HG969989.1:72-1605        GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   760
AM114637.1:1-1619         GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   837
NC_022417.1:c3129-1588    GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   760
GBVA2690-11.matKCocos     GTAAACAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGCTTTTCTTGAGCGAACACATT   837
                          ************************************************************

AM114603.1                TCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCATAATTATTTTCAGAAGA   900
GBVS3610-13.matKBorassus  TCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   823
Borassus                  TCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   823
HQ720244.1                TCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   832
AM114604.1:1-1628         TCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   900
KP901247.1:c3294-1744     TCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   823
AM114604.1                TCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTAGTAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   900
HQ265564.1:1-1534         TCTATGGAAAAATAGAACATCTTATAG------TAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   806
GBVA2695-11.matKCocos     TCTATGGAAAAATAGAACATCTTATAG------TAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   806
HG969989.1:72-1605        TCTATGGAAAAATAGAACATCTTATAG------TAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   814
AM114637.1:1-1619         TCTATGGAAAAATAGAACATCTTATAG------TAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   891
NC_022417.1:c3129-1588    TCTATGGAAAAATAGAACATCTTATAG------TAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   814
GBVA2690-11.matKCocos     TCTATGGAAAAATAGAACATCTTATAG------TAGTGCGCCGTAATTATTTTCAGAAGA   891
                          ********************** ***      ********* ******************

AM114603.1                CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   960
GBVS3610-13.matKBorassus  CTCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   883
Borassus                  CTCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   883
HQ720244.1                CTCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   892
AM114604.1:1-1628         CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   960
KP901247.1:c3294-1744     CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   883
AM114604.1                CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   960
HQ265564.1:1-1534         CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   866
GBVA2695-11.matKCocos     CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   866
HG969989.1:72-1605        CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   874
AM114637.1:1-1619         CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   951
NC_022417.1:c3129-1588    CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   874
GBVA2690-11.matKCocos     CCCTATGGTTCTTCAAGGATCCCTTCATGCATTATGTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTC   951
                          * ************************************************************
```

```
AM114603.1                TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCGCCTTGTCAATTTCT  1020
GBVS3610-13.matKBorassus  TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCGCCTTGTCAATTTCT   943
Borassus                  TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCGCCTTGTCAATTTCT   943
HQ720244.1                TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCGCCTTGTCAATTTCT   952
AM114604.1:1-1628         TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCGCCTTGTCAATTTCT  1020
KP901247.1:c3294-1744     TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCGCCTTGTCAATTTCT   943
AM114604.1                TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCGCCTTGTCAATTTCT  1020
HQ265564.1:1-1534         TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCATCTTGTCAATTTCT   926
GBVA2695-11.matKCocos     TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCATCTTGTCAATTTCT   926
HG969989.1:72-1605        TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCATCTTGTCAATTTCT   934
AM114637.1:1-1619         TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCATCTTGTCAATTTCT  1011
NC_022417.1:c3129-1588    TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCATCTTGTCAATTTCT   934
GBVA2690-11.matKCocos     TGGTTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATGTCATCTTGTCAATTTCT  1011
                          ********************************************  *************

AM114603.1                GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGCACAGGATCCAGATAAACCAATTATCAA  1080
GBVS3610-13.matKBorassus  GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCAGATAAACCAATTATCAA  1003
Borassus                  GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCAGATAAACCAATTATCAA  1003
HQ720244.1                GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCAGATAAACCAATTATCAA  1012
AM114604.1:1-1628         GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCAGATAAACCAATTATCAA  1080
KP901247.1:c3294-1744     GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCAGATAAACCAATTATCAA  1003
AM114604.1                GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCAGATAAACCAATTATCAA  1080
HQ265564.1:1-1534         GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCATATAAACCAATTATCAA   986
GBVA2695-11.matKCocos     GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCATATAAACCAATTATCAA   986
HG969989.1:72-1605        GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCATATAAACCAATTATCAA   994
AM114637.1:1-1619         GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCATATAAACCAATTATCAA  1071
NC_022417.1:c3129-1588    GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCATATAAACCAATTATCAA   994
GBVA2690-11.matKCocos     GGCAATATTATTTTCACTTTTGGTCTCAACCGTACAGGATCCATATAAACCAATTATCAA  1071
                          ********************************** ********** ****************

