รายงานการวิจัย

อาร์เอพีดี-พีซีอาร์ที่เหมาะสมในการเปรียบเทียบและจำแนกสายพันธุ์ละหุ่ง

Optimization of RAPD-PCR for Comparison and Identification of Oilseed Castor Bean

ผู้วิจัย

นางสาวอรุณรัตน์ อนันตทัศน์

นางสาวสุรีพร เกตุงาม

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประจำปีงบประมาณ 2551

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยโครงการจัดตั้งกองส่งเสริมงานวิจัยฯ สำนักงานอธิการบดี ประจำปีงบประมาณ 2551 (ทุนนักวิจัยหน้าใหม่) ขอขอบพระคุณคุณธำรง เชื้อกิตติศักดิ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี กรมวิชาการเกษตร และ บริษัทสยามน้ำมันละหุ่งที่ให้การสนับสนุนเมล็ดพันธุ์ละหุ่งที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุน สถานที่วิจัยทั้งสำนักงานไร่ฝึกทดลองและห้องปฏิบัติการกลางเทคโนโลยีชีวภาพ ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย ท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณนางสาวพัชรี ลาโคตร ที่ช่วยในการทำปฏิบัติการและการวิเคราะห์ข้อมูล

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ที่เหมาะในการจำแนกสายพันธุ์ละหุ่ง 9 สายพันธุ์ เริ่มต้นจากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่ง 3 วิธี พบว่า วิธี 2 % CTAB ที่มีการดัดแปลงจาก Webb and Knapp (1990) ให้คุณภาพดีเอ็นเอดีที่สุด จากนั้นศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ โดยกำหนดตัวแปรที่ศึกษา 3 ตัวแปร ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ (10 และ 20 นาโนกรัม) ปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ (2,2.5 และ 3 มิลลิโมลาร์) และ *Taq* DNA polymerase (0.5 และ 1 ยูนิต) และกำหนดให้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ และ dNTPs คงที่ คือ 0.6 และ 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ของละหุ่งที่เหมาะสมนั้นโดยอาร์เอพีดีไพรเมอร์ OPA03 ได้จากระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 3 มิลลิโมลาร์และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปนำไปทดสอบเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่ง 9 สายพันธุ์ได้ โดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมดจำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่ามี 31 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน จาก 31 ไพรเมอร์นี้มีสองไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) ได้แก่ ไพรเมอร์ OPC11 และOPJ13 และ 29 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างและชัดเจน (polymorphic bands) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดีได้จำนวน 153 เครื่องหมาย จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Dice's similarity coefficient) มีค่าตั้งแต่ 0.243 -0.870 บ่งชี้ว่าละหุ่งที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำถึงปานกลาง การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Cluster analysis) โดยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของละหุ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วยละหุ่งพื้นเมือง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน (No.2), พันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก (No.7), พันธุ์พื้นดำสนิทลายขาว (No.8) และพื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (No.9) กลุ่มที่สอง ประกอบด้วยละหุ่ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นดำน้ำตาล ลายขาว (No.4), และ พันธุ์ทีซีโอ208 (No.5) ส่วนละหุ่งพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว (No. 3), สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6) และละหุ่งพันธุ์พื้นขาวลายดำ (No.1) มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ และไม่สามารถจัดรวมเข้ากลุ่มใดได้

Abstract

Optimization of RAPD-PCR for cultivar identification of 9 castor bean varieties was carried out in this study. First, three DNA extraction methods from young leaves of castor bean were investigated and modified CTAB method from Webb and Knapp (1990) yielded good quality of DNA content. Second, the study on RAPD-PCR optimization for castor bean identification was performed to determine the optimum concentration of three essential parameters for PCR amplification including DNA template (10 and 20 ng), $MgCl_2$ (2.0, 2.5 and 3.0 mM), and *Taq* DNA polymerase (0.5, and 1.0 U) while the concentration of RAPD primer and dNTPs were fixed at the concentration of 0.6 μM and 200 μM respectively. Reproducible amplification patterns with OPA03 primer were obtained using 10 ng of template DNA, 3.0 mM of $MgCl_2$, and 1 U of *Taq* DNA polymerase in 20 μl of the reaction. Third, the optimized RAPD protocol was employed to select the suitable RAPD primers for fingerprinting of 9 castor bean varieties. Out of 110 RAPD primers screening, 31 primers revealed clear patterns of DNA amplifications. Two primers, OPC11 and OPJ13 yielded monomorphic bands; therefore these primers can not be used for castor bean identification. Twenty-nine primers generated 153 polymorphic bands, which could be used as RAPD markers for determining genetic diversity of castor bean varieties. The Dice's similarity coefficient ranged from 0.243 to 0.870 between pairs of varieties, indicating that these castor bean varieties were less to moderate genetic diverse. The UPGMA cluster analysis based on the similarity coefficient grouped 6 of 9 varieties in two robust clusters. The first group consists of four landrace varieties including creamy white background with light brown strips variety (No.2), white background with small brown spots variety (No.7), black background with white strips variety (No.8) and white background with light brown strips variety (No.9). Another group consists of 2 varieties, black background with white strips variety (No.4) and TCO208 (No.5). The three remainder varieties, light brown-black background with white strip variety (No.3), India2x25-1-4-3-2 (No.6) and white background with black strip variety (No.1), can not be clustered due to their genetics' constitution difference.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อภาษาไทย ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค

สารบัญเรื่อง ง

สารบัญตาราง จ

สารบัญรูปภาพ ฉ

คำอธิบายสัญลักษณ์ ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตโครงการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3

2.1 ความสำคัญของละหุ่ง 3

2.2 การจำแนกชนิดละหุ่ง 4

2.3 พันธุ์ละหุ่ง 4

2.4 เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพันธุ์พืช 7

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 10

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ 10

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ในเรือนทดลอง 10

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดวิเคราะห์ดีเอ็นเอ 10

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

2. วิธีการทดลอง 17

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม 17

1.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 2 % CTAB method 17
(Rogers and Bendich, 1994)

1.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 2 % CTAB method 18
(ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994)

1.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 2 % CTAB method with phenol-chloroform 19
extraction (Webb and Knapp, 1990)

2. การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 19
(Optimization of RAPD-PCR)

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งโดยเทคนิคอาร์เอพีดี 22

3.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งโดยเทคนิคอาร์เอพีดี 22

- การตรวจสอบผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ 22

3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งโดยใช้เทคนิค 22
อาร์เอพีดี

บทที่ 4 ผลการทดลอง 24

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่ง 24

2. การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ 26

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมละหุ่งโดยเทคนิคอาร์เอพีดี 27

3.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 27

3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (RAPD data analysis) 35

- ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 40
(Genetic Similarity coefficient)

- การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Cluster analysis) 42

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 44

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่ง 44
2. การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ 44
3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี 46

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 48

เอกสารอ้างอิง 49

ภาคผนวก 52

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ 53
- การเตรียม Stock solution 54
- การเตรียม Electrophorisis 55

ประวัติผู้วิจัย 56

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พันธุ์ละหุ่งที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	13
2	ส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่จะใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	26
3	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของละหุ่ง, polymorphic bands (RAPD markers) และ ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (fragment length- bp)	27
4	แสดงการบันทึกข้อมูลแบบ binary data ของ RAPD markers จำนวน 153 markers ในละหุ่ง 9 สายพันธุ์ จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี จากอาร์เอพีดีไพรเมอร์ จำนวน 29 ไพรเมอร์	35
5	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Dice's similarity coefficient) ของละหุ่ง 9 สายพันธุ์	41

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หมายเลข 1 คือ พันธุ์พื้นขาว ลายดำ	14
2	หมายเลข 2 คือ พันธุ์พื้นขาวครีม ลายน้ำตาลอ่อน	14
3	หมายเลข 3 คือ พันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว	14
4	หมายเลข 4 คือ พันธุ์พื้นดำน้ำตาลลายขาว	15
5	หมายเลข 5 คือ พันธุ์TCO208	15
6	หมายเลข 6 คือ ละหุ่งสายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2	15
7	หมายเลข 7 คือ พันธุ์พื้นขาว ลายจุดน้ำตาลเล็ก	16
8	หมายเลข 8 คือ พันธุ์พื้นดำสนิทลายขาว	16
9	หมายเลข 9 คือ พันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน	16
10	แสดงไดอะแกรมตำหรับการทดลอง (Treatment -T) ของการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 12 ตำหรับการทดลอง	21
11	แสดงปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่งได้จากวิธีที่1	24
12	แสดงปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่งได้จากวิธีที่2	25
13	แสดงปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่งได้จากวิธีที่3	25
14	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC 20	30
15	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPD 20	31
16	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA 05	32
17	แสดง phylogenetic tree ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS version 2.2 ของละหุ่ง 9 สายพันธุ์	33
18	แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC 06	34
19	Dendrogram of 9 castor genotypes developed from RAPD data using Unweighted pair grouping of arithmetic means (UPGMA)	43

คำอธิบายสัญลักษณ์

PCR = Polymerase chain reaction

RAPD = Random amplified polymorphic DNA

dNTPs = Deoxy-nucleotide triphosphates

CTAB = Cetyltrimethylammonium bromide

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ละหุ่งจัดเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศไทย มีชื่อภาษาอังกฤษว่า castor และชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Ricinus communis* L. เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กทรงพุ่มเตี้ย ละหุ่งเป็นพืชทนแล้ง สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ในทุกภาคของประเทศไทย ในต่างประเทศปลูกมากที่ประเทศบราซิล อินเดีย และเมียนม่าร์

ละหุ่งที่ปลูกในไทยทั่วไปประกอบด้วย พันธุ์อายุยาวหรือประเภทข้ามปี และพันธุ์อายุสั้นหรือประเภทล้มลุก ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์ละหุ่งพื้นเมืองเดิม โดยผสมกับพันธุ์อายุสั้น เพื่อให้ได้พันธุ์ละหุ่งอายุยาวข้ามปี สำหรับปลูกทดแทนพันธุ์พื้นเมืองเดิม พันธุ์อายุยาวที่มีการปลูกในประเทศไทยได้แก่ พันธุ์ลายขาวดำ พันธุ์ต้นนวล พันธุ์ทีซีโอ 101 (TCO 101) พันธุ์ทีซีโอ 102 (TCO 102) และสายพันธุ์ I_2x25-11CR กับ I_2x25-11-2-8 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก้าวหน้าของกรมวิชาการเกษตร ที่ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานีเป็นพันธุ์ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ India 2 กับละหุ่งพื้นเมือง ส่วนพันธุ์อายุสั้นหรือประเภทล้มลุกส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งปลูกเป็นการค้าเพราะดูแลง่าย ให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันในเมล็ดสูง อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120-150 วัน พันธุ์อายุสั้นที่ปลูกในประเทศไทยได้แก่ พันธุ์ลูกผสม H-22 (Hazera) พันธุ์ลูกผสมอุบล 90 พันธุ์ทีซีโอ 202 (TCO 202) พันธุ์ทีซีโอ 203 (TCO 203) พันธุ์ทีซีโอ 204 (TCO 204) พันธุ์ทีซีโอ 205 (TCO 205) พันธุ์ทีซีโอ 208 (TCO 208)

ผู้วิจัยสนใจศึกษาเปรียบเทียบและจัดจำแนกสายพันธุ์ละหุ่งที่มีอยู่ในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของสายพันธุ์ละหุ่งพื้นเมือง เพื่อเป็นฐานข้อมูลด้านพันธุกรรม เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพืชมีข้อจำกัดหลายประการเช่น การแสดงออกของบางลักษณะมีความจำเพาะเจาะจงกับอายุ และมักผันแปรไปตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดกันนั้นมีจำนวนน้อย จึงส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชได้ ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์พืช ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างจากจีโนไทป์ หรือดีเอ็นเอของพืชโดยตรง ดังนั้น จึงไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อม เข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้การจำแนกสายพันธุ์พืชมีความแม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว

งานศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อจำแนกสายพันธุ์ละหุ่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และที่สำคัญเสียค่าใช้จ่ายน้อย) โดยศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของ

ละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองในเขตอีสานตอนล่างเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ของละหุ่ง และเพื่อเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ละหุ่งต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่ง
2 ศึกษาหา RAPD protocol ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ละหุ่ง
3. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ละหุ่ง จำนวน 9 พันธุ์

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับละหุ่งที่เป็นพืชน้ำมันและมียาง "เรซิน" โดยรวบรวมวิธีสกัดดีเอ็นเอของละหุ่งจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ ที่ได้มีตีพิมพ์เผยแพร่
- ทดสอบและเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่ง
- ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แก่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) และความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase
- สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในละหุ่ง 9 สายพันธุ์จาก RAPD primers ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถใช้เป็น RAPD markers ได้
- วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมละหุ่ง (Genetic diversity analysis of castor bean)

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีสำหรับแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ละหุ่งได้
2. สามารถใช้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (DNA polymorphisms) เป็นข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ละหุ่งที่มีอยู่
3. สามารถจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ละหุ่งพื้นเมือง เพื่อใช้เป็นข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ประกอบกับลักษณะอื่นๆ เพื่อสนับสนุนพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ความสำคัญของละหุ่ง

ละหุ่ง (Castor , *Ricinus communis* L.) เป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศไทย ชื่อสามัญชาวอังกฤษเรียก "Castor" ส่วนชาวสเปนและชาวโปรตุเกส เรียก "Ricinus" จัดอยู่ใน family **Euphorbiaceae** subfamily **Acalypheae** genus **Ricinus** species **Communis** มีถิ่นกำเนิดที่สันนิษฐานว่ามาจาก 2 แหล่ง คือ ประเทศเอธิโอเปีย ในทวีปแอฟริกา และประเทศอินเดีย ในทวีปเอเชีย สำรวจพบลักษณะพันธุ์ป่า (wilds forms) ขึ้นกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปในทวีปแอฟริกา (ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี กรมวิชาการเกษตร, 2549) ละหุ่งเป็นพืชน้ำมันที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 20 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์มีความหลากหลายค่อนข้างมาก มีทั้งพันธุ์ป่าและพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า

ละหุ่งเป็นพืชไร่น้ำมันที่ใช้ประโยชน์ได้หลายส่วน แต่น้ำมันละหุ่งไม่สามารถนำไปใช้บริโภคได้โดยตรง สมัยอียิปต์โบราณใช้เป็นน้ำมันตะเกียงให้แสงสว่าง ใช้ทำยา ประเทศจีนนำน้ำมันละหุ่งมาผสมสีเพื่อใช้ในการพิมพ์และประทับตรา สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 น้ำมันละหุ่งถูกใช้เป็นน้ำมันหล่อลื่นของเครื่องบิน จะเห็นว่าน้ำมันละหุ่งเป็นน้ำมันจากพืชที่มีคุณสมบัติกว้างมาก เหมาะที่จะนำมาทำเป็นแหล่งพืชพลังงานทดแทน น้ำมันละหุ่งที่มีคุณสมบัติที่ดี คือ ไม่แห้งง่าย มีความเหนียวและความหนืดดีกว่าน้ำมันชนิดอื่นๆ จึงถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น สี หมึกพิมพ์ พลาสติก เครื่องสำอาง น้ำมันหล่อลื่น และจารบี ประเทศไทยส่งออกละหุ่งในรูปน้ำมันและผลิตภัณฑ์แปรรูป ได้แก่ขี้ผึ้งเทียม และน้ำมันละหุ่งแห้งเร็ว (dehydrated castor oil) มีมูลค่าปีละ 300-400 ล้านบาท อย่างไรก็ตาม น้ำมันละหุ่งที่สกัดได้ไม่เพียงพอกับความต้องการของอุตสาหกรรมภายในประเทศ โรงงานสกัดน้ำมันละหุ่งต้องการผลผลิตเมล็ดละหุ่งถึงปีละ 45,000 ตัน แต่ผลผลิตของประเทศมีเพียง 5,000 ตันเท่านั้น ทำให้ต้องนำเข้าเมล็ดละหุ่งจากประเทศปากีสถาน ลาว เมียนม่าร์และจีน รวมปีละ 10,000 – 20,000 ตัน และนำเข้าน้ำมันละหุ่งจากประเทศอินเดีย มูลค่าปีละไม่น้อยกว่า 400 ล้านบาท (ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี กรมวิชาการเกษตร, 2542) การส่งออก 90 % ของผลิตภัณฑ์ละหุ่งที่ส่งออกทั้งหมด อยู่ในรูปขี้ผึ้งเทียม โดยมีผู้รับซื้อรายใหญ่ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และสหภาพยุโรป

