



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธาร (*Crinum thaianum*)
พันธุ์ไม้ใกล้สูญพันธุ์ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Assessment of Genetic Diversity of Water-Onion (*Crinum thaianum*) an Endangered
Plant in Thailand Using Molecular Markers

นามผู้วิจัย นางสาวเมธิญา ช้างเจริญ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สุจิตรา จางตระกูล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธาร (*Crinum thaianum*)
พันธุ์ไม้ใกล้สูญพันธุ์ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Assessment of Genetic Diversity of Water-Onion (*Crinum thaianum*)
an Endangered Plant in Thailand Using Molecular Markers

โดย

นางสาวเมธิญา ช้างเจริญ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมธิญา ช้างเจริญ 2557: การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธาร (*Crinum thaianum*) พันธุ์ไม้น้ำใกล้สูญพันธุ์ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. 94 หน้า

ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อจำแนกและระบุความจำเพาะของพลับพลึงธาร (*Crinum thaianum* L.) ของไทยจาก Erichment library โดยใช้ไบโอคินโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิด B-(GA)₁₅, B-(CA)₁₅, B-(ACC)₁₀ และ B-(CCT)₁₀ ออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 26 คู่ และใช้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในตัวอย่างพลับพลึงธาร 55 ตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติจังหวัดพังงาและระนอง บริษัทยังออกพันธุ์ไม้น้ำไวท์เครน และสวนจตุจักร จัดกลุ่มจากแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc-2.20k พบว่าสามารถแบ่งพลับพลึงธารทั้ง 55 ตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ 7 กลุ่มย่อย เมื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในพลับพลึงธาร 7 แหล่งโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและไอเอสเอสอาร์ พบค่าเฉลี่ยของร้อยละของตำแหน่งที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม 31.45% และค่า Expected heterozygosity 0.129 โดยค่าสูงสุดพบในพลับพลึงธารจากบริษัทไวท์เครน (59.15% และ 0.238 ตามลำดับ) นอกจากนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลประเภท PCR-RFLP ที่จำเพาะกับยีน 7 ยีน ได้แก่ *NADH dehydrogenase subunit F (ndhF)*, *Acetyl-CoA carboxylase beta subunit (accD)*, *NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 7 (ndhH)*, *NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 1 (ndhA)*, *Photosystem I P700 apoprotein A2 (psaB)*, 18srDNA และ 26srDNA เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพลับพลึงธารจำนวน 77 ตัวอย่างและพันธุ์พืชอื่นในวงศ์เดียวกับพลับพลึงธาร (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ได้แก่ พลับพลึงขาว (*C. asiaticum* L.) พลับพลึงดินเป็ด (*Hymenocallis littoralis* Salish.) พลับพลึงแดง (*C. amabile* Don.) *C. nathans* และ พลับพลึงหนู (*Hymenocallis* sp.) พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 4 กลุ่มย่อย กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็นพลับพลึงที่อยู่ในสกุล *Crinum* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มพลับพลึงธารทั้งหมด และกลุ่มพลับพลึงขาวกับพลับพลึงแดง กลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นพลับพลึงในสกุล *Hymenocallis* และ *C. nathans* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ พลับพลึงดินเป็ด กับ *C. nathans* อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน และพลับพลึงหนู เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีนทั้ง 7 ชนิดของพลับพลึงธาร เพื่อยืนยันความจำเพาะของยีน และเป็นข้อมูลระบุความจำเพาะของสายพันธุ์พลับพลึงธารของประเทศไทย รวมทั้งเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 5 ชนิด (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26srDNA) กับพืชชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูล พบว่าพลับพลึงธารมีความเหมือนทางพันธุกรรมกับพลับพลึงขาวมากที่สุด จัดได้ว่าพลับพลึงธารในประเทศไทยยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ การศึกษานี้เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมแรกของพลับพลึงธาร ซึ่งจะประโยชน์ต่อการนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อการประเมินพันธุกรรมของพลับพลึงธารและเพื่อเป็นแนวทางเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พลับพลึงธารอย่างยั่งยืนต่อไป

Maythiya Changcharoen 2014: Assessment of Genetic Diversity of Water-Onion (*Crinum thaianum*) an Endangered Plant in Thailand Using Molecular Markers. Mater of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Vipa Hongtrakul, Ph.D. 94 pages.