AM114603.1                ACTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCTTTCGGCGGTAA  1140
GBVS3610-13.matKBorassus  ACTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCTTTCGGCGGTAA  1063
Borassus                  ACTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCTTTCGGCGGTAA  1063
HQ720244.1                ACTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCTTTCGGCGGTAA  1072
AM114604.1:1-1628         ACTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCTTTCGGCGGTAA  1140
KP901247.1:c3294-1744     ACTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCTTTCGGCGGTAA  1063
AM114604.1                ACTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCTTTCGGCGGTAA  1140
HQ265564.1:1-1534         GCTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCCTTCGGCGGTAA  1046
GBVA2695-11.matKCocos     GCTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCCTTCGGCGGTAA  1046
HG969989.1:72-1605        GCTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCCTTCGGCGGTAA  1054
AM114637.1:1-1619         GCTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCCTTCGGCGGTAA  1131
NC_022417.1:c3129-1588    GCTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCCTTCGGCGGTAA  1054
GBVA2690-11.matKCocos     GCTGTTCTTTCTATTTTCTAGGTTATCTTTCAAGTGTACTAATAAATCCTTCGGCGGTAA  1131
                           ********************************************** ***********

AM114603.1                GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTTTTAAAAAATTCGATACCA  1200
GBVS3610-13.matKBorassus  GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTTTTAAAAAATTCGATACCA  1123
Borassus                  GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTTTTAAAAAATTCGATACCA  1123
HQ720244.1                GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTTTTAAAAAATTCGATACCA  1132
AM114604.1:1-1628         GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTTTTAAAAAATTCGATACCA  1200
KP901247.1:c3294-1744     GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTTTTAAAAAATTCGATACCA  1123
AM114604.1                GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTTTTAAAAAATTCGATACCA  1200
HQ265564.1:1-1534         GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTATTAAAAAATTCGATACCA  1106
GBVA2695-11.matKCocos     GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTATTAAAAAATTCGATACCA  1106
HG969989.1:72-1605        GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTATTAAAAAATTCGATACCA  1114
AM114637.1:1-1619         GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTATTAAAAAATTCGATACCA  1191
NC_022417.1:c3129-1588    GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTATTAAAAAATTCGATACCA  1114
GBVA2690-11.matKCocos     GGAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTGTTATTAAAAAATTCGATACCA  1191
                          ****************************************** ******************

AM114603.1                GAGTCCCAGTCATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCGAAATTTTGTACCGTATCGG  1260
GBVS3610-13.matKBorassus  GAGTCCCAGTCATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCGAAATTTTGTACCGTATCGG  1183
Borassus                  GAGTCCCAGTCATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCGAAATTTTGTACCGTATCGG  1183
HQ720244.1                GAGTCCCAGTCATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCGAAATTTTGTACCGTATCGG  1192
AM114604.1:1-1628         GAGTCCCAGTCATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCGAAATTTTGTACCGTATCGG  1260
KP901247.1:c3294-1744     GAGTCCCAGTCATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCGAAATTTTGTACCGTATCGG  1183
AM114604.1                GAGTCCCAGTCATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCGAAATTTTGTACCGTATCGG  1260
HQ265564.1:1-1534         GAGTCCCAGTTATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCTAAATTTTGTACCGTATCGG  1166
GBVA2695-11.matKCocos     GAGTCCCAGTTATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCTAAATTTTGTACCGTATCGG  1166
HG969989.1:72-1605        GAGTCCCAGTTATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCTAAATTTTGTACCGTATCGG  1174
AM114637.1:1-1619         GAGTCCCAGTTATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCTAAATTTTGTACCGTATCGG  1251
NC_022417.1:c3129-1588    GAGTCCCAGTTATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCTAAATTTTGTACCGTATCGG  1174
GBVA2690-11.matKCocos     GAGTCCCAGTTATTCCTCTTATTGGATCATTGTCTAAAGCTAAATTTTGTACCGTATCGG  1251
                          ********** ***************************** ********************