ปัจจุบันการผลิตละหุ่งของไทยมีแนวโน้มลดลงทุกปีทั้งพื้นที่ปลูกและผลผลิต เนื่องจากมีปัญหาด้านการผลิตที่สำคัญคือ พันธุ์ที่เกษตรกรปลูกผลผลิตยังอยู่ในระดับต่ำ และแมลงศัตรูละหุ่งที่ระบาดค่อนข้างรุนแรง ทำให้เกษตรกรไม่นิยมปลูกละหุ่งเป็นแปลงใหญ่ โดยมากจะปลูกตามบริเวณใกล้บ้าน ริมรั้ว ตามหัวไร่ปลายนา หรือปลูกเป็นพืชแซม จึงขาดการดูแลรักษาที่ดี ทำให้ผลผลิตต่ำ การเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของละหุ่ง โดยกระบวนการผลิตที่มีการใช้ทรัพยากรธรรมชาติ อย่างยั่งยืนและเหมาะสม มี

ความปลอดภัยต่อผู้ผลิต และสิ่งแวดล้อม โดยเกษตรกรผู้ปลูกได้รับผลตอบแทนนั้นคุ้มค่าจึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ผู้วิจัยให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับละหุ่ง

2.2 การจำแนกชนิดละหุ่ง

นักพฤกษศาสตร์ นิยมแบ่งประเภทของละหุ่งออกเป็น 4 subspecies ดังนี้คือ

1. Persian variety subspecies persicus พบมากในประเทศอิหร่าน และอินเดีย เป็นละหุ่งพันธุ์เบา อายุประมาณ 80-90 วัน ช่อดอกเป็นรูปกรวยเรียวยาว เมล็ดเล็กกลมรี (oval) เมื่อสุกแก่เมล็ดไม่มี caruncle และผลจะแตกเมื่อแก่

2. Chinese variety subspecies chinensis พบทางตะวันตกของจีน และแมนจูเรีย เป็นละหุ่งพันธุ์เบา อายุสั้นประมาณ 75-97 วัน ช่อดอกรูปกรวยสั้น ผลห่างกัน เมล็ดใหญ่กลมรี (oval) สีเทา มี caruncle เล็ก แตกกิ่งมากอาจมีถึง 13 กิ่ง ผลไม่แตกเมื่อแก่ (non-shattering) ให้ผลผลิตต่ำ

3. Indo-Africa variety subspecies sanguineus, africanus, mexicanus พบมากในทวีปแอฟริกาและเม็กซิโก ลักษณะทั่วๆ ไป มีรูปทรงของช่อดอกแตกต่างกันหลายแบบ ส่วนล่างของช่อดอกจะไม่มีดอกตัวเมีย เมล็ดเรียวยาว มี caruncle ขนาดใหญ่ subspecies นี้ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มากที่สุด และพันธุ์ละหุ่งประมาณ 88 % จัดอยู่ใน subspecies นี้

4. Zanzibar variety subspecies zanzibarinus พบในแอฟริกา อเมริกา และยุโรป ซึ่งปลูกเป็นไม้ประดับ เป็นพวกที่มีอายุยาว ช่อดอกรูปทรงกระบอก ผลและใบมีขนาดใหญ่ แตกกิ่งก้านมาก เมล็ดมีรูปร่างเป็นเหลี่ยม และมี caruncle ใหญ่

2.3 พันธุ์ละหุ่ง

พันธุ์ละหุ่งที่ปลูกเป็นการค้า มี 2 ชนิดคือ

1. พันธุ์อายุยาว หรือพันธุ์ข้ามปี (Parenial type) ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์พื้นเมือง จัดเป็นไม้ยืนต้นอายุยาว 2-3 ปี มีลำต้นสูงใหญ่ 2- 3 เมตรขึ้นไป แตกกิ่งก้านมาก อายุเก็บเกี่ยวช่อแรกประมาณ 150 วันขึ้นไป ฝักแตกง่าย สามารถอยู่ข้ามปีได้ โดยตัดแต่งกิ่งในช่วงฤดูฝนเพื่อให้ละหุ่งแตกกิ่ง และให้ผลผลิตใหม่ พันธุ์พื้นเมืองจะให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เช่น ลายขาวดำ ลายขาวแดง ดำใหญ่ ต้นนวล นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ TCO 101 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดี

พันธุ์ลายขาวดำ : เป็นพันธุ์พื้นเมือง มีลักษณะดังนี้ – ต้นเขียว สูงประมาณ 2 -3 เมตร ไม่มีไข อายุออกดอกประมาณ 65-70 วัน อายุเก็บเกี่ยวช่อแรกประมาณ 110 วัน น้ำหนัก 100 เมล็ดประมาณ 70-75 กรัม เปอร์เซ็นต์น้ำมัน 30 % ผลผลิตประมาณ 120 กิโลกรัม/ ไร่

พันธุ์ต้นนวล : เป็นพันธุ์พื้นเมืองมีลักษณะดังนี้- ต้นสีแดง สูงประมาณ 2-3 เมตร มีไขที่ลำต้น กิ่ง ผล และใต้ใบ (ไขสอง) อายุออกดอกประมาณ 65-70 วัน อายุเก็บเกี่ยวช่อแรกประมาณ 120 วัน น้ำหนัก 100 เมล็ดประมาณ 65-70 กรัม ผลผลิตประมาณ 120 กิโลกรัม/ ไร่

พันธุ์ทีซีโอ 101 : เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่คัดเลือกจากเชื้อพันธุกรรมจากประเทศอินเดีย โดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง จำกัด ลักษณะต้นสูงประมาณ 2-3 เมตร สีแดงมีทั้งไขบนและใต้ใบ (ไขสาม) อายุออกดอก 75-90 วัน อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 140-150 วัน ช่อดอกรูปกรวยยาวประมาณ 40-90 เซนติเมตร สัดส่วนดอกตัวเมียมาก แตกช่อแขนงค่อนข้างช้า จำนวนช่อต่อต้น 5-15 ช่อ ผลแก่ไม่แตกร่วง เมล็ดมีขนาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ดประมาณ 40-45 กรัม ผลผลิตประมาณ 150-300 กิโลกรัม/ ไร่

สายพันธุ์ I_2x25-11CR : เป็นสายพันธุ์ก้าวหน้าของกรมวิชาการเกษตร ที่ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี เป็นพันธุ์ที่สกัดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ India 2 กับละหุ่งพื้นเมือง ลักษณะต้นสูงประมาณ 1.7 – 2.0 เมตร สีแดง มีไขทั้งบนใบและใต้ใบ อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 110 – 120 วัน จำนวนช่อต่อต้น 8 – 9 ช่อ จำนวนผลต่อช่อประมาณ 80 – 90 ผล ผลแก่ไม่แตกร่วง เมล็ดมีขนาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ด เฉลี่ย 45 – 50 กรัม เปอร์เซ็นต์น้ำมันประมาณ 53.5 % ผลผลิตประมาณ 190 – 210 กิโลกรัม/ ไร่

สายพันธุ์ I_2x25-11-2-8 : เป็นสายพันธุ์ก้าวหน้าของกรมวิชาการเกษตร ที่ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี เป็นพันธุ์ที่สกัดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ India 2 กับละหุ่งพื้นเมือง ลักษณะต้นสูงประมาณ 1.7 – 2. 0 เมตร สีแดง มีไขทั้งบนใบและใต้ใบ อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 110 – 120 วัน จำนวนช่อต่อต้น 6 – 7 ช่อ จำนวนผลต่อช่อประมาณ 90 – 100 ผล ผลแก่ไม่แตกร่วง เมล็ดมีขนาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ด เฉลี่ย 45 – 50 กรัม เปอร์เซ็นต์น้ำมันประมาณ 50.5 % ผลผลิตประมาณ 190 – 200 กิโลกรัม/ ไร่

2. พันธุ์อายุสั้น หรือพันธุ์ลูกผสม (Anaual type) เป็นพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศแล้วนำมาปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกในประเทศ อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120-150 วัน ต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร ฝักไม่แตกเมื่อแก่ ให้ผลผลิตต่อไร่สูง ตัวอย่างเช่น พันธุ์ลูกผสมอุบล 90 ทีซีโอ 202 (TCO 202) และ ทีซีโอ 203 (TCO 203)

พันธุ์ลูกผสมอุบล 90 : ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรเมื่อ พ.ศ. 2533- ต้นสีแดง สูงประมาณ 1.5-2.0 เมตร มีไขที่ลำต้น กิ่ง ผล และหลังใบ

(ไขสอง) อายุออกดอกประมาณ 30-40 วัน ประมาณ 5-6 ช่อต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ดประมาณ 27-30 กรัม เปอร์เซ็นต์น้ำมัน 44.2 % ผลผลิตประมาณ 200 กิโลกรัม/ ไร่

พันธุ์ทีซีโอ 202 : เป็นละหุ่งอายุสั้นพันธุ์ผสมเปิดที่แนะนำโดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่งจำกัด- ต้นสีแดง สูงประมาณ 1.5-2.0 เมตร มีไขเฉพาะที่ลำต้น และก้านใบ (ไขเดี่ยว) อายุออกดอกประมาณ 50-55 วัน ผลแก่ไม่แตก น้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 40-45 กรัม ผลผลิตประมาณ 200 กิโลกรัม/ ไร่

พันธุ์ทีซีโอ 203 : เป็นละหุ่งอายุสั้นพันธุ์ผสมเปิดที่แนะนำโดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง จำกัด- ต้นเขียว สูงประมาณ 1.5-2.0 เมตร มีไขหนาทั้งที่ลำต้น กิ่ง ผล และหลังใบ (ไขสอง) ทนทานต่อเพลี้ยจักจั่น อายุออกดอกประมาณ 55-60 วัน ช่อดอกรูปกรวย ยาวประมาณ 26-32 กรัม ผลผลิตประมาณ 200-300 กิโลกรัม/ ไร่

พันธุ์ลูกผสม H 22 : เป็นพันธุ์ลูกผสมจากประเทศอิสราเอล ปัจจุบันไม่มีในประเทศไทย ลักษณะต้นสูงประมาณ 2 – 2.5 เมตร สีแดง มีไขตามลำต้น ก้านใบและผล (ไขสาม) แต่ไขค่อนข้างบาง อายุออกดอก 40 วัน อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 120 วัน ช่อดอกแรกยาว 30 – 45 เซนติเมตร จำนวนช่อต่อต้น 3 – 4 ช่อ จำนวนผลต่อช่อประมาณ 50 – 80 ผล ผลแก่แตกร่วง เมล็ดขนาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 30 – 35 กรัม เปอร์เซ็นต์น้ำมัน 42.3 % ผลผลิตประมาณ 180 – 200 กก./ ไร่

พันธุ์ทีซีโอ 204 : เป็นพันธุ์ที่สกัดได้จากการผสมข้ามพันธุ์ TCO 202 กับพันธุ์ TC 95 – 54 โดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง จำกัด ลักษณะต้นสูงประมาณ 1.0 – 2.0 เมตร สีเขียว มีไขหนาทั้งบนใบและใต้ใบ (ไขสาม) แตกช่อแขนงเร็วและดี อายุออกดอก 40 – 45 วัน ช่อดอกรูปกรวยยาว มีดอกตัวเมียมาก อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 90 วัน ผลแก่ไม่แตกร่วง เมล็ดมีขาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ด 30 – 35 กรัม ผลผลิต 200 – 400 กิโล กรัม/ ไร่

พันธุ์ทีซีโอ 205 : เป็นพันธุ์ที่สกัดได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ TCO 202 กับพันธุ์ TC 95 – 54 โดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง จำกัด ลักษณะต้นสูงประมาณ 1.0 เมตร สีแดง มีไขหนาทั้งลำต้น ใต้ใบและบนใบ (ไขสาม) อายุดอกแรกบาน 30 – 35 วัน อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 100 วัน ช่อแรกยาว 50- 60 เซนติเมตร มีจำนวนช่อต่อต้น 3 – 5 ช่อ จำนวนผลต่อช่อ 90 – 105 ผล ผลแห้งไม่แตกร่วง เมล็ดมีขนาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ด 30 -40 กรัม ผลผลิตประมาณ 200 – 300 กิโลกรัม/ ไร่

พันธุ์ทีซีโอ 208 : เป็นพันธุ์ที่สกัดได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ TCO 101 กับพันธุ์ TC 99 – 32 โดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง จำกัด เป็นพันธุ์ที่ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกตั้งแต่ปี 2548 ลักษณะต้นสูงประมาณ 1 – 2 เมตร สีเขียว มีไขหนาทั้งลำต้น ใต้ใบ และบนใบ (ไขสาม) อายุดอกแรกบาน 40 -45 วัน อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 105 วัน ช่อรูปกรวยยาวประมาณ 50- 90 เซนติเมตร ช่อแขนงออกห่างจากช่อแรก 105 วัน ช่อรูปกรวยยาวประมาณ 50 – 90 เซนติเมตร ช่อแขนงออกห่างจากช่อแรกประมาณ 15 – 20 วัน ผลแห้งไม่แตกร่วง เมล็ดมีขนาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ด 40 กรัม ผลผลิตเฉลี่ย 350 กิโลกรัม/ ไร่

2.4 เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์พืช

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี่เองที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ (สุรีพร, 2546)

การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ นั่นเอง สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุรีพร, 2546) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชมีหลายวิธี แต่วิธีที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อนและค่าใช้จ่ายต่ำ ได้แก่ เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD technique) หรือ เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (RAPD marker)

อาร์เอพีดี (RAPD) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า พีซีอาร์ (PCR) (William et al., 1990; Welsh และ McClean, 1990) พืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม หรือ "arbitrary primer" (ซึ่งหมายถึงส่วนรหัสเริ่มต้นดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบส) หากอาร์เอพีดีไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นของพืชที่นำมาตรวจสอบก็จะเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นใช้ arbitrary primer ไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอจากพืชที่ตรวจสอบได้หลายตำแหน่งโดยสุ่ม หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสม ก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ ดังนั้นถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือ เป็นคนละชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวก็จะแตกต่างกันทำให้ได้จำนวนและชิ้นของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จากความแตกต่างดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ (cultivar identification) ได้ (สุรีพร, 2546)

ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวาง เช่น งา (Ercan et al., 2004) ละหุ่ง (กิตติพัฒน์และคณะ 2543) ไผ่ (สุมิตและคณะ, 2548) Egyptiandate (Saker et

al., 1996) Hazelnut (Galderisi et al., 1999) และ เสาวรส (*Passiflora* spp.) (Crochemore et al., 2003) เป็นต้น

Ercan et al. (2004) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์งา 38 accessions ในประเทศตุรกี โดยใช้เทคนิค RAPD จากการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้งหมด 12 ไพรเมอร์ พบว่า มี 7 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยเฉลี่ยแล้วจะมีค่า polymorphic เฉลี่ยประมาณ 8.7 แถบต่อไพรเมอร์ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 200 bp ถึง 10 kb จากการศึกษา จะพบความผันแปรทางพันธุกรรมของ geographic region ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า population ของงาในแต่ละ region นั้น มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงมาก จากค่า Total genetic diversity พบว่า 8.1 % นั้นมาจาก ความแตกต่างระหว่างท้องถิ่น และ 91.9 % นั้น มาจาก ความแตกต่างระหว่างประชากร (populations) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า RAPD analysis สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม ตลอดจนใช้ในการคัดเลือก parent ในการปรับปรุงพันธุ์งาได้