Microsatellite DNA markers were developed for classification and varietal specific identification of Thailand water-onion (*Crinum thaianum* J. Schulze) from the enrich library using biotin-oligonucleotide probes, B-(GA)₁₅, B-(CA)₁₅, B-(ACC)₁₀ and B-(CCT)₁₀. Twenty-six primer pairs were designed and were used to evaluate genetic relationship among 55 water-onion samples collected from natural water resources in Phang-nga and Ranong provinces, White Crane water plant export company and Chatuchak market. Cluster analysis using computer program NTSYSpc-2.20k was performed and could classify all 55 samples into 2 major groups and 7 sub-groups. AFLP markers were used to evaluate genetic diversity in seven populations. The result shows that, average percentage of polymorphic loci and expected heterozygosity were 31.45% and 0.129, respectively. The highest percentage of polymorphic loci (59.15%) and the highest expected heterozygosity (0.238) were found in water-onion from White Crane water plant export company. PCR-RFLP markers were developed specific to seven genes, *NADH dehydrogenase* subunit F (*ndhF*), *Acetyl-CoA carboxylase* beta subunit (*accD*), *NADH-plastiquinone oxidoreductase* subunit 7 (*ndhH*), *NADH-plastoquinone oxidoreductase* subunit 1 (*ndhA*), *Photosystem I P700 apoprotein A2* (*psaB*), 18srDNA and 26srDNA and used to evaluate genetic relationship among 77 water-onion samples and five other plants in family Amaryllidaceae, including *C. asiaticum* L., *Hymenocallis littoralis* Salish., *C. amabile* Don., *C. nathans* and *Hymenocallis* sp. All samples could be separated into two major groups and 4 subgroups. Group I consisted of two subgroups, one was all water-onion samples and the other was *C. asiaticum* and *C. amabile*. Group II also consisted of two subgroups, one was *Hymenocallis* sp. and the other was *H. littoralis* and *C. nathans*. Partial sequences of seven genes of water-onion were analyzed in order to confirm the gene specificity and for specific identification of Thailand water-onion. Five partial gene sequences (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26srDNA) of water-onion were compared to other plant sequences available in database. The result indicated that water-onion was most closely related to *C. asiaticum*. The result indicated that water-onion in Thailand still maintain its genetic variation. This first report on genetic study of water-onion will be useful for the development of suitable DNA markers or genetic evaluation of water-onion and for conservation and sustainable use of Thailand water-onion in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล ประธานกรรมการ ที่ช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำตลอดช่วงเวลาที่ทำงานวิจัย รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สุจิตรา จางตระกูล กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในงานวิจัย รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมพิศ สามิภักดิ์ ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ดร. กนกพร ไตรวิทยากร ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ถ่ายทอดวิชาความรู้ ในการทำงานวิจัย และ ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.อัครพงษ์ สวัสดิพงษ์, นางเมธานี หอมทอง, นายฐิติ กาญจนเกตุ, นางสาวศิริพร สมบุญจิตร รวมทั้งสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการ 4511 ภาควิชาพันธุศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และเป็นกำลังใจที่ดีให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2554-2555 และสำนักกองทุนวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปี 2554 ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ พ่อและแม่ ผู้เป็นที่รักและกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ในทุกๆ ด้าน เสมอมา

เมธิญา ช้างเจริญ
มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	42
สรุป	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	74
ภาคผนวก	84
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	94