AM114603.1                GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCGATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1320
GBVS3610-13.matKBorassus  GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCGATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1243
Borassus                  GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCGATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1243
HQ720244.1                GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCGATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1252
AM114604.1:1-1628         GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCGATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1320
KP901247.1:c3294-1744     GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCGATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1243
AM114604.1                GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCGATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1320
HQ265564.1:1-1534         GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCAATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1226
GBVA2695-11.matKCocos     GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCAATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1226
HG969989.1:72-1605        GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCAATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1234
AM114637.1:1-1619         GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCAATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1311
NC_022417.1:c3129-1588    GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCAATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1234
GBVA2690-11.matKCocos     GGCATCCTATTAGTAAGCCGATCTGGACCAATTTATCAGATTGCGATATTATTGATCGAT  1311
                          ***************************** ******************************
```

```
AM114603.1                TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACAAAGTT  1380
GBVS3610-13.matKBorassus  TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACAAAGTT  1303
Borassus                  TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACAAAGTT  1303
HQ720244.1                TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACAAAGTT  1312
AM114604.1:1-1628         TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACAAAGTT  1380
KP901247.1:c3294-1744     TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACAAAGTT  1303
AM114604.1                TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCATAGTGGATCCTCAAAAAAACAAAGTT  1380
HQ265564.1:1-1534         TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAACAGAGTT  1286
GBVA2695-11.matKCocos     TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAACAGAGTT  1286
HG969989.1:72-1605        TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAACAGAGTT  1294
AM114637.1:1-1619         TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAACAGAGTT  1371
NC_022417.1:c3129-1588    TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAACAGAGTT  1294
GBVA2690-11.matKCocos     TTGGTCGGATATGTAGAAATCTTTCTCATTATCACAGTGGATCCTCAAAAAAACAGAGTT  1371
                          ********************************** ******************** ****

AM114603.1                TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAAAACTTTGGCTCGTAAACATA  1440
GBVS3610-13.matKBorassus  TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAAAACTTTGGCTCGTAAACATA  1363
Borassus                  TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAAAACTTTGGCTCGTAAACATA  1363
HQ720244.1                TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAAAACTTTGGCTCGTAAACATA  1372
AM114604.1:1-1628         TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAAAACTTTGGCTCGTAAACATA  1440
KP901247.1:c3294-1744     TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAAAACTTTGGCTCGTAAACATA  1363
AM114604.1                TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAAAACTTTGGCTCGTAAACATA  1440
HQ265564.1:1-1534         TGTGNAAAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGCGCNAGAACTTTGGCTCGTAAACATA  1346
GBVA2695-11.matKCocos     TGTGNAAAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGCGCNAGAACTTTGGCTCGTAAACATA  1346
HG969989.1:72-1605        TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAGAACTTTGGCTCGTAAACATA  1354
AM114637.1:1-1619         TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAGAACTTTGGCTCGTAAACATA  1431
NC_022417.1:c3129-1588    TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAGAACTTTGGCTCGTAAACATA  1354
GBVA2690-11.matKCocos     TGTATCGAATAAAGTATATACTTCGATTTTCGTGTGCTAGAACTTTGGCTCGTAAACATA  1431
                          ***    *************************** ** * *********************

AM114603.1                AAAGTATGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTTTTTA  1500
GBVS3610-13.matKBorassus  AAAGTACGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTTTTTA  1423
Borassus                  AAAGTACGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTTTTTA  1423
HQ720244.1                AAAGTACGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTTTTTA  1432
AM114604.1:1-1628         AAAGTACGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTTTTTA  1500
KP901247.1:c3294-1744     AAAGTACGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTTTTTA  1423
AM114604.1                AAAGTACGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTTTTTA  1500
HQ265564.1:1-1534         ANAGTATGGTNCGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTCTTTA  1406
GBVA2695-11.matKCocos     ANAGTATGGTNCGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTCTTTA  1406
HG969989.1:72-1605        AAAGTATGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTCTTTA  1414
AM114637.1:1-1619         AAAGTATGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTCTTTA  1491
NC_022417.1:c3129-1588    AAAGTATGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTCTTTA  1414
GBVA2690-11.matKCocos     AAAGTATGGTACGCGCTTTTTTGCAAAGATTAGGTTCGGGATTATTAGAAGAATTCTTTA  1491
                          * **** *** ********************************************* ****