กิตติพัฒน์และคณะ (2543) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของละหุ่งโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี โดยศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของละหุ่งพื้นบ้านไทย 4 พันธุ์ คือพันธุ์ลายดำสนิท พันธุ์หินอ่อนเทาแก่ พันธุ์ลายหลังเหลือง และพันธุ์ลายดำใหญ่ และละหุ่งที่ปรับปรุงใหม่โดยการนำพันธุ์มาจากต่างประเทศ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ TCO101 และพันธุ์ H22 จาก ไพรเมอร์ทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 13 ไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่งได้ 30 แถบเครื่องหมาย (polymorphic markers) จากแถบเครื่องหมายทั้งหมดจำนวน 94 แถบ ละหุ่งพันธุ์ TCO101, H22 และลายดำใหญ่มีแถบเครื่องหมาย RAPD จำเพาะ 4, 1 และ 1 แถบเครื่องหมาย ตามลำดับ แถบเครื่องหมายนี้สามารถใช้จำแนกพันธุ์ละหุ่งสามพันธุ์นี้ได้ จากการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) พบว่าละหุ่งพันธุ์ TCO101 มีพื้นฐานพันธุกรรมที่แตกต่างมากที่สุดจากละหุ่งพันธุ์อื่น ส่วนละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองทั้งสี่พันธุ์มีพื้นฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ

สุมิตและคณะ (2548) ได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกสายพันธุ์ไผ่จำนวน 13 ชนิด โดยใช้ 10 ไพรเมอร์ พบว่า มี 3 ไพรเมอร์ คือ EO2, AEO1 และ NO2 ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอและสามารถจำแนกพันธุ์ไผ่ทั้ง 13 ชนิดที่ทำการทดลองออกจากกันได้ ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้กับงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคตได้

Saker et al. (1996) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ 5 Egyptian data palm โดยใช้ RAPD (Random amplified polymorphic) ได้แก่ Samanie, Seaweae, Hyeane, Amhat และ Zaghlool จากการคัดเลือกไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ พบว่ามี 2 ไพรเมอร์ คือ OPC2 และ OPD16 ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ชัดเจน เทคนิค RAPD สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ถ้าไพรเมอร์ที่ใช้และความเข้มข้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีความเหมาะสม อาร์เอพีดีจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและเป็นเครื่องหมายชีวโมเลกุลอย่างง่ายในการจำแนกสายพันธุ์และความแตกต่างทางสายพันธุ์ได้

Galderisi et al. (1999) ได้ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของ harzelnut (*Corylus avellana*) จำนวน 6 สายพันธุ์ ในเขต Campania ทางตอนใต้ของประเทศอิตาลี โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าจากอาร์เอพีดี 20 ไพรเมอร์ มี 5 ไพรเมอร์คือ U2 U3 U4 U11 และ U14 เท่านั้นที่สามารถแยกความแตกต่างของ harzelnut ได้

Crochemore et al. (2003) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน เสาวรส (*Passiflora* spp.) จำนวน 70 accessions จาก 11 species ของ genus *Passifloras* โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์โดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์จำนวน 42 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 5 ไพรเมอร์ ที่แสดงความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสร้างเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี ได้จำนวน 136 เครื่องหมาย เมื่อนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า เสาวรสที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงทั้งระหว่างและภายใน species โดย *P. edulis* และ *P. edulis* f. *flavicarpa* ซึ่งมีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ มีการแยกกลุ่มกันอย่างชัดเจน ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ เสาวรสที่ใช้ในการศึกษาโดยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีสามารถใช้เป็นประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ได้ ซึ่งเทคนิคอาร์เอพีดีนี้เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และราคาไม่แพง

บทที่3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. วัสดุและอุปกรณ์ในเรือนทดลอง

- เมล็ดพันธุ์ละหุ่ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่
  - หมายเลข 1 คือ พันธุ์พื้นขาว ลายดำ
  - หมายเลข 2 คือ พันธุ์พื้นขาวครีม ลายน้ำตาลอ่อน
  - หมายเลข 3 คือ พันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว
  - หมายเลข 4 คือ พันธุ์พื้นดำน้ำตาลลายขาว
  - หมายเลข 5 คือ พันธุ์TCO208
  - หมายเลข 6 คือ ละหุ่งสายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2
  - หมายเลข 7 คือ พันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก
  - หมายเลข 8 คือ พันธุ์พื้นดำสนิทลายขาว และ
  - หมายเลข 9 คือ พันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (ตารางที่1)
- ถุงพลาสติกดำ
- วัสดุปลูก
- อุปกรณ์ในการให้น้ำ

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ได้แก่

- โกร่งบดตัวอย่าง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate centrifuge machine)
- ชุดดูดสารละลายอัตโนมัติ (micropipette)
- เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่างของสารละลาย (pH meter)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine: Perkin Elmer thermal cycler)
- กระติกน้ำแข็ง
- เครื่องอิเล็กโทรโฟริซีส
- ชุดถ่ายภาพเจลอะกาโรส
- pipette tip ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- เตาไมโครเวฟ (microwave oven)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- ไนโตรเจนเหลว
- สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0
- สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH8.0
- สารละลาย extraction buffer (2%CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 2% ß-mercaptoethanol
- Precipitation buffer (0.5% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0
- สารละลาย Chloroform-isoamyl alchohol
- สารละลาย Chloroform- Octanol
- polyvinylpyrrolidone (PVP-40)
- ß-mercaptoethanol
- Ethanol เข้มข้น 65, 70 และ 75 เปอร์เซ็นต์
- Isopropanol
- NaCl 5 โมลาร์
- สารละลาย High salt TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 M NaCl)
- สารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0)
- RNase A
- น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Gel Electrophoresis ได้แก่

- ผงอะกาโรส (agarose)
- สารละลาย TBE buffer
- สารละลาย Ethidium bromide เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์
- สารละลาย Loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% sucrose)
- สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) (Fermentas)

2.4 วัสดุที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR

- 0.2 ml PCR tube
- 0.2 ml tube strips
- Domed cab strips
- 96 well plate

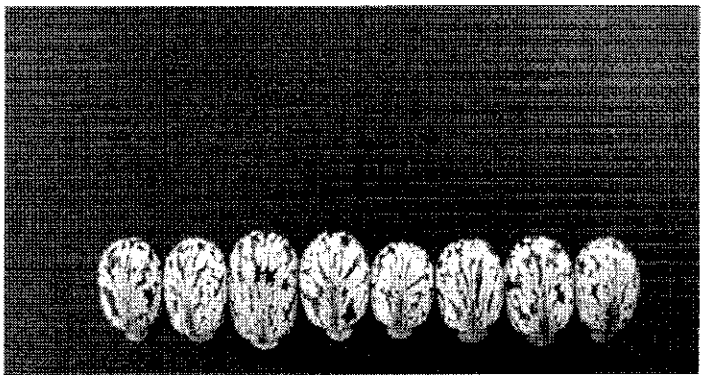
- 96-Plate PCR-Tube rack
- Pipette tip

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

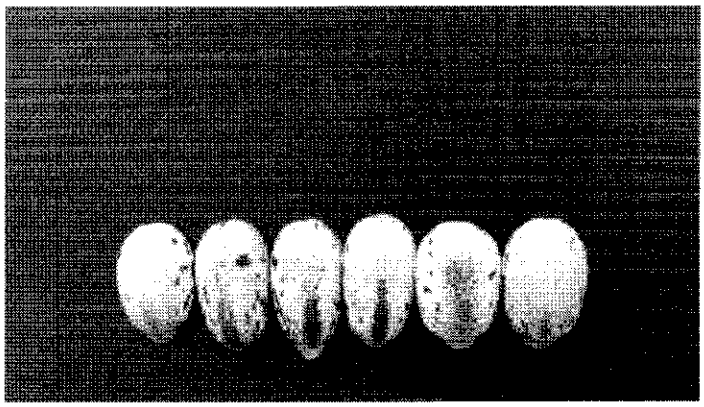
- DNA template
- 1x PCR buffer (Fermentas)
- dNTPs (Fermentas)
- Primer (Fermentas)
- $MgCl_2$ (Fermentas)
- *Taq* DNA polymerase (Fermentas)
- Water sterile (Amresco)

ตารางที่ 1 พันธุ์ละหุ่งที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

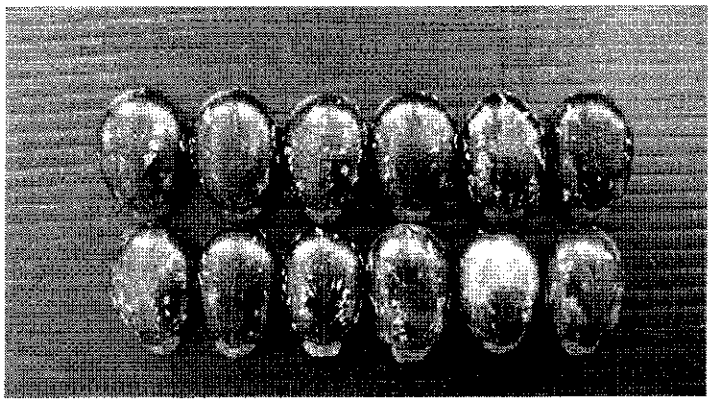
ชื่อพันธุ์	ประเภทพันธุ์	อายุการเก็บเกี่ยว	แหล่งที่มา
1. ละหุ่ง No. 1 พื้นขาว ลายดำ	พันธุ์พื้นเมือง (Landrace variety)	อายุยาว	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี
2. ละหุ่ง No. 2 พื้นขาวครีม ลายน้ำตาลอ่อน	พันธุ์พื้นเมือง (Landrace variety)	อายุยาว	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี
3. ละหุ่ง No. 3 พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว	พันธุ์พื้นเมือง (Landrace variety)	อายุยาว	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี
4. ละหุ่ง No. 4 พื้นดำน้ำตาล ลายขาว	พันธุ์พื้นเมือง (Landrace variety)	อายุยาว	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี
5. ละหุ่ง No. 5 ละหุ่งพันธุ์ TCO208	พันธุ์ปรับปรุง (Improved variety)	อายุปานกลาง	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี
6. ละหุ่ง No. 6 ละหุ่งสายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2	พันธุ์ปรับปรุง (Improved variety)	อายุสั้น	บริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง
7. ละหุ่ง No. 7 พื้นขาว ลายจุดน้ำตาลเล็ก	พันธุ์พื้นเมือง (Landrace variety)	อายุยาว	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี
8. ละหุ่ง No. 8 พื้นดำสนิท ลายขาว	พันธุ์พื้นเมือง (Landrace variety)	อายุยาว	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี
9. ละหุ่ง No. 9 พื้นขาว ลายน้ำตาลอ่อน	พันธุ์พื้นเมือง (Landrace variety)	อายุยาว	ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี



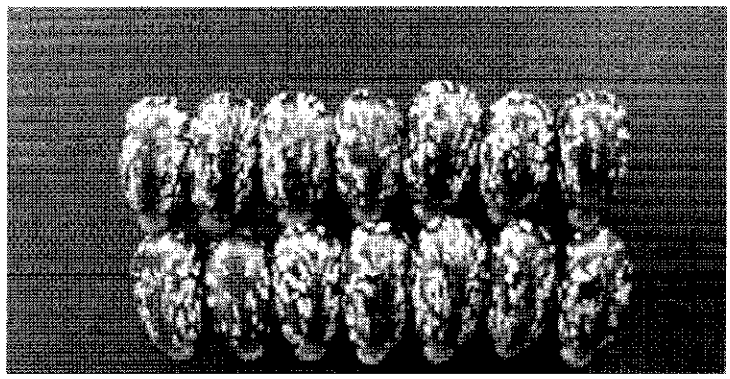
ภาพที่ 1 หมายเลข 1 คือ พันธุ์พื้นขาว ลายดำ



ภาพที่ 2 หมายเลข 2 คือ พันธุ์พื้นขาวครีม ลายน้ำตาลอ่อน

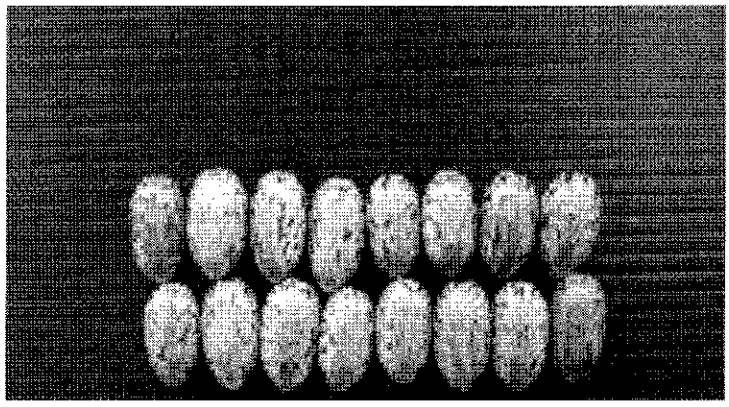


ภาพที่ 3 หมายเลข 3 คือ พันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว



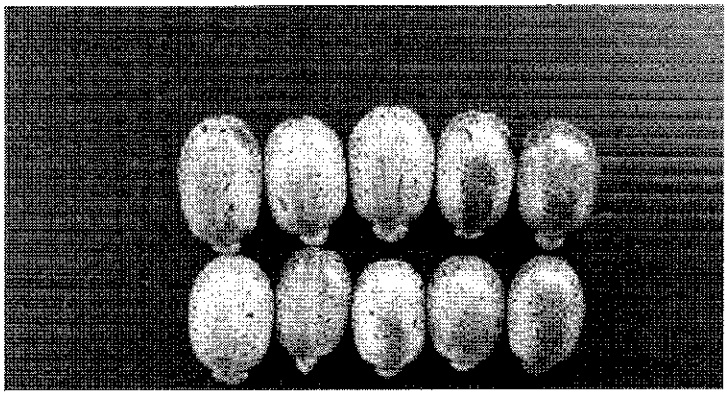
ภาพที่ 4 หมายเลข 4 คือ พันธุ์พื้นดำน้ำตาล ลายขาว

พช. 76541

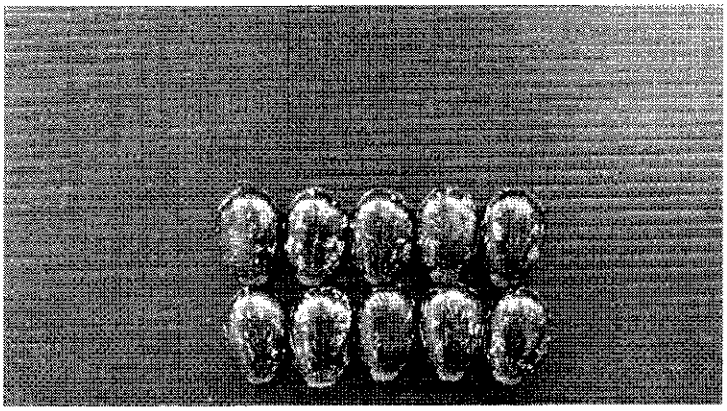


ภาพที่ 5 หมายเลข 5 คือ พันธุ์TCO208

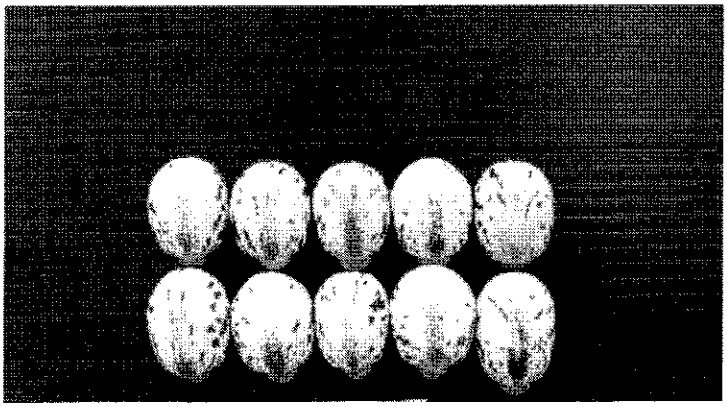
ภาพที่ 6 หมายเลข 6 คือ ละหุ่งสายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2



ภาพที่ 7 หมายเลข 7 คือ พันธุ์พื้นขาว ลายจุดน้ำตาลเล็ก



ภาพที่ 8 หมายเลข 8 คือ พันธุ์พื้นดำสนิท ลายขาว



ภาพที่ 9 หมายเลข 9 คือ พันธุ์พื้นขาว ลายน้ำตาลอ่อน

2. วิธีการทดลอง

การศึกษาวิจัย ประกอบด้วยการทดลองย่อย 3 การทดลองดังนี้

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม
2. การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RAPD- PCR
3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมละหุ่งโดยใช้เทคนิค RAPD

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม

เก็บใบอ่อนของละหุ่ง อายุประมาณ 3 สัปดาห์มาทดสอบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม โดยดำเนินการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี คือ

- วิธีที่ 1: 2% CTAB method (Rogers and Bendich, 1994)
- วิธีที่ 2: 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994)
- วิธีที่ 3: 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Webb and Knapp, 1990)

1.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 2% CTAB method (Rogers and Bendich, 1994)

1. นำตัวอย่างใบอ่อนที่บดละเอียดในไนโตรเจนเหลว 0.2 g ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 2 มิลลิลิตร
2. ทำให้เนื้อเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสภาพโดยเติมสารละลาย 2% CTAB buffer 750 µl ผสมให้สารละลายเข้าด้วยกัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส
3. แยกองค์ประกอบของโปรตีนและเศษเซลล์ออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยเติมสารละลาย Chloroform: Octanol (24: 1) 750 µl ผสมให้เข้ากันโดยวิธีพลิกหลอดเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบน ใส่หลอดใหม่
4. เติมสารละลาย 5 % CTAB solution 1/5 volume ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดเบาๆ แยกส่วนโปรตีน ที่เหลืออยู่ออกจากสารละลายดีเอ็นเอโดยเติม Chloroform: Octanol (24: 1) ผสมให้เข้ากันโดยวิธีพลิกหลอดเบาๆ นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่
5. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลาย CTAB precipitation buffer เท่ากับส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดเบาๆ บ่มสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง
6. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย High salt TE buffer 200 µl แล้วเติม Absolute ethanol ที่เย็นจัด นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง

7. ล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่ภายในหลอดโดยการเติม 75 % ethanol ที่เย็นจัด 500 µl นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง
8. ละลายตะกอนดีเอ็นเอและกำจัดอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนในสารละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 0.1 X TE buffer + 100 µg / ml RNase A 100 µl บ่มสารละลายอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
9. เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย Modified 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994)

1. เตรียมตัวอย่างใบอ่อนของละหุ่งประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น บดให้ละเอียด ถ่ายผงใบลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม CTAB extraction buffer 750 µl (2%CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl เติม 2% ß-mercaptoethanol) แล้วเติม polyvinylpyrrolidone (PVP-40) เล็กน้อยในหลอดเซนติฟิวส์ (ประมาณ 50 µl) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
3. เติม Chloroform: Octanol 750 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
4. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
5. ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 5 M NaCl ครึ่งหนึ่งของปริมาตรสารที่ดูดได้และเติม Isopropanol ปริมาตร 1 volume ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
6. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง
7. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ประมาณ 2 ครั้ง ตากดีเอ็นเอให้แห้ง
8. ละลายดีเอ็นเอในน้ำ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 3 คืน
9. เติม RNase A (10 mg/ml) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
10. เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

1.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 2 % CTAB method (Webb and Knapp, 1990)

1. เตรียมสารบัฟเฟอร์เพื่อสกัด (CTAB ละลายได้ง่ายขึ้นถ้าเติมสารก่อนช่วงแรก) ประกอบด้วย 2 % CTAB, 50 mM Tris-HCL pH 8.0, 0.7 M NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0 และ 1% 2-mercaptoethanol (เติมก่อนใช้ในตู้ดูดไอสาร)
2. บดใบอ่อนพืชน้ำหนักประมาณ 0.2 กรัม ลงในโกร่งเย็น เติมไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผง
3. เติมสารสกัดบัฟเฟอร์ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. วางบนภาชนะใส่หลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำตัวอย่างขึ้นมาจากอ่าง ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
5. เติม Chloroform: octanol (24:1) ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 4 นาทีหรือจนกว่าจะได้สารละลายอยู่ในรูปอิมัลชั่น
6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
7. ดูดส่วนใสด้านบน ใส่หลอดใหม่
8. เติมสารบัฟเฟอร์เพื่อตกตะกอน (จาก 0.5% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0)
9. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
10. เติม 1 M NaCl ปริมาตร 400 µl เพื่อละลายตะกอน ที่อุณหภูมิ 45-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-20 นาที หรือตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องตลอดคืน โดยไม่ต้องเขย่าเพื่อละลายตะกอน
11. เติมฟีนอลปริมาตร 700 µl ผสมให้เข้ากันอย่างดี
12. ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 4 นาที ที่ความเร็วเครื่องสูงสุด
13. ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่
14. เติม chloroform: octanol ผสมให้เข้ากันอย่างดี
15. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 4 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่
16. เติม Isopropanol ที่เย็นจัด 950 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือเก็บไว้นานข้ามคืน
17. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 4 นาที เทส่วนใสทิ้ง
18. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 65 % Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เทส่วนใสทิ้ง
19. เติม 85 % Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเทส่วนใสทิ้ง
20. ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง
21. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 300 ไมโครลิตร

การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

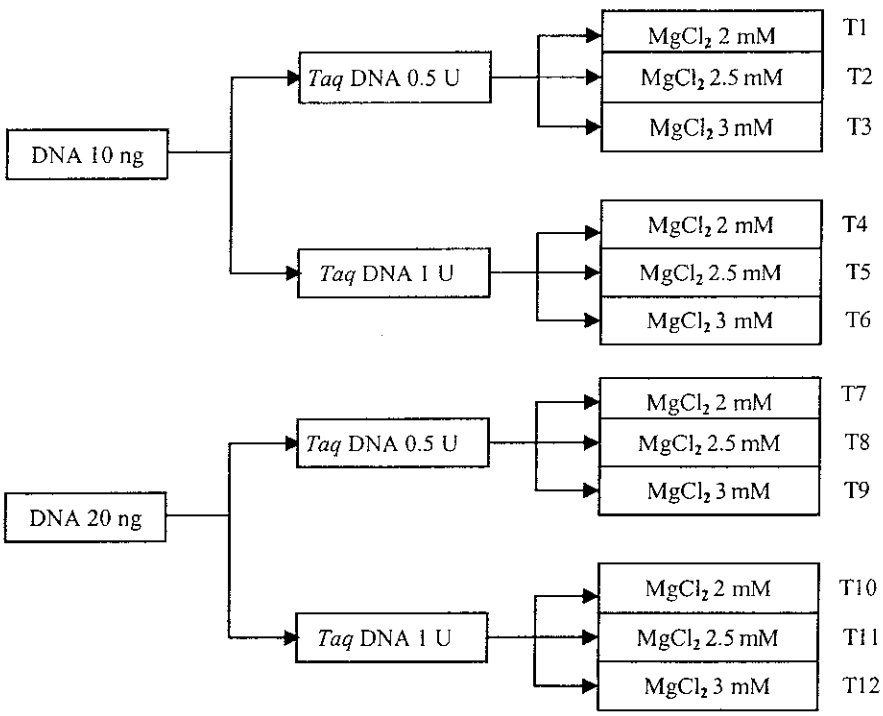
การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส (Agarose gel) 1.2 % โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายใต้แสง UV และภาพถ่ายโดยใช้เครื่อง Gel document

2. การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Optimization of RAPD-PCR)

นำดีเอ็นเอของละหุ่ง จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ India2x25-1-4-3-2, TCO208, และ No.7 (พันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก) มาเป็นตัวแทนในการศึกษาองค์ประกอบของสารละลายที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์จากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03 เป็นตัวเริ่มการเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบของละหุ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร กำหนดความเข้มข้นของ dNTPs และ ไพรเมอร์คงที่ คือ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และ 0.6 ไมโครโมลาร์ และกำหนดตัวแปรขององค์ประกอบสารละลายที่จะศึกษา 3 ตัวแปร ได้แก่

1. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 10 และ 20 นาโนกรัม
2. ความเข้มข้น *Taq* DNA polymerase (Fermentas) 2 ระดับ คือ 0.5 ยูนิต และ 1 ยูนิต
3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 2.5 และ 3 มิลลิโมลาร์

ดังนั้นสามารถกำหนดตำหรับการทดลอง (Treatment conditions) ได้ 12 ตำหรับการทดลอง (treatments) ดังแสดงในไดอะแกรม ภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงไดอะแกรมตำหรับการทดลอง (Treatment -T) ของการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 12 ตำหรับการทดลอง โดยใช้ไพรเมอร์OPA03 รายละเอียดของตำหรับการทดลอง 12 ตำหรับการทดลอง

T 1 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 0.5 U, $MgCl_2$ 2 mM

T 2 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 0.5 U, $MgCl_2$ 2.5 mM

T 3 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 0.5 U, $MgCl_2$ 3 mM

T 4 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 1 U, $MgCl_2$ 2 mM

T 5 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 1 U, $MgCl_2$ 2.5 mM

T 6 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 1 U, $MgCl_2$ 3 mM

T 7 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 0.5 U, $MgCl_2$ 2 mM

T 8 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 0.5 U, $MgCl_2$ 2.5 mM

T 9 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 0.5 U, $MgCl_2$ 3 mM

T 10 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 1 U, $MgCl_2$ 2 mM

T 11 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 1U, $MgCl_2$ 2.5 mM

T 12 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 1 U, $MgCl_2$ 3 mM

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมละหุ่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

3.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ หรือศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้น ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 110 ไพรเมอร์ โดยใช้องค์ประกอบที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, $MgCl_2$ เข้มข้น 3 mM, *Tag* DNA polymerase (Fermentas) เข้มข้น 1 unit, 1x PCR buffer, dNTPs 200 µM และ RAPD primer เข้มข้น 0.6 µM และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 ไมโครลิตร ซึ่งจะให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน

ดำเนินการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Perkin Elemer thermal cycler โปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มี ดังนี้

- Step 1: Denaturation: 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- Step 2: PCR cycle จำนวน 45 รอบ
  1. Denaturation: 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  2. Annealing: 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
  3. Extension: 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
- Step 3: Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

การตรวจสอบผลจากเทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีสบนแผ่นอะกาโรส 1.2 % โดยผสม PCR products กับ 6x loading dye เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder mix) โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลานานประมาณ 60 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจล โดยบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วย Gel document

3.2 การวิเคราะห์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่ง 9 สายพันธุ์ โดยใช้ RAPD primers ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ละหุ่งได้

บันทึกข้อมูลของแถบที่ดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่าง (Polymorphic bands) ระหว่างสายพันธุ์ละหุ่ง ซึ่งสามารถใช้เป็น RAPD markers ได้ในการการวิเคราะห์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่ง โดยบันทึกเป็น binary data โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" คือการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ "0" คือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่ง 9 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS version 2.2 โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Dice's Similarity coefficient) ของละหุ่ง แล้วทำ Cluster analysis เพื่อสร้าง Dendrogram โดยวิธี UPGMA –Unweighted pair group method based on arithmetic mean

สถานที่ดำเนินการทดลอง

ทำการทดลองที่โรงเรือนทดลอง สำนักงานไร่ฝึกทดลอง และ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยี ชีวภาพ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ระยะเวลาการทดลอง

การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2550 สิ้นสุดเดือน ธันวาคม 2551

บทที่ 4

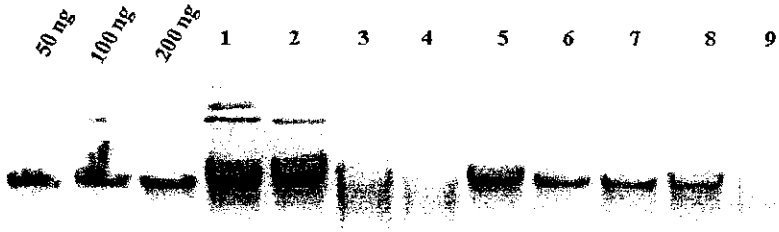
ผลการทดลอง

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่ง

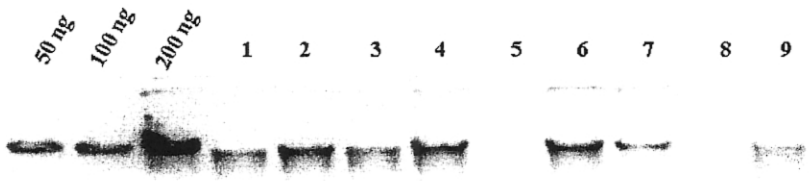
จากการทดสอบและเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธี 2% CTAB method (Rogers and Bendich, 1994) 2) วิธี Modified 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994) และ 3) วิธี 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Webb and Knapp, 1990) ประเมินความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส (Agarose gel) 1.2 % เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอน คือ 50, 100 และ 200 นาโนกรัม

ผลการทดลอง พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธี ให้ผลผลิตดีเอ็นเอแตกต่างกัน ดังนี้

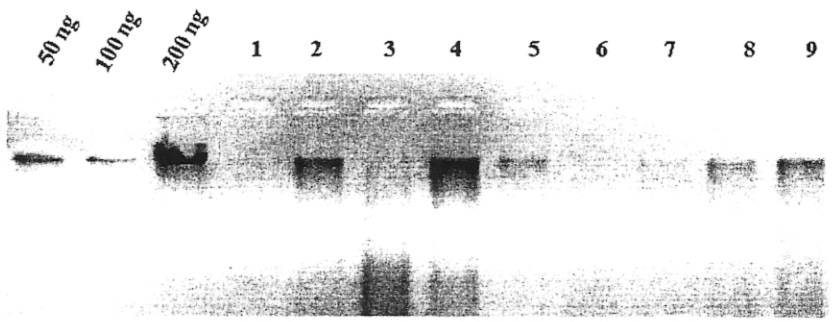
- วิธีที่ 1 ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด ดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 25-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเหลืองและเหนียวหนืด บ่งชี้ได้ว่าวิธีนี้มีปัญหาการเกิด oxidation และการเจือปนของสารโพลีแซคคาไรด์
- วิธีที่ 2 สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 10 – 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีสีเหลือง แสดงว่ามีปัญหาเกิดการ oxidation
- วิธีที่ 3 สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ใส และไม่เหนียวหนืด แต่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อยและสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 5– 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเมื่อเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอ วิธีที่ 1 และ วิธีที่ 2 (ภาพที่ 11-13)



ภาพที่ 11 แสดงปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่งได้จากวิธีที่1 - 2% CTAB method (Rogers and Bendich, 1994) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน, 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน)



ภาพที่ 12 แสดงปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่งได้จากวิธีที่2- Modified 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน, 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน)



ภาพที่ 13 แสดงปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่งได้จากวิธีที่3- 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Webb and Knapp, 1990) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน, 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน

2. การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ในละหุ่ง โดยใช้ RAPD primer OPA03 เป็นตัวเริ่มการเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบของละหุ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปัจจัยที่ศึกษามี 3 ปัจจัย ได้แก่ 1) ความเข้มข้นของ DNA template ที่ 2 ระดับ (10 ng และ20 ng) , 2) *Taq* DNA polymerase (Fermentas) 2 ระดับ คือ 0.5 ยูนิต และ 1 ยูนิต และ 3) ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่ 3 ระดับ (2 mM, 2.5 mM และ 3 mM) โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ dNTPs และ primer คงที่ คือ 200 uM และ 0.6 uM ตามลำดับ จากการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา RAPD – PCR ในตำหรับการทดลอง (treatments) ทั้งหมด 12 ตำหรับการทดลอง พบว่ามี 6 ตำหรับการทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ได้แก่ ตำหรับการทดลองที่ 1, 2 , 3 , 4 , 5 และ 6 (ภาพที่ 10)