AM114603.1                TGGAAGAAGAACAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCCAAAACCAACTTCTTTTTCTTTACATG  1560
GBVS3610-13.matKBorassus  TGGAAGAAGAACAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCCAAAACCAACTTCTTTTTCTTTACATG  1483
Borassus                  TGGAAGAAGAACAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCCAAAACCAACTTCTTTTTCTTTACATG  1483
HQ720244.1                TGGAAGAAGAACAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCCAAAACCAACTTCTTTTTCTTTACATG  1492
AM114604.1:1-1628         TGGAAGAAGAACAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCCAAAACCAACTTCTTTTTCTTTACATG  1560
KP901247.1:c3294-1744     TGGAAGAAGAACAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCCAAAACCAACTTCTTTTTCTTTACATG  1483
AM114604.1                TGGAAGAAGAACAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCCAAAACCAACTTCTTTTTCTTTACATG  1560
HQ265564.1:1-1534         CGGAAGAAGAAGAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCAAAAAACAACCTCTTTTTCTTTACATG  1466
GBVA2695-11.matKCocos     CGGAAGAAGAAGAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCAAAAAACAACCTCTTTTTCTTTACATG  1466
HG969989.1:72-1605        CGGAAGAAGAAGAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCAAAAAACAACCTCTTTTTCTTTACATG  1474
AM114637.1:1-1619         CGGAAGAAGAAGAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCAAAAAACAACCTCTTTTTCTTTACATG  1551
NC_022417.1:c3129-1588    CGGAAGAAGAAGAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCAAAAAACAACCTCTTTTTCTTTACATG  1474
GBVA2690-11.matKCocos     CGGAAGAAGAAGAAGTTGTTTCTTTGATCTTCCAAAAAACAACCTCTTTTTCTTTACATG  1551
                           ********** ********************** **** **** ****************