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองซ้ำโดยใช้ RAPD primer OPA04 พบว่าตำหรับการทดลองที่ให้แถบดีเอ็นเอที่สม่ำเสมอและชัดเจนคือตำหรับการทดลองที่ 6 ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม, *Taq* DNA polymerase (Fermentas) 1 ยูนิต และ ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 3 mM (ตารางที่ 2) จะให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนทุกพันธุ์ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารละลายที่ใช้ในการทดลอง พบว่า ตำหรับการทดลองที่ 6 มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากใช้องค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์น้อย แต่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนแสดงว่าปริมาณองค์ประกอบของส่วนผสมต่างๆที่เหมาะสมนี้สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยา RAPD-PCR เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งโดยใช้ RAPD primer อื่นๆ ได้

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและความเข้มข้นของสารละลายที่จะใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ส่วนประกอบ (stock solution)	**ความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration)**	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**
1. DNA template (10 ng/ul)	10 ng	1
2. 10X buffer	1X	2
3. $MgCl_2$ (25 mM)	3 mM	2.4
4. dNTPs (2 mM)	200 uM	2
5. *Taq* DNA polymerase (5 U/ul)	1 U	0.2
6. Primer (20 uM)	0.6 uM	0.6
7. dH_2O		11.8
Total		20

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมละหุ่งโดยใช้เทคนิค RAPD

3.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งโดยใช้เทคนิค RAPD

- การใช้เทคนิค RAPD ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ละหุ่งเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ หรือศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้น สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว วิธีการตรวจสอบไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ต้นพืชมีขนาดเล็ก ไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ และสามารถทำการตรวจสอบได้ไม่จำกัด และค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ

- การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่ง 9 สายพันธุ์ โดยใช้ RAPD primer แบบสุ่มทั้งหมดจำนวน 110 ไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีองค์ประกอบของสารละลายพีซีอาร์ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม, *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต, ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 3 mM, 1x PCR buffer, dNTPs 200 µMและ RAPD primer เข้มข้น 0.6 µM และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 ไมโครลิตร พบว่ามี 65 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

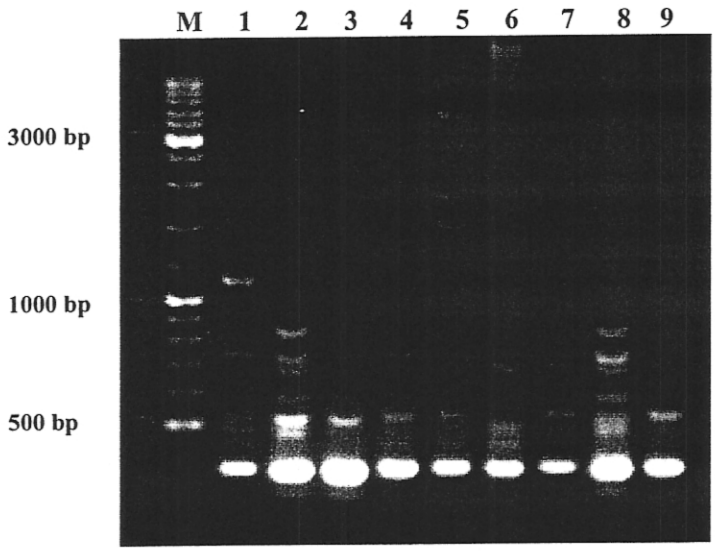
- จากอาร์เอพีดีไพรเมอร์จำนวน 65 ไพรเมอร์นี้ พบว่า มีไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอละหุ่งที่ชัดเจนครบทั้ง 9 พันธุ์ที่ศึกษา จำนวน 31 ไพรเมอร์ ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้มีค่า GC content ประมาณ 60-70 % (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตาม พบว่ามีไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็น RAPD markers แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ละหุ่งที่ศึกษา (polymorphic bands) ได้จำนวน 29 ไพรเมอร์ (ตารางที่3) ส่วนอีก 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ไพรเมอร์ OPC11 และOPJ13 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่สามารถแยกความแตกต่าง (monomorphic bands) ระหว่างพันธุ์ละหุ่งได้

- จากอาร์เอพีดีไพรเมอร์จำนวน 29 ไพรเมอร์ ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอละหุ่งที่ชัดเจน และสามารถใช้เป็น RAPD markers ได้นั้น พบว่า สามารถสร้าง RAPD markers ได้ทั้งหมด จำนวน 153 markers (ตารางที่ 3) ในแต่ละไพรเมอร์สามารถสร้าง RAPD markers ได้ตั้งแต่ 2-10 markers ซึ่งมีขนาด DNA fragments ตั้งแต่ 350-2500 bp โดยเฉลี่ย 5.3 markers ต่อไพรเมอร์ ดังภาพที่ 14 – 16 โดยไพรเมอร์ OPC20 (5'-ACTTCGCCAC-3')ให้ RAPD markers มากที่สุด คือ 10 markers มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ (marker size) ตั้งแต่ 400-2000 bp รองลงมา คือ ไพรเมอร์ OPA03 (5'-AGTCAGCCAC-3') และไพรเมอร์ OPD05 (5'-TGAGCGGACA-3') สามารถให้ RAPD markers 9 markers มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ (marker size) ตั้งแต่ 700-2000 bp และ 400-1100 bp ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

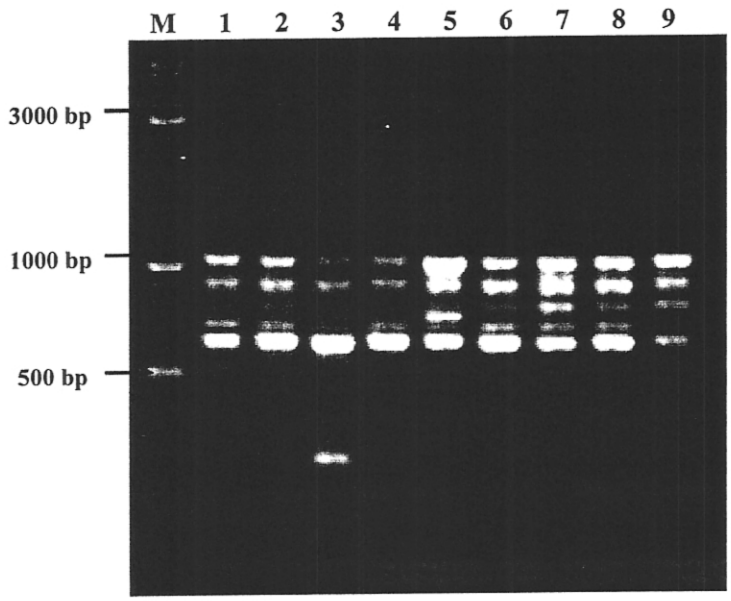
ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์อาร์เอพีดี (Operon Technology) ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่ง, จำนวน RAPD markers (polymorphic bands) ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (fragment length- bp) และ เปอร์เซ็นต์ GC content

Primer	Nucleotide sequence	Polymorphic bands	Fragment length (bp)	% GC content
OPA 03	5'-AGTCAGCCAC-3'	9	700-2000	60
OPA 04	5'-AATCGGGCTG3'	6	600-2000	60
OPA 05	5'-AGGGGTCTTG3'	5	900-1600	60
OPA 07	5'- GAAACGGGTG-3'	5	700-2500	60
OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'	7	700-2000	60
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	3	800-1500	70
OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'	5	800-2000	60
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'	5	500-2000	60
OPA 12	5'-TCGGCGATAG-3'	3	1200-2000	60
OPA13	5'-GTGCACCCAC-3'	2	1200-1500	70
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'	7	500-2000	60
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'	8	300-1500	60
OPC 02	5'-GTGAGGCGTC-3'	5	400-1500	70
OPC 05	5'-GATGACCGCC-3'	5	600-900	70
OPC 06	5'-GAACGGACTC-3'	5	400-2500	60
OPC 07	5'-GTCCCGACGA-3'	3	1000-1800	70
OPC 08	5'-TGGACCGGTG-3'	4	700-2000	70
OPC 20	5'-ACTTCGCCAC-3'	10	400-200	60
OPD 03	5'-GTCGCCGTCA-3'	4	800-1400	70
OPD 05	5'-TGAGCGGACA-3'	9	400-1100	60
OPD 08	5'-GTGTGCCCCA-3'	6	400-1500	70
OPD 10	5'-GGTCTACACC-3'	6	500-2000	60
OPD 11	5'-AGCGCCATTG-3'	4	500-800	60

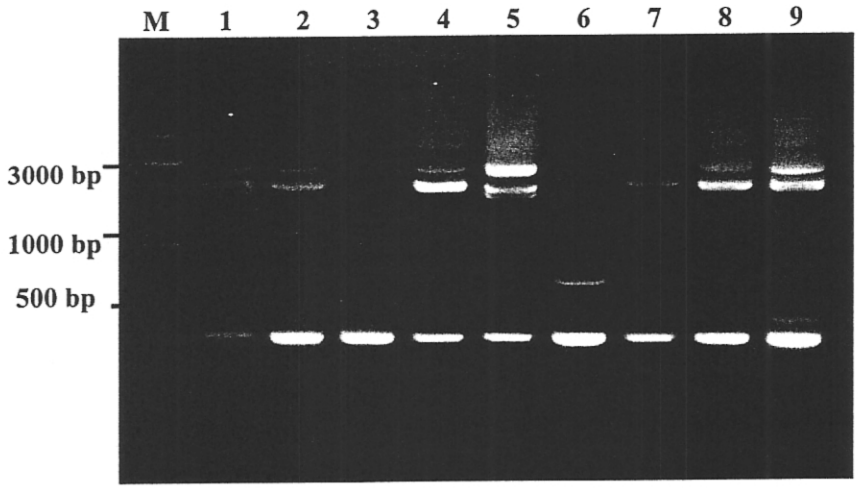
Primer	Nucleotide sequence	Polymorphic bands	Fragment length (bp)	% GC content
OPD 13	5'-GGGGTGACGA-3'	3	500-800	70
OPD 20	5'-ACCCGGTCAC-3'	5	500-1800	70
OPR 04	5'-CCCGTAGCAC-3'	4	600-1000	70
OPF 06	5'-GGGAATTCCC-3'	2	600-1000	60
OPF 13	5'-GGCTGCAGAA-3'	8	350-1500	60
OPU18	5'-GAGGTCCACA-3'	5	600-1400	60
	Total	153		



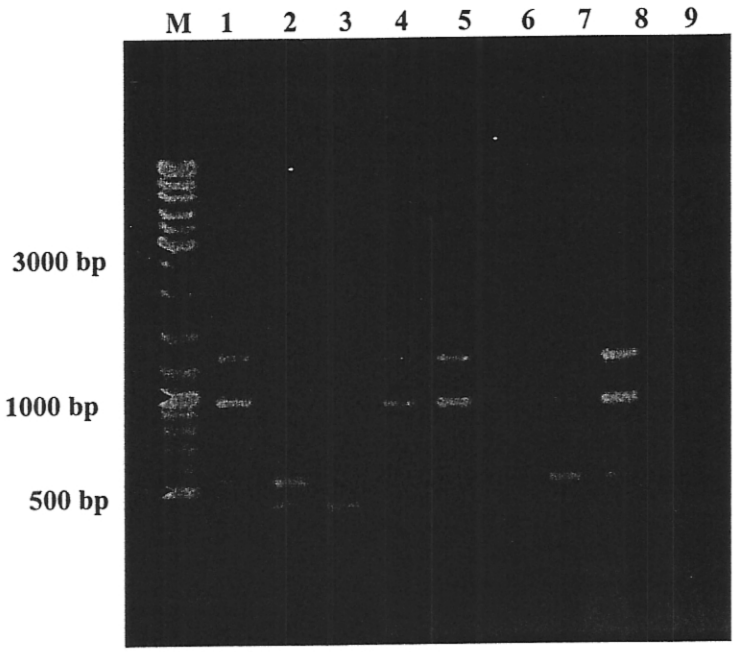
ภาพที่ 14 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC 20 (M = DNA ladder mix, 1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน, 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2 x 25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน



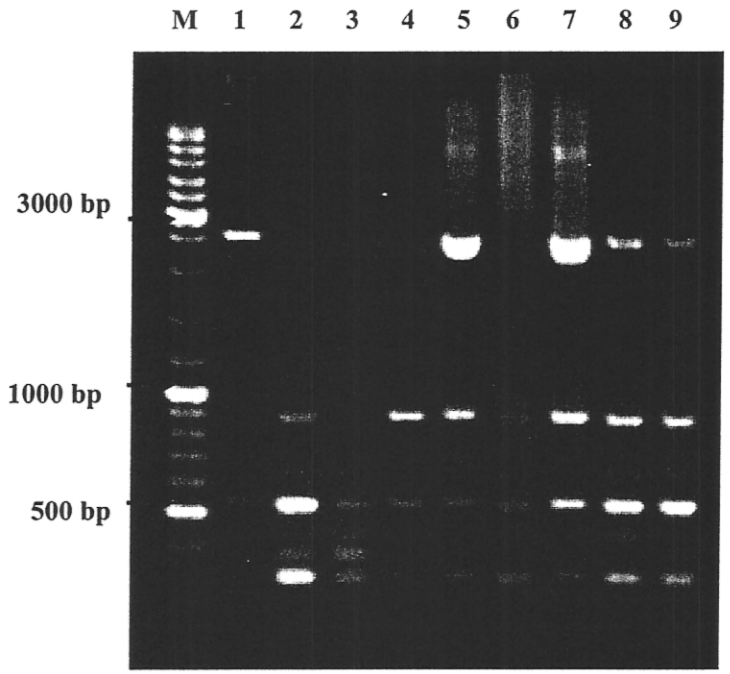
ภาพที่ 15 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPD 11 (M = DNA ladder mix (Fermentas), 1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน , 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน



ภาพที่ 16 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPD 20 (M = DNA ladder mix (Fermentas), 1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน , 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน



ภาพที่ 17 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPD 08 (M = DNA ladder mix (Fermentas), 1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน, 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน



ภาพที่ 18 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งได้จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC06 (M = DNA ladder mix (Fermentas), 1= พื้นขาวลายดำ, 2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน, 3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว, 4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, 5 = TCO208, 6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2, 7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, 8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, 9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน

3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (RAPD data analysis)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย RAPD- PCR พบว่ามีอาร์เอพีดีไพรเมอร์จำนวน 29 ไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของละหุ่งที่ศึกษาจำนวน 9 พันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถใช้เป็น RAPD markers ได้จำนวน 153 markers ดำเนินการบันทึกข้อมูลของแถบที่ดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่าง (Polymorphic bands) ระหว่างสายพันธุ์ละหุ่งทั้ง 9 พันธุ์ โดยบันทึกข้อมูลของแถบดีเอ็นเอเป็น binary dataโดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" คือการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ "0" คือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจาก RAPD marker เป็น Dominant marker ความแตกต่างระหว่างพันธุ์เป็นผลมาจากการสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์เกิดแถบดีเอ็นเอขึ้น กับการไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (ตารางที่ 4) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งที่ศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงการบันทึกข้อมูลแบบ data ของ RAPD markers จำนวน 153 markers ในละหุ่ง 9 สายพันธุ์ จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี จากอาร์เอพีดีไพรเมอร์ จำนวน 29 ไพรเมอร์

No.	Primer	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
1	OPA03-2000	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	OPA03-1800	1	0	0	1	1	0	0	1	1
3	OPA03-1600	0	0	0	0	1	0	0	1	0
4	OPA03-15000	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5	OPA03-1300	1	1	0	1	1	1	1	1	1
6	OPA03-1200	1	1	0	1	1	1	1	1	1
7	OPA03-900	1	0	1	1	1	0	1	1	1
8	OPA03-800	1	0	0	1	1	0	1	1	1
9	OPA03-700	0	1	1	0	1	1	1	1	1
10	OPA04-2000	1	0	0	1	1	1	0	0	0
11	OPA04-1700	0	0	0	0	1	1	0	1	0
12	OPA04-1400	1	0	0	1	1	0	0	0	0
13	OPA04-1100	1	1	0	0	1	0	0	1	0
14	OPA04-900	0	1	1	1	1	1	1	1	1
15	OPA04-600	0	1	1	1	1	1	1	1	1
16	OPA08-2000	0	0	0	0	1	-999	0	1	0
17	OPA08-1500	1	0	1	1	1	-999	0	1	1
18	OPA08-1400	0	0	0	1	1	-999	0	1	0
19	OPA08-1100	1	1	0	1	1	-999	1	1	1
20	OPA08-1000	0	1	0	1	1	-999	1	1	1
21	OPA08-800	1	1	1	1	1	-999	0	1	0

No.	Primer	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
22	OPA08-700	0	1	1	1	1	-999	1	1	1
23	OPA09-1500	1	0	0	1	1	0	0	1	1
24	OPA09-1200	1	1	0	1	1	1	1	1	1
25	OPA09-800	1	1	0	1	1	1	1	1	1
26	OPA10-2000	0	1	0	1	1	0	0	1	1
27	OPA10-1500	0	0	0	0	1	0	0	0	0
28	OPA10-1300	1	1	0	1	1	1	0	1	1
29	OPA10-1000	0	1	0	0	1	1	0	1	1
30	OPA10-800	0	1	1	1	1	1	1	1	1
31	OPA11-2000	0	0	0	0	1	0	0	0	0
32	OPA11-1300	0	0	0	1	1	0	1	1	1
33	OPA11-500	0	1	1	0	0	1	1	1	1
34	OPA11-900	1	1	1	1	0	1	1	1	1
35	OPA11-800	0	0	0	0	1	0	0	0	0
36	OPC20-2000	0	0	0	0	1	0	0	0	0
37	OPC20-1800	0	0	0	0	1	0	0	0	0
38	OPC20-1500	1	0	0	1	1	0	0	1	1
39	OPC20-1200	1	1	0	1	1	0	1	1	1
40	OPC20-800	1	1	0	1	1	1	1	1	1
41	OPC20-700	0	1	1	1	1	1	1	1	1
42	OPC20-600	1	1	1	1	1	0	0	1	1
43	OPC20-500	1	1	1	1	1	0	1	1	1
44	OPC20-450	1	1	0	1	1	1	1	1	1
45	OPC20-400	0	0	0	1	1	1	0	0	0
46	OPA07-2500	-999	0	0	1	1	0	0	1	1
47	OPA07-1000	-999	0	0	1	0	0	0	0	1
48	OPA07-900	-999	0	0	0	1	1	0	0	0
49	OPA07-800	-999	0	0	0	0	0	0	1	0
50	OPA07-700	-999	1	1	0	0	0	0	1	0
51	OPD20-1800	1	0	0	0	1	0	0	0	0
52	OPD20-1200	1	1	0	1	0	1	0	1	1
53	OPD20-800	0	0	0	0	0	1	0	0	0
54	OPD20-900	0	0	0	0	1	1	0	0	0
55	OPD20-500	0	1	0	0	1	1	0	1	1
56	OPF06-1000	0	0	0	0	1	0	0	0	0
57	OPF06-600	0	1	0	1		0	1	1	1
58	OPA05-2000	1	0	0	1	0	0	1	1	1

No.	Primer	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
59	OPA05-1600	1	1	0	1	1	0	1	1	1
60	OPA05-1100	1	1	0	1	1	1	1	1	1
61	OPA05-1000	1	0	0	0	0	1	0	1	1
62	OPA05-900	0	0	0	0	0	1	0	0	0
63	OPA19-3000	1	0	0	1	1	0	0	1	1
64	OPA19-2000	1	0	0	0	1	0	0	0	0
65	OPA19-1700	1	0	0	1	1	0	0	0	1
66	OPA19-1200	0	0	1	0	0	0	0	0	0
67	OPA19-1000	0	1	1	0	1	1	1	1	0
68	OPA19-950	1	1	0	1	1	1	1	1	1
69	OPA19-850	0	1	1	1	1	1	1	1	1
70	OPA19-800	0	0	1	0	0	0	0	0	0
71	OPD11-800	1	1	0	0	0	1	1	1	1
72	OPD11-750	0	0	0	0	1	0	0	1	0
73	OPD11-700	1	1	0	1	0	1	1	1	1
74	OPD11-500	1	1	0	1	0	1	1	1	1
75	OPR04-1400	1	0	1	1	1	0	0	1	0
76	OPR04-1000	0	0	1	0	0	0	0	0	0
77	OPR04-700	1	1	0	1	1	1	0	1	0
78	OPR04-600	0	1	1	0	0	0	0	0	1
79	OPA15-2000	1	0	0	0	1	0	0	0	0
80	OPA15-1200	0	0	0	0	0	0	1	0	0
81	OPA15-1000	1	1	0	1	1	1	1	1	1
82	OPA15-900	0	0	1	0	0	0	0	0	0
83	OPA15-700	0	0	1	0	0	0	0	0	0
84	OPA15-600	1	1	1	0	0	1	0	0	0
85	OPA15-500	0	1	1	0	0	1	1	1	1
86	OPU18-1400	0	0	0	0	1	0	0	0	0
87	OPU18-1300	1	0	0	1	1	0	0	1	1
88	OPU18-1200	1	0	0	1	1	0	0	1	0
89	OPU18-900	0	0	0	0	1	1	0	0	0
90	OPU18-600	1	1	0	0	0	1	0	1	1
91	OPA13-1500	1	1	0	1	1	0	0	1	1
92	OPA13-1200	1	1	0	0	1	0	0	1	1
93	OPC02-1500	0	0	0	0	1	0	1	0	0
94	OPC02-1200		0	0	0	1	1	1	1	1
95	OPC02-1100	0	0	0	0	0	0	1	0	1

No.	Primer	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
96	OPC02-900	1	1	0	1	1	1	1	1	1
97	OPC02-400	0	0	1	0	0	1	1	1	0
98	OPC05-900	1	1	0	1	1	1	1	1	1
99	OPC05-800	0	0	0	0	0	1	0	0	0
100	OPC05-750	0	0	1	1	1	0	0	0	0
101	OPC05-700	1	1	0	0	1	0	1	1	1
102	OPC05-600	1	1	0	1	1	1	1	1	1
103	OPC06-2500	1	0	0	0	1	0	1	1	1
104	OPC06-900	1	1	0	1	1	1	1	1	1
105	OPC06-650	0	1	0	0	0	0	0	1	0
106	OPC06-450	0	0	1	0	1	1	0	1	1
107	OPC06-400	1	1	1	0	0	1	1	1	1
108	OPA12-2000	0	0	0	1	1	0	0	0	0
109	OPA12-1600	1	1	0	1	1	1	1	1	1
110	OPA12-1200	0	1	0	1	1	0	1	1	1
111	OPC07-1800	0	1	0	0	1	-999	1	1	1
112	OPC07-1500	0	0	0	1	0	-999	1	1	1
113	OPC07-1000	0	0	1	0	0	-999	0	0	0
114	OPC08-2000	1	0	0	1	1	0	1	1	1
115	OPC08-1800	0	0	0	1	1	0	1	1	1
116	OPC08-1100	1	1	0	1	1	1	1	1	1
117	OPC08-700	0	0	1	0	0	0	0	0	0
118	OPD03-1400	-999	0	0	0	1	0	0	0	0
119	OPD03-1300	-999	1	0	0	0	0	1	1	0
120	OPD03-1200	-999	1	1	1	1	1	1	1	0
121	OPD03-800	-999	1	1	1	0	1	1	1	1
122	OPD08-1500	1	0	0	1	1	0	1	0	0
123	OPD08-1300	1	1	1	1	1	0	1	1	1
124	OPD08-1000	1	1	0	1	1	1	1	1	1
125	OPD08-900	1	0	0	1	1	0	1	1	1
126	OPD08-600	0	1	1	1	1	1	0	0	0
127	OPD08-400	0	0	0	0	0	1	0	0	0
128	OPD10-2000	0	0	0	1	1	0	1	1	0
129	OPD10-1800	0	0	0	0	1	0	0	0	0
130	OPD10-1100	0	0	0	0	0	0	1	0	0
131	OPD10-1000	0	0	0	0	0	0	1	1	1
132	OPD10-700	1	1	0	1	1	0	1	1	1

No.	Primer	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
133	OPD10-500	0	0	0	1	1	1	1	1	0
134	OPD13-800	1	0	0	0	0	0	0	0	0
135	OPD13-700	0	1	0	0	1	1	1	1	1
136	OPD13-500	0	1	0	0	0	0	0	0	0
137	OPF13-1500	1	1	1	1	1	0	1	1	1
138	OPF13-1200	0	1	1	1	1	0	1	1	1
139	OPF13-1100	0	1	1	1	1	0	1	1	1
140	OPF13-1000	0	1	0	1	1	1	1	1	1
141	OPF13-600	0	1	0	1	1	1	1	1	1
142	OPF13-450	0	1	1	1	0	1	1	1	1
143	OPF13-400	0	0	1	0	0	0	0	0	0
144	OPF13-350	0	1	0	1	0	1	1	1	1
145	OPD05-1100	1	1	0	1	1	1	0	0	1
146	OPD05-1000	0	0	1	0	0	0	1	1	0
147	OPD05-900	1	1	0	1	1	0	1	1	1
148	OPD05-800	0	0	0	0	0	0	1	1	1
149	OPD05-750	1	1	1	1	1	0	1	1	1
150	OPD05-700	0	0	0	0	0	1	0	0	0
151	OPD05-600	1	1	1	1	1	0	1	1	1
152	OPD05-500	1	1	0	1	1	0	1	1	1
153	OPD05-400	0	1	0	1	0	0	0	0	0

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic Similarity coefficient)

จากข้อมูล data จาก polymorphic bands ของละหุ่ง 9 พันธุ์ นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่ง 9 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS version 2.2 (Rohlf 2004) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Dice's similarity coefficient) เพื่อประเมินความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (ตารางที่ 5)

ละหุ่งที่นำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจำนวน 9 พันธุ์นั้น (ตารางที่ 1) ประกอบด้วยพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 7 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นขาวลายดำ (No.1), พันธุ์พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน (No.2), พันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว (No.3), พันธุ์พื้นดำน้ำตาล ลายขาว (No.4), พันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก (No.7), พันธุ์พื้นดำสนิท ลายขาว , (No.8), และพันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (No.9) ละหุ่งพื้นเมืองเหล่านี้เป็นพันธุ์อายุยาว หรือประเภทข้ามปี (Perennial type) จัดเป็นไม้ยืนต้นอายุยาว 2-3 ปี ต้นสูง 2-3 เมตรขึ้นไป ทรงพุ่มใหญ่ ผลแตกเมื่อแก่ เมล็ดใหญ่ และผลผลิตไม่สูงมากนัก ส่วนสายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6) นั้นเป็นสายพันธุ์ก้าวหน้าของกรมวิชาการเกษตรที่ปรับปรุงโดยศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์จากอินเดียและพันธุ์พื้นเมือง และมีการคัดเลือกจนได้เป็นสายพันธุ์ดี (Elite line) และพันธุ์ทีซีโอ208 (No.5) นั้นจัดเป็นละหุ่งพันธุ์อายุสั้นหรือประเภทล้มลุก (Annual type) เป็นพันธุ์ที่สกัดได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ TCO 101 กับพันธุ์ TC 99-32 โดยบริษัทสยามน้ำมันละหุ่ง จำกัด เป็นพันธุ์ที่ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกตั้งแต่ปี 2548 ลักษณะต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร สีเขียว มีไขหนาทั้งลำต้น ใต้ใบ และบนใบ (ไขสาม) อายุดอกแรกบาน 40-45 วัน อายุเก็บเกี่ยวช่อแรก 105 วัน ช่อรูปกรวยยาวประมาณ 50-90 ซม. ช่อแขนงออกห่างจากช่อแรกประมาณ 15-20 วัน ผลแห้งไม่แตกร่วง เมล็ดมีขนาดปานกลาง น้ำหนัก 100 เมล็ด 40 กรัม ผลผลิตเฉลี่ย 350 กก./ไร่

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของละหุ่งที่นำมาศึกษา 9 พันธุ์ พบว่าละหุ่งพื้นเมืองพันธุ์พื้นดำสนิท ลายขาว (No.8) กับพันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (No.9) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.870 (ตารางที่ 5) รองลงมาคือ ละหุ่งพื้นเมืองพันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก (No. 7) ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม กับพันธุ์พื้นดำสนิท ลายขาว (No.8) และพันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (No.9) เท่ากัน คือ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.802 ในขณะที่ละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองพื้นขาวลายดำ (No.1) และพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว (No. 3) มีความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.243 (ตารางที่ 5)

สำหรับละหุ่งพันธุ์ทีซีโอ 208 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกนั้น จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์พื้นดำน้ำตาล ลายขาว (No.4) มากที่สุด คือ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.760 แต่มีความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมค่อนข้างน้อยกับพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว (No.3) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.320 เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ทีซีโอ 208 กับพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ ที่เหลืออยู่ในกลุ่ม พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คืออยู่ระหว่าง 0.616 (ระหว่างพันธุ์ทีซีโอ208 กับละหุ่งพื้นเมืองพันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก (No. 7)) ไปจนถึง 0.694 (ระหว่างพันธุ์ทีซีโอ 208 กับละหุ่งพื้นเมืองพื้นขาวลายดำ (No.1)) แต่เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ทีซีโอ 208 กับสายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6) พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.543 ซึ่งถือว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ ที่นำมาศึกษา ยกเว้นพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว (No.3) เท่านั้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Dice's similarity coefficient) ของละหุ่ง 9 สายพันธุ์

	No1	No2	No3	No4	No5	No6	No7	No8	No9
No1	1.000								
No2	0.629	1.000							
No3	0.243	0.467	1.000						
No4	0.730	0.704	0.375	1.000					
No5	0.659	0.620	0.320	0.760	1.000				
No6	0.472	0.687	0.356	0.543	0.522	1.000			
No7	0.563	0.735	0.413	0.712	0.616	0.593	1.000		
No8	0.691	0.785	0.422	0.783	0.758	0.624	0.802	1.000	
No9	0.706	0.783	0.379	0.793	0.694	0.607	0.802	0.870	1.000

หมายเหตุ No.1 = พันธุ์พื้นขาวลายดำ,
No.2 = พันธุ์พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน,
No.3 = พันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว,
No.4 = พันธุ์พื้นดำน้ำตาล ลายขาว,
No.5 = พันธุ์ทีซีโอ208 (TCO208),
No.6 = สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2,
No.7 = พันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก,
No.8 = พันธุ์พื้นดำสนิท ลายขาว,
No.9 = พันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Cluster analysis)