AM114603.1                AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAGTGACCTGGTGAATT  1620
GBVS3610-13.matKBorassus  AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAGTGACCTGGTGAATT  1543
Borassus                  AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAGTGACCTGGTGAATT  1
HQ720244.1                AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAGTGACCTGGTGAATT  1
AM114604.1:1-1628         AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAGTGACCTGGTGAATT  1
KP901247.1:c3294-1744     AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAGTGACCTGGTGAATT  1
AM114604.1                AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAGTGACCTGGTGAATT  1
HQ265564.1:1-1534         AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAATGACCTGGTGAATT  1526
GBVA2695-11.matKCocos     AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAATGACCTGGTGAATT  1526
HG969989.1:72-1605        AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAATGACCTGGTGAATT  1534
AM114637.1:1-1619         AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAATGACCTGGTGAATT  1611
NC_022417.1:c3129-1588    AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAATGACCTGGTGAATT  1534
GBVA2690-11.matKCocos     AATCACATATAGAACGTATTTGGTATTTGGATATTATCCGTATCAATGACCTGGTGAATT  1611
                          ******************************************** **************
```

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงไพรเมอร์ RAPD

ตารางที่ 1

RAPD KIT	PRIMER	SEQUENCE	PRIMER	SEQUENCE
KIT A	OPA-01	CAGGCCCTTC	OPA-11	CAATCGCCGT
	OPA-02	TGCCGAGCTG	OPA-12	TCGGCGATAG
	OPA-03	AGTCAGCCAC	OPA-13	CAGCACCCAC
	OPA-04	AATCGGGCTG	OPA-14	TCTGTGCTGG
	OPA-05	AGGGGTCTTG	OPA-15	TTCCGAACCC
	OPA-06	GGTCCCTGSC	OPA-16	AGCCAGCGAA
	OPA-07	GAAACGGGTG	OPA-17	GACCGCTTGT
	OPA-08	GTGACGTAGG	OPA-18	AGGTGACCGT
	OPA-09	GGGTAACGCC	OPA-19	CAAACGTCGG
	OPA-10	GTGATCGCAG	OPA-20	GTTGCGATCC

ตารางที่ 2

RAPD KIT	PRIMER	SEQUENCE	PRIMER	SEQUENCE
KIT B	OPB-01	GTTTCGCTCC	OPB-11	GTAGACCCGT
	OPB-02	TGATCCCTGG	OPB-12	CCTTGACGCA
	OPB-03	CATCCCCCTG	OPB-13	TTCCCCCGCT
	OPB-04	GGACTGGAGT	OPB-14	TCCGCTCTGG
	OPB-05	TGCGCCCTTC	OPB-15	GGAGGGTGTT
	OPB-06	TGCTCTGCCC	OPB-16	TTTGCCCGGA
	OPB-07	GGTGACGCAG	OPB-17	AGGGAACGAG
	OPB-08	GTCCACACGG	OPB-18	CCACAGCAGT
	OPB-09	TGGGGGACTC	OPB-19	ACCCCCGAAG
	OPB-10	CTGCTGGGAC	OPB-20	GGACCCTTAC

ตารางที่ 3

RAPD KIT	PRIMER	SEQUENCE	PRIMER	SEQUENCE
KIT C	OPC-01	TTCGAGCCAG	OPC-11	AAAGCTGCGG
	OPC-02	GTGAGGCGTC	OPC-12	TGTCATCCCC
	OPC-03	GGGGGTCTTT	OPC-13	AAGCCTCGTC
	OPC-04	CCGCATCTAC	OPC-14	TGCGTGCTTG
	OPC-05	GATGACCGCC	OPC-15	GACGGATCAG
	OPC-06	GAACGGACTC	OPC-16	CACACTCCAG
	OPC-07	GTCCCGACGA	OPC-17	TTCCCCCCAG
	OPC-08	TGGACCGGTG	OPC-18	TGAGTGGGTG
	OPC-09	CTCACCGTCC	OPC-19	GTTGCCAGCC
	OPC-10	TGTCTGGGTG	OPC-20	ACTTCGCCAC

ตารางที่ 4

RAPD KIT	PRIMER	SEQUENCE	PRIMER	SEQUENCE
KIT D	OPD-01	ACCGCGAAGG	OPD-11	AGCGCCATTG
	OPD-02	GGACCCAACC	OPD-12	CACCGTATCC
	OPD-03	GTCGCCGTCA	OPD-13	GGGGTGACGA
	OPD-04	TCTGGTGAGG	OPD-14	CTTCCCCAAG
	OPD-05	TGAGCGGACA	OPD-15	CATCCGTGCT
	OPD-06	ACCTGAACGG	OPD-16	AGGGCGTAAG
	OPD-07	TTGGCACGGG	OPD-17	TTTCCCACGG
	OPD-08	GTGTGCCCCA	OPD-18	GAGAGCCAAC
	OPD-09	CTCTGGAGAC	OPD-19	CTGGGGACTT
	OPD-10	GGTCTACACC	OPD-20	ACCCGGTCAC

ตางรางที่ 5

RAPD KIT	PRIMER	SEQUENCE	PRIMER	SEQUENCE
KIT E	OPE-01	CCCAAGGTCC	OPE-11	GAGTCTCAGG
	OPE-02	GGTGCGGGAA	OPE-12	TTATCGCCCC
	OPE-03	CCAGATGCAC	OPE-13	CCCGATTCGG
	OPE-04	GTGACATGCC	OPE-14	TGCGGCTGAG
	OPE-05	TCAGGGAGGT	OPE-15	ACGCACAACC
	OPE-06	AAGACCCCTC	OPE-16	GGTGACTGTG
	OPE-07	AGATGCAGCC	OPE-17	CTACTGCCGT
	OPE-08	TCACCACGGT	OPE-18	GGACTGCAGA
	OPE-09	CTTCACCCGA	OPE-19	ACGGCGTATG
	OPE-10	CTTCACCCGA	OPE-20	AACGGTGACC