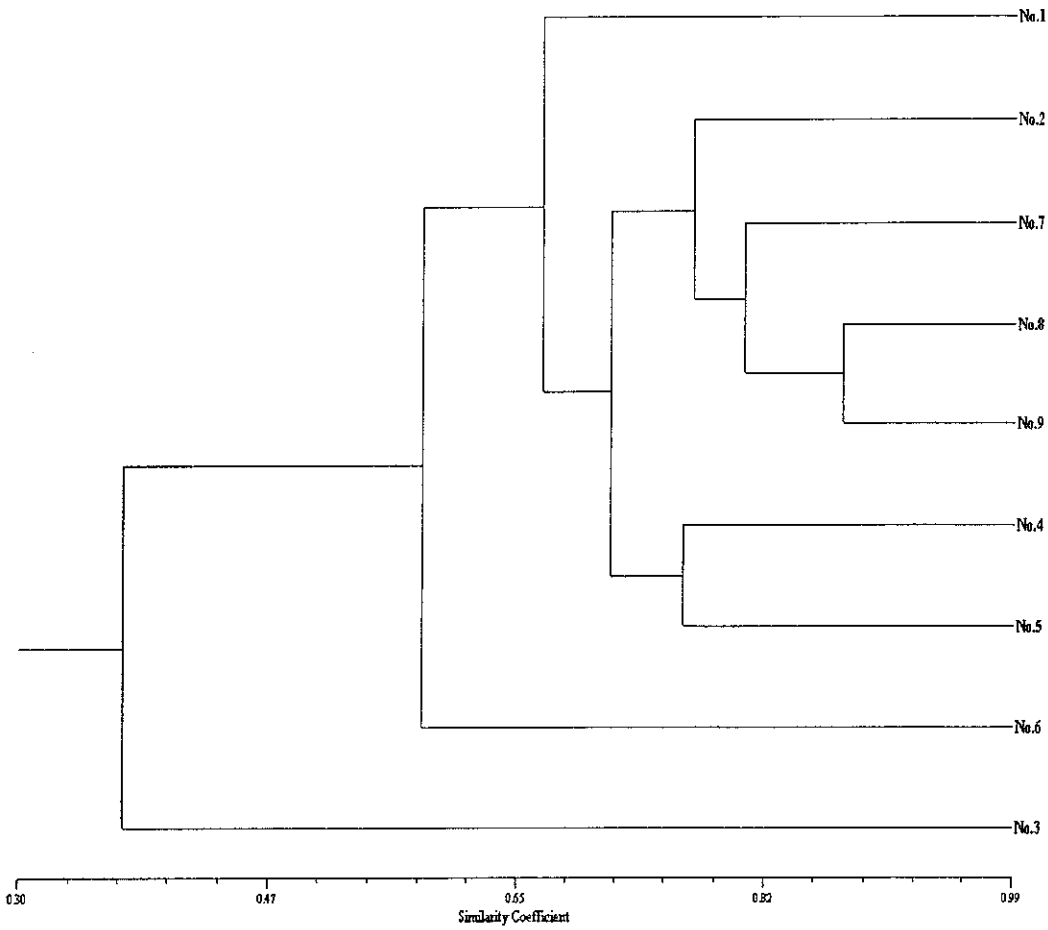
การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Cluster analysis) ของพันธุ์ละหุ่งที่ศึกษาจำนวน 9 พันธุ์ ได้มาจากการนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic similarity coefficient) มาคำนวณโดยวิธี UPGMA (Unweighted pair group method based on arithmetic mean) ผลของการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมสามารถแสดงในรูปของ phylogenetic tree

จากการวิเคราะห์ UPGMA สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของละหุ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ (cluster) ดังแสดงในภาพที่ 19

กลุ่มที่ 1 (Cluster I) ประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน (No.2), พันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก (No.7), พันธุ์พื้นดำสนิทลายขาว (No.8) และพันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (No.9) โดยที่พันธุ์พื้นดำสนิทลายขาว (No.8) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับพันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (No.9) มากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.870 และละหุ่งสองพันธุ์นี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก (No.7) และ พันธุ์พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน (No.2) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.802 และ ประมาณ 0.785 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์บ่งชี้ว่าละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ

กลุ่มที่ 2 (Cluster II) ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นดำน้ำตาล ลายขาว (No.4), และพันธุ์ทีซีโอ208 (No.5) ซึ่งพันธุ์ทีซีโอ208 เป็นพันธุ์ที่ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกตั้งแต่ปี 2548 และมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์พื้นดำน้ำตาล ลายขาว (No.4) มากที่สุด คือ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.760

อย่างไรก็ตาม จากผลการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis บ่งชี้ว่า ละหุ่งพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว (No. 3), สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6) และ ละหุ่งพันธุ์พื้นขาวลายดำ (No.1) มีพันธุกรรมแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ และไม่สามารถจัดรวมเข้ากลุ่มใดได้ โดยเฉพาะละหุ่งพื้นเมืองพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว (No. 3) นั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากละหุ่งพันธุ์อื่นๆ ที่ศึกษา โดยที่ละหุ่งพันธุ์นี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมกับละหุ่งพันธุ์อื่นๆ ค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 5) เช่น 0.243 (ละหุ่งพันธุ์พื้นขาวลายดำ (No.1)), 0.320 (พันธุ์ทีซีโอ208 (No.5)) และ 0.356 (สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6)) เป็นต้น ซึ่งบ่งชี้ว่าละหุ่งพื้นเมืองพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว (No. 3) มีฐานพันธุกรรมแตกต่างจากละหุ่งพันธุ์อื่นๆ ที่ศึกษา ส่วนสายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6) เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์จากอินเดียและพันธุ์พื้นเมืองโดยศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี และมีการคัดเลือกจนได้เป็นสายพันธุ์ก้าวหน้า (elite line) ดังนั้นจึงมีความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่างกลางค่อนไปทางใกล้ชิดกับกลุ่มพันธุ์พื้นเมือง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมกับพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ ตั้งแต่ 0.356-0.624 (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 19 Dendrogram of 9 castor genotypes developed from RAPD data using unweighted pair grouping of arithmetic means (UPGMA).
(No.1= พื้นขาวลายดำ, No.2 = พื้นขาวครีมลายน้ำตาลอ่อน, No.3 = พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว, No.4 = พื้นดำน้ำตาล ลายขาว, No.5 = TCO208, No.6 = สายพันธุ์ India2 x 25-1-4-3-2, No.7 = พื้นขาวลายจุดน้ำตาลเล็ก, No.8 = พื้นดำสนิท ลายขาว, No.9 = พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่ง

เทคนิคทางชีวโมเลกุลจำเป็นต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและบริสุทธิ์ การใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมีผลทำให้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันได้ เนื่องจากความสามารถในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์จะแปรเปลี่ยนไปถ้ามีองค์ประกอบอื่นปนเปื้อนมากับดีเอ็นเอ ทำให้การแปรผลในเทคนิคอาร์เอพีดีผิดพลาดได้ (Weeden et al., 1992) ปัญหาส่วนใหญ่ที่พบมากในการสกัดดีเอ็นเอ โดยทั่วไป คือ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มักมีลักษณะเหนียวหนืด คล้ายกาว เป็นผลมาจากการปนเปื้อนของสาร polyphenols และ polysaccharides ซึ่งจะมีผลต่อความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (Fang et al., 1992)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธี ของละหุ่ง พบว่า

- วิธี 2% CTAB method (Rogers and Bendich, 1994) สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเหลืองและเหนียวหนืด บ่งชี้ได้ว่าวิธีนี้มีปัญหาการเกิด oxidation และการเจือปนของสารโพลีแซคคาไรด์
- วิธี Modified 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994) สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีสีเหลือง แสดงว่ามีปัญหาเกิดการ oxidation
- วิธี 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Webb and Knapp, 1990) สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ใส และไม่เหนียวหนืด แต่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อย แสดงว่าวิธีนี้ไม่มีการเจือปนของสารโพลีฟีนอล และพวกโพลีแซคคาไรด์ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอและการศึกษาระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ของละหุ่ง

การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์

วัตถุประสงค์ของการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในละหุ่ง คือเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (Reproducibility) และความสามารถในการแยกความแตกต่างของเทคนิค RAPD โดยทั่วไป การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี มีข้อจำกัด คือปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่ low stringency ทำให้มีโอกาสเกิดความผิดพลาดของการเข้าคู่ระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอเป้าหมายได้ พารามิเตอร์ที่สำคัญที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ temperature profile, brand of DNA polymerase, ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งปัจจัยทั้งหลาย

เหล่านี้มีผลต่อการทำซ้ำ (Reproducibility) (Goh et.al., 2005) อย่างไรก็ตาม RAPD-PCRเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์เทคนิคหนึ่งที่ใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจาก เป็นเทคนิคที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายไม่แพงมาก และที่สำคัญ ไม่จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลเฉพาะของ primer sequences

ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ละหุ่ง เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ละหุ่ง หรือศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีก่อน ทั้งนี้เพื่อให้ได้องค์ประกอบของสารละลายที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในการศึกษาองค์ประกอบของสารละลายที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ละหุ่งในงานวิจัยนี้ มีการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมของดีเอ็นเอต้นแบบ, ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และ *Taq* DNA polymerase ต่อปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ dNTPs, primer และ 1x PCR buffer คงที่ คือ 200 μM, 0.6 μM และ 1x PCR buffer ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, $MgCl_2$ เข้มข้น 3 mM และ *Taq* DNA polymerase (fermentas) เข้มข้น 1 unit นั้น เป็นระดับสารละลายที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด

คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีจะต้องการปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การใช้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และสามารถแยกความแตกต่างได้ง่าย ในการทดลองนี้จึงใช้การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Webb and Knapp, 1990) ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่สม่ำเสมอ ชัดเจน และแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้

แมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) จัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวเอง หรือ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยพบว่ามีผลต่อคุณภาพของ RAPD profiles หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั่นเอง (Munthaly et al., 1992) แมกนีเซียมอิออนทำหน้าที่เป็น Co-factor ของเอนไซม์ *Taq* polymerase และเป็นที่ทราบกันว่าแมกนีเซียมอิออนจะมีผลต่อ primer annealing, template denaturation, enzyme activity and fidelity และ การสร้าง primer-dimer artefacts (Saiki, 1988). โดยทั่วไปพบว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนจะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific DNA amplification) แต่ถ้าหากปริมาณแมกนีเซียมอิออนน้อยเกินไปก็จะทำให้ amplification products ลดลง (Williams et al., 1993). มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ RAPD-PCR reaction พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนที่ใช้ใน PCR reactions นั้นจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 1- 8 mM ซึ่งเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 3.0 mM นั้นเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของละหุ่ง

Taq polymerase เป็นเอนไซม์ที่ใช้กันทั่วไปในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา RAPD-PCR ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Taq* polymerase สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีในช่วงดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ มีขนาดต่ำกว่า 2000 bp (shorter amplicon formation) และจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้น้อยในช่วงขนาดดีเอ็นเอมากกว่า 4000 -5000 bp ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่รายงานว่า เอนไซม์ *Taq* polymerase จะมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อความยาวของดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่า 5-6 kb (Barnes, 1994) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของ เอนไซม์ *Taq* polymerase พบว่ามีผลต่อ reproducibility of RAPD patterns ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ *Taq* polymerase จนถึง 2 ยูนิต หลังจากนั้นแล้วการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* polymerase พบว่าไม่มีผลต่อ amplification profile ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นของ เอนไซม์ *Taq* polymerase 1 ยูนิตนั้นเพียงพอที่จะสร้างแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนของละหุ่ง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมละหุ่งโดยใช้เทคนิค RAPD

เทคนิคอาร์เอพีดีซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช เนื่องจาก เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างน้อย ซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม (Welsh and McClelland, 1990; William et. al., 1990) สามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ต้นพืชมีขนาดเล็ก ไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ และสามารถทำการตรวจสอบได้ไม่จำกัด และค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ ดังนั้นเทคนิคอาร์เอพีดีจึงเป็นเทคนิคที่มีการนำไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืช และศึกษาความสัมพันธ์ หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชต่างๆ มากมาย เช่น งา (Ercan et. al., 2004) ถั่วเหลือง (Chowdhury et al., 2002) ข้าว (Raghunathachari et. al., 2000) ปาล์มน้ำมัน (สายชล และคณะ, 2548) พริก (ธีระชัย และ นฤมล, 2543) และกล้วยไม้ (Chung et.al., 2006) เป็นต้น

จากการทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของความเป็นไปได้ในการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของละหุ่ง 9 สายพันธุ์ โดยใช้ PCR condition ที่ได้จากการศึกษาแล้วว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน (ตารางที่ 2) จากจำนวนไพรเมอร์ที่ศึกษา 110 ไพรเมอร์ พบว่า มี 29 ไพรเมอร์ ที่ให้ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ละหุ่งที่ชัดเจนและมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ(Polymorphism) หรือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นรูปแบบเฉพาะในแต่ละพันธุ์ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอได้ โดยมีชื่อเรียกเฉพาะว่า "RAPD marker" จากการศึกษานี้ พบว่าได้จำนวน RAPD markers จำนวน 153 markers สำหรับใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่ง

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของละหุ่งที่ศึกษาจำนวน 9 พันธุ์ (ตารางที่ 1) สามารถจัดกลุ่มพันธุกรรมได้สองกลุ่ม (ภาพที่ 19) ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม ตั้งแต่ 0.735 - 0.870 (ตารางที่ 5) โดยที่พันธุ์พื้นดำสนิทลายขาว (No.8) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับพันธุ์พื้นขาวลายน้ำตาลอ่อน (No.9) มากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.870 จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งที่ศึกษา บ่งชี้ว่าละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้ปลูกนั้นมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ โดยพันธุ์ดังกล่าวมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากมีการคัดเลือกโดยเกษตรกรผู้ปลูกจากฐานพันธุกรรมเดียวกัน และมีการปลูกและเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้เอง ซึ่งละหุ่งพื้นเมืองส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ผสมเปิด ดังนั้นจึงทำให้ละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองดังกล่าวมีฐานพันธุกรรมใกล้ชิดกัน และผลการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis บ่งชี้ว่าละหุ่งพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อนลายจุดขาว (No.3), สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6) และ ละหุ่งพันธุ์พื้นขาวลายดำ (No.1) มีพันธุกรรมแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ และไม่สามารถจัดเข้ารวมเข้ากลุ่มใดได้ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ละหุ่งที่นำมาศึกษานี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเป็นค่าที่บ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หากพันธุ์ที่นำมาศึกษามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 1 แสดงว่าพันธุ์ที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบเป็นพันธุ์เดียวกัน ถ้าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของพันธุ์ที่ศึกษามีค่า เท่ากับ 0 แสดงว่าพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างสิ้นเชิง สายพันธุ์ India2x25-1-4-3-2 (No.6) เป็นสายพันธุ์ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมมาจากประเทศอินเดียมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจากละหุ่งทั้งสองกลุ่ม และพันธุ์พื้นดำน้ำตาลอ่อน ลายจุดขาว (No.3) ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในเกณฑ์ต่ำและแตกต่างจากกลุ่มอย่างเห็นได้ชัดเจน แสดงให้เห็นได้ว่าทั้งสองสายพันธุ์นี้มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่กว้างและมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

จากการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ กิตติพัฒน์ และคณะ (2543) ที่ใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีในการศึกษาพื้นฐานพันธุกรรมของละหุ่งไทย โดยศึกษาในละหุ่งพื้นเมือง จำนวน 4 พันธุ์ (ได้แก่ พันธุ์ลายดำสนิท พันธุ์หินอ่อนเทาแก่ พันธุ์ลายหลังเหลือง และพันธุ์ลายดำใหญ่) และ พันธุ์ปรับปรุง จำนวน 2 พันธุ์ (ได้แก่ พันธุ์ทีซีโอ 101 และ พันธุ์ H22) จากการใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 40 ไพรเมอร์ พบว่า 13 ไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ละหุ่งได้ 30 เครื่องหมาย (RAPD markers) ซึ่งเมื่อนำข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์นั้นไปศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของละหุ่ง พบว่าพันธุ์ละหุ่งที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลางถึงต่ำ

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมของละหุ่งคือ วิธี2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Webb and Knapp, 1990) ดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 5– 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและคุณภาพดี และเหมาะที่จะนำไปใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์

องค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ของละหุ่งที่ให้แถบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน คือระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, $MgCl_2$ เข้มข้น 3 mM และ *Taq* DNA polymerase (fermentas) เข้มข้น 1 unitในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีความเข้มข้นของ dNTPs และ RAPD primer คงที่ คือ 200 µM และ 0.6 µM ตามลำดับ ส่วน PCR profile ที่ใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอนั้น มีดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Extension ที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 45 รอบ และสุดท้าย Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ละหุ่ง 9 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer จำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่า 29 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างและชัดเจน (polymorphic bands) สามารถนำมาใช้เป็น RAPD markers ในการจำแนกสายพันธุ์ละหุ่งและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่งได้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ได้ RAPD markers จำนวน 153 markers และจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของละหุ่ง 9 สายพันธุ์โดยใช้ RAPD markers จำนวน 153 markers พบว่าละหุ่งที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง อย่างไรก็ตามพบว่าละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบแสดงว่าละหุ่งพันธุ์ดังกล่าวมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

เอกสารอ้างอิง

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ ภัทรพร คุ้มภัย และสุวิมล ไหลรัตน. 2543. การศึกษาพื้นฐานพันธุกรรมของละหุ่งพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) ปีที่ 8 ฉบับที่ 2. หน้า 1-7.

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2543. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 1: 6-10.

สุมิต บุญเสริมสุข, รุ่งนภา พัฒนวิบูรณ์ และ วลัยพร สถิตวิบูร. การประยุกต์ใช้ RAPD ในการจำแนกพันธุ์ไผ่บางชนิดในประเทศไทย. [http://www.Forest.go.th] December 23, 2006.

สุรีพร เกตุงาม 2546 เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการ ม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5 (2): 37-58.

สายชล จันมาก จรัสศรี นวลศรี และ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2548. การศึกษาความแปรปรวนและความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27(3): 473-485.

ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี. 2542. การผลิตละหุ่งอย่างถูกต้องเหมาะสม. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-13.

ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี. 2549. เอกสารวิชาการละหุ่ง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-18.

Barnes, W. B. 1994. PCR amplification of up to 35-kb with high fidelity and high yield from bateriophage templates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2216–2220.

Chowdhury, A.K., P.Srinives, P.Tongpamnak and P. Saksoong. 2002. Characterization and variation in RAPD marker profiles of exotic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars. J.Issaas. 7: 37-52.

Chung, S.Y., S.H. Choi, M.J. Kim, K.E. Yoon, G.P.Lee, J.S.Lee and K.H.Ryu. 2006. Genetic relationship and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis. Scientia Horticulturae. 109: 153-159.

Crochemore, M.L., H. B. C. Molinari, and L.G.E., Vieira. 2003. Genetic Diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Evaluated by RAPD Markers. An International Journal. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol .46 n. 4: pp 521-527.

Ercan, G.A., M. Taskin and K. Turgut. 2004. Analysis of genetic diversity in Turkish sesamae (*Sesamum indicum* L.) populations using RAPD marker. Genetic resources and Crop Evolution. 51: 599-607.

Fung, G., Hammer, S., and Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA . Biofeedback 13(1): 52-54.

Galderisi, U., M. Cipollaro, G. Di. Bernardo, L. De. Masi, G. Galano, and A. Cascino. 1999. Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis. Plant Cell Reports 18:652-655.

Goh, M.W.K., P.P. Kumar, S.H. Lim and H.T.Tan. 2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae). Euphytica. 141: 11-22.

Lodhi, M.A., Y. Guang-ning, N.F. Weeden and I.R.Bruce. 1994. Simple and efficient method for DNA extraction from grapevine, *Vitis* species and Ampelosis. Plant Mol.Rep. 12 (1): 6-13.

Munthaly, M., R.V. Ford-Lloyd, and H.J. Newbury. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. PCR Methods Appl. 1: 274-276.

Raghunathachari, P., V.K.Khanna, U.S. Singh and N.K. Singh. 2000. RAPD analysis of genetic variability in Indian scented rice germplasm (*Oryza sativa* L.). Current science. 79(7).

Roger, S.O., and A.J. Bendich. 1994. Extraction of total cellular DNA from plant, algae and fungi In Plant Molecular Biology Manual. Pp H4: 1-8. S.B. Gelvin and R.A. Schilperootrt Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

Rohlf, F.J. 2004. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.2. Exster Software, Setauket, New York.

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Sharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487-491.

Saker, M. M., and H. A. Moursy. 1996. Molecular Characterisation of Egyptian date PALM: II. RAPD Fingerprints. Plant cell and Tissue Culture Dept., Genetic Engineering and Biotechnology Division, National Research Center, Cairo, Egypt. pp. 173-182.

Webb, D. M. and S.J.Knapp 1997. DNA Extraction from Previously Recalcitrant Plant Genus. Protocol, Biology Report. pp. 180-182.

Weeden, N.F., G.M. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen, and M.A. Lodhi. 1992. Inheritance and reliability of RAPDmarkers. p. 12--17.Joint Plant Breeding Symposia Series. 1 Nov. Minneapolis, ASA, Madison, WI.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genome using PCR with Arbitrary primer. Nucleic Acids. Res. 18: 7213-7218.

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

Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, A.R. Kubelik, J.A. Rafalski, and S.U. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in Enzymology. 218: 704-741.

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. 2% CTAB method (Rogers and Bendich, 1994)

Extraction buffer

- 2% CTAB
- 1.4 M NaCl
- 20 mM EDTA
- 100 mM Tris
- 1 % PVP
- 0.2 % mercaptoethanol

2. Modified 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994)

Extraction buffer

- 2%CTAB
- 1.4 M NaCl
- 20 mM EDTA
- 100 mM Tris-HCl
- 2% ß-mercaptoethanol

3. 2 % CTAB method with (Webb and Knapp, 1990)

Extraction buffer

- 2 % CTAB
- 50 mM Tris-HCL pH 8.0
- 0.7 M NaCl
- 10 mM EDTA pH 8.0 และ
- 1% 2-mercaptoethanol

Precipitation buffer

- 0.5% CTAB
- 50 mM Tris-HCl pH 8.0
- 10 mM EDTA pH 8.0

การเตรียม Stock solution

1) 0.5 M EDTA (pH 8.0)

- ชั่งสาร disodium EDTA 186.1 g
- เติมน้ำ 800 ml
- ปรับ pH 8.0 ด้วย NaOH ด้วย NaOH (~ 20 g ของ NaOH pellets) แล้วนำไป autoclave

*** ควรเติมน้ำ ~ 700 ml ก่อนแล้วปรับ pH 8.0 จึงปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ml

2) 5 M NaCl

- ชั่ง NaCl 292.2 g
- เติมน้ำ 800 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร (1,000 ml)
- autoclave

3) 1 M Tris (pH 8.0)

- ชั่ง Tris base 121.1 g
- เติมน้ำ 800 ml (ควรเติมประมาณ 700 ml ก่อนปรับ pH ได้จึงปรับปริมาตร)
- ปรับ pH ด้วย HCl ประมาณ 42 ml
- autoclave

4) Ethidium bromide (10 mg/ml)

- ชั่ง Ethidium bromide 1 g
- เติมน้ำ 100 ml
- เก็บในขวดสีชา ห่อด้วยกระดาษฟอยด์

5) TE buffer

- 10 mM Tris – HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

การเตรียม Gel electropholisis

- ชั่ง Agarose (Gene pure agarose) ~ 1.2 g ใส่ใน flask ขนาด 250 ml

- เติม 1x TBE ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml นำไปอุ่นในไมโครเวฟใช้ระดับความร้อน ~600 เวลา 1-2 นาที เมื่อ gel ละลาย ปล่อยให้อุ่นเติม Ethidium bromide 1.5 µl ผสมให้เข้ากัน เมื่อเจล อุ่นๆ เท ลงใน tray * ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ * เสียบ comb ขนาด 20 เวล 2 แถว ปล่อยให้แข็งตัว ~ 30 นาที (ลองใช้ถุงมือจับดูว่า แข็งตัวหรือยัง)

- เมื่อแข็งตัวแล้วยก tray ใส่ในอ่าง electopholisis เท 1xTBE ให้พอท่วมเจล (ก่อนจะยก tray ใส่ในอ่าง เท 1x TBE ลงไปก่อนเล็กน้อย เมื่อนำ tray gel ลงแล้ว จึงเท 1xTBE ให้ท่วมเจล) ค่อยๆดึง comb ออก

- เตรียมตัวอย่างที่พร้อมจะ run gel ผสมกับ loading dye หยอดลงใน well

- Run gel โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลานานประมาณ 60 นาที

- ตรวจดูแถบดีเอ็นเอและบันทึกภาพ ด้วย Gel document

ประวัติผู้วิจัย

1. ผู้วิจัย (ภาษาไทย) นางสาวอรุณรัตน์ อนันตทัศน์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Aroonrat Anantathas

2. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิชาการเกษตร

3. สถานที่ทำงาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ สังกัดสำนักงานไร่ฝึกทดลองฯ
โทรศัพท์ภาย 045-353542 หรือ มือถือ 089-4980943 Fax. 045-288-373
E-mail paoismyname@yahoo.com.au

4. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
สายสามัญ ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น	2535	ร.ร. นารีนุกูล จังหวัดอุบลราชธานี
สายวิทย์-คณิต ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย	2538	ร.ร. เบ็ญจะมะมหาราช จังหวัดอุบลราชธานี
วท.บ. (จุลชีววิทยา)	2542	ม. เชียงใหม่
วท.ม. (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)	2550	ม. เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ทำวิทยานิพนธ์เกี่ยวกับเทคนิคด้าน Biotechnology และ Molecular biology

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งในและภายนอกประเทศ

ทำวิทยานิพนธ์ /วิจัย ณ ประเทศออสเตรเลีย The University of Western Sydney (Hawkesbury campus), Center for Plant and Food Science เป็นระยะเวลา 1.5 ปี (วันที่ 4 มีนาคม 2547 – 27 พฤษภาคม 2548)

1. **ผู้วิจัย** (ภาษาไทย) นางสาวสุรีพร เกตุงาม

(ภาษาอังกฤษ) Miss Sureeporn Kate-ngam

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

3. สถานที่ทำงาน: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 0-4535-3564
โทรสาร 0-4535-3576
โทรศัพท์มือถือ 09 – 8458116
E-mail: katengas@agri.ubu.ac.th., sureeporn.k@ubu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี	วุฒิการศึกษา	สถานที่ศึกษา	ประเทศ
1983	B.Sc.(Agriculture) First class honor	Kasetsart University	Thailand
1986	M.Sc. (Agriculture)	Kasetsart University	Thailand
1999	Ph.D. (Crop Science)	Oregon State University	USA

5. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

Plant molecular breeding, Marker-assisted backcross breeding, DNA marker development,. Genome mapping and QTLs analysis

6. ผลงานทางวิชาการ

Kate-ngam, S., W. Kimchaiyong, S. Wanchana, and T. Toojinda. 2008. Association analysis and functional marker development of soluble starch synthase IIa (*SSIIa*) and gelatinization properties in Thai rice. In Proceeding of the 5th International Crop Science Congress & Exhibition: Recognizing Past Achievements, Meeting Future Needs! April 13-18, 2008. International Convention Center, Jeju, Korea.

Juntasuriyarat, C and **S., Kate-ngam.** 2008. Identification of rice blast resistance gene, *Pi2,* in wild rice species. Khon Kaen Agriculture Journal. 36 (Supplement): 40-47.

Kate-ngam, S., U., Kotchsatit, and T. Toojinda. 2007. Integrating marker-assisted selection in IR 57514 backcross breeding for redfed lowland ecosystem in Mekong region. *In* Proceedings of the

2nd International Conference on Rice for the Future. 5-9 November 2007. at Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. P. 275-279.

Juntasuriyarat, C, **S., Katengam** and G-L, Wang. 2007. Isolation and characterization of rice homologue of Arabidopsis SINAT5, A Ubiquitination-related E3 ligase, *OsSINAT5*. *In* Proceedings of the 2nd International Conference on Rice for the Future. 5-9 November 2007. at Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. P. 275-279.

Kate-ngam, S., C., Juntasuriyarat, and A. Vanavichit. 2007. Phylogenetic analysis of landrace Thai rice in the Northeast of Thailand based on allele-specific markers underlying starch-synthesizing genes. *In* Proceeding of the 7th Thailand Research Fund Conference 2007. 11-13 October 2007. Ambassador City Hotel, Jomtein, Chonburi, Thailand.

Junthasri, R., **S. Kate-ngam,** and U. Khumcha. 2007. An analysis on DNA fingerprints of thirty papaya cultivars (*Carica papaya*) grown in Thailand with the use of amplified fragment length polymorphism technique. Pakistan J. Biol. Sci. 10 (18): 3072-3078.

Kate-ngam, S., and A. Kumleak. 2007. Optimization of RAPD-PCR for identification of oilseed sesame. Khon Kaen Agriculture Journal. 35 (Supplement): 158-169.

Kate-ngam, S and A. Vannavichit. 2006. The study on evolution of genetic diversity of landrace Thai rice along Mekong basin. *In* Proceeding of the 6th Thailand Research Fund Conference 2006. 12-14 October 2006. Regent Hotel, Cha-am, Petchaburi, Thailand. p. 273.

Kate-ngam, S. and S. Knapp. 2005. Genetic diversity of elite and exotic oilseed meadowfoam germplasm using AFLPs. Kasetsart Journal. 39 (2): 194-205

Kate-ngam S. , and U. Kotchasatit. 2005. Improvement of IR 57514 for Grain Aroma and Cooking Quality Traits using Marker-assisted Selection: I. Parental Polymorphism Survey. *In* Proceeding of the14th Genetic Conference: From Basic to Molecular Technology. 11-13 March 2005, Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand. p. 393-400.

Mayuree, O., **S. Kate-ngam,** D., Jothiyangkoon, P. Thummabenjapone and P. Sarawat . 2005. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) germplasms based on morphological traits and RAPD fingerprint. *In* Proceeding of International Peanut Conference 2005: Prospects and Emerging Opportunities for Peanut Quality and Utilization Technology, 9-12 January 2005, Kasetsart University, Thailand. p. 92-93.

Kate-ngam, S. and U. Kotchasatit. 2004. Marker-assisted backcross breeding for improvement of IR 57514, an elite drought tolerant rice variety adapted to Northeast of Thailand. *In* The 1st International Conference on Rice for the Future. 31 August – 3 September 2004, Kasetsart University. Bangkok, Thailand. p 215.

Kate-ngam, S. 2003. DNA markers in plant breeding. Journal of Ubon Ratchathani University. 5 (2): 37-58.

Kate-ngam, S. and D. Chotiyangkoon. 2002. Varietal purity test: techniques for high quality seed production. Khon Kaen Agricultural Journal. 30 (3):137-147.

Kate-ngam, S., J.M. Crane, and S.J. Knapp. 2002. The development of genetic map for meadowfoam comprised of amplified fragment length polymorphisms. Theor Appl Genet. 104: 92-96

Kate-ngam, S., J.M. Crane, and S.J. Knapp. 2001. A genome map for the novel oilseed meadowfoam: The *E* locus and QTL affecting fatty acid composition. *In* Genetics: Gene Revolution Era. p.96-99. The 12th Conference on Genetics. 28-30 March 2001. Bangkok, Thailand.

Kate-ngam, S., J.M. Crane, M.B. Slabaugh, and S.J. Knapp. 2001. Genetic mapping of a macromutation and quantitative trait loci underlying fatty acid composition differences in meadowfoam oil. Crop Sci. 41:1927-1930.

Kate-ngam, S., J.M. Crane, and S.J. Knapp. 2000. DNA fingerprinting in the novel oilseed meadowfoam using AFLPs: Analysis of the genetic diversity of section Inflexae Limnanthes. The International Conference on Plant & Animal Genome VIII. January 9 - 12, 2000. San Diego, California U.S.A. (Poster session. P 535).
(http://www.intl-pag.org/pag/8/abstracts/pag8247.html)

Kate-ngam, S., J.M. Crane, and S.J. Knapp. 1999. DNA fingerprinting shows that meadowfoam is genetically diverse: A survey of exotic and elite germplasm accessions. Conference: Diversity in Agriculture markers: New Crops and New Markets. Oct, 17-21, 1999. Eugene, Oregon, U.S.A. (Poster session) (http://www.aaic.org/99progrm.htm#Meadowfoam)

Kate-ngam, S., J.M. Crane, and S.J. Knapp. 1998. A genetic map of meadowfoam: Genes affecting seed oil fatty acid composition. The International Conference on Plant & Animal Genome VI . January 18-22, 1998. San Diego, California, U.S.A. (Poster session. PA9). (http://www.intl-pag.org/pag/6/abstracts/katengam.html