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อและแหล่งที่พบการเจริญเติบโตของพืชสกุล <i>Crinum</i> 4 ชนิดที่เป็นพืชน้ำ	6
2	สถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	24
3	ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนในพลับพลึงธารที่พัฒนาจากข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูล	35
4	ลำดับเบสของไพรเมอร์ และ Adapter ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพลับพลึงธาร โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี	38
5	จำนวนโคลนที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ชั้นต่างๆ จากห้องสมุดจีโนม	45
6	ลำดับเบสแบบไมโครแซเทลไลต์ชนิดต่างๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของงพลับพลึงธาร	46
7	ลำดับเบสของไพรเมอร์ ชนิดของลำดับเบสซ้ำที่อยู่ในคู่ไพรเมอร์ ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ และ ค่า Annealing temperature ของไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่	49
8	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในพลับพลึงธารจากไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์แต่ละชนิด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	54
9	ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธาร โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ Polymorphism ในแต่ละคู่ไพรเมอร์	57
10	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphic loci ทั้ง 7 แหล่ง	62
11	แสดงค่า Genetic Diversity ของพลับพลึงธารทั้ง 7 แหล่ง	63
12	แสดงค่า Genetic distance และ Identities (NEI'S (1972/1978) DISTANCE) ของพลับพลึงธารทั้ง 7 แหล่ง	64
13	รายชื่อพืชทั้ง 14 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนกับพลับพลึงธาร และหมายเลข Accession No.	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพลับพลึงธาร (A) ลำต้น (B) ใบ (C) ดอก (D) ผล (E) เมล็ด	9
2	พืชในวงศ์เดียวกับพลับพลึงธาร (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยีน	36
3	ตัวอย่าง Genomic DNA ที่สกัดจากใบอ่อนพลับพลึงธาร ตัวอย่างที่ 1-30 (M = DNA ladder mix)	42
4	จีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MseI</i> และต่อด้วย Adapter หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (M = DNA ladder mix)	43
5	ดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับไบโอดินโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (CA) ₁₅ , (GA) ₁₅ , (ACC) ₁₀ และ (CCT) ₁₀ หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (M = DNA ladder mix)	44
6	ตัวอย่างผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของพลับพลึงธารด้วยอุปกรณ์ไพรเมอร์ CriSat2	50
7	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างพลับพลึงธาร 55 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง โดยใช้วิธี UPGMA	51
8	การจัดกลุ่มพลับพลึงธาร โดยการสร้าง PCA จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพลับพลึงธาร สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง	52
9	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอพลับพลึงธารจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์	55
10	ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพลับพลึงธาร จากเทคนิคเอฟแอลพี	58
11	แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพลับพลึงธารทั้ง 7 แหล่ง	64
12	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพลับพลึงธารและพืชอื่นในวงศ์เดียวกัน โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จำเพาะกับยีน	67
13	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างพลับพลึงธารกับพืชอื่นในวงศ์เดียวกัน 5 ชนิด สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จำเพาะกับยีน ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 26 แถบ โดยใช้วิธี UPGMA	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 15 ชนิด สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับเบส บางส่วนของยีน 5 ชนิด (<i>accD</i> , <i>ndhH</i> , <i>ndhA</i> , <i>psaB</i> , <i>26srDNA</i>) โดยใช้วิธี Maximum likelihood (ML) ในโปรแกรม BioEdit version 5.0.6	70
ภาพผนวกที่		
1	ลำดับเบสที่บางส่วน (Partial sequence) ของยีนในพลับพลึงธาร ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด	85
2	รายชื่อพลับพลึงธารและพืชชนิดอื่นในวงศ์ Amaryllidaceae	90

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธาร (*Crinum thaianum*)
พันธุ์ไม้น้ำใกล้สูญพันธุ์ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Assessment of Genetic Diversity of Water-Onion (*Crinum thaianum*)
an Endangered Plant in Thailand Using Molecular Markers

คำนำ

“พลับพลึงธาร” ปัจจุบันตกอยู่ในสภาพวิกฤติใกล้สูญพันธุ์ เป็นพืชเฉพาะถิ่นในประเทศไทยพบที่ จังหวัดระนอง และพังงาเท่านั้น (วรรณดา และ รัฐภัทร, 2551) พลับพลึงธาร เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุหลายปี มีลักษณะเป็นพืชครึ่งบกครึ่งน้ำ มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ (วรรณดา และ รัฐภัทร, 2551) อยู่ในวงศ์เดียวกับ พลับพลึงดินเป็ด พลับพลึงขาวและพลับพลึงแดง เป็นต้น

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาพันธุกรรมของพืชและสัตว์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากการศึกษาลึกลงไปในระดับโมเลกุล อันเป็นตัวการที่ควบคุมให้เกิดลักษณะต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายชนิด ทั้งที่เป็นประเภท Dominant markers ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNAs), เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphisms) และ เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ISSR: Inter Simple Sequences Repeat) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ศึกษาโดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มาก่อน นอกจากนี้ยังตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (Multi-locus detection) และประเภท Co-dominant markers ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLPs: Restriction Fragment Length Polymorphisms), เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSRs: Simple Sequences Repeats) หรือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (MS: Microsatellites) และ เครื่องหมายเอสเอสซีพี (SSCPs: Single Strand Conformational Polymorphisms) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมก่อนเพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเครื่องหมายขึ้นมาใช้ และใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละเพียงหนึ่งตำแหน่ง (Single locus detection) เครื่องหมายเหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชและสัตว์ และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ที่แสดงความจำเพาะกับพันธุ์แต่ละพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากเครื่องหมายทั้งหมด เครื่องหมายอาร์เอพีดีจัดเป็นเครื่องหมายที่ยังคงมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย รวดเร็วและราคาถูก โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR:

Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ที่จับในทิศกลับกัน

เครื่องหมายสการ์ (SCAR: Sequence Characterized Amplified Region) เป็นเครื่องหมายที่พัฒนาให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งในจีโนม โดยอาศัยลำดับเบสที่ได้มาจากการศึกษาเครื่องหมายอื่น เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟดีมาก่อน เครื่องหมายเอสเอสซีพี และ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็น Multi-allelic marker ที่ให้รูปแบบของยีน (Allele) หรือ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragments) หลายรูปแบบ (Highly polymorphic) จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำแผนที่จีโนม (Genome mapping) และใช้ระบุความจำเพาะของพันธุ์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายที่ครอบคลุมส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ (Repeat sequences) ซึ่งพบกระจายทั่วไปในจีโนมพืช และสัตว์ และสามารถถูกเพิ่มปริมาณเพื่อนำมาตรวจสอบได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสรอบข้าง (Flanking sequences) ของลำดับเบสซ้ำๆ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis เทคนิคไมโครแซทเทลไลต์นี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว มีแถบแบนที่เข้าใจง่ายสามารถแยกสภาพโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ ทำซ้ำได้ผลดี และใช้อุปกรณ์น้อยไม่ยุ่งยากซับซ้อน แม้ห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเบื้องต้นก็ทำได้ แต่จำเป็นต้องมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ขึ้นมาก่อนซึ่งในการพัฒนาใช้เวลา และค่าใช้จ่ายสูง

เนื่องจากต้องผ่านการเตรียม Genomic library, Hybridization และ DNA sequencing ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ สามารถใช้ศึกษาความถี่ของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ ในจีโนมโดยเฉพาะที่ไม่มีการศึกษาจีโนมมาก่อน เสียค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องทำ Genomic library และเร็ว เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายที่สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีความใกล้เคียงกันมากๆ (Zietkiewicz *et al.*, 1994) ให้รูปแบบความหลากหลาย (Polymorphisms) สูง ใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงครั้งเดียว และสามารถทำซ้ำได้ผลดีเช่นเดิม (Blair *et al.*, 1999; Fang and Roose, 1997) เทคนิคไอเอสเอสอาร์เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยวที่ประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำๆ หรือลำดับเบสซ้ำๆ ที่ต่อปลาย 3' หรือ 5' ด้วย 2-4 เบส เพื่อเพิ่มปริมาณบริเวณดีเอ็นเอระหว่างลำดับเบสซ้ำๆ ที่มีทิศทางกลับกัน (Inverted SSR) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ใน Denaturing polyacrylamide gel หรือใน Agarose gel ก็ได้เช่นกันแต่ความละเอียดในการตรวจสอบจะต่ำกว่าใน Acrylamide gel เครื่องหมายดีเอ็นเอบางชนิดพัฒนาขึ้นมาให้จำเพาะกับยีนสำคัญ เรียกว่า Gene specific markers สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ศึกษาการแสดงออกของยีน ระบุความจำเพาะของพันธุ์ และนำไปสู่การหาข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีนนั้น เครื่องหมายเอสเอสซีพีเป็นเครื่องหมายที่นิยมพัฒนาขึ้นมาให้จำเพาะกับยีน โดยอาศัยลำดับเบสของยีนจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาเป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาตำแหน่งของ Specific primers และใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใน

การศึกษาพันธุกรรมโดยใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ สามารถศึกษาได้ในขณะที่ต้นพืชยังเป็นต้นกล้า หรือจากส่วนของเซลล์จากอวัยวะต่างๆ โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลในพลับพลึงธารในประเทศไทยยังไม่มี รายงานมาก่อน จึงน่าที่จะได้มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ มาตรวจสอบความจำเพาะของสายพันธุ์ สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะของพลับพลึงธาร โดยการศึกษาในครั้งนี้จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ประเภท Dominant marker ได้แก่ เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ที่ไม่ จำเป็นต้องรู้ข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นมาก่อน และเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภท Co-dominant marker ได้แก่ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายหรือ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพลับพลึงธารที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ แหล่งจำหน่ายตาม ท้องตลาด และบริษัทส่งออกพันธุ์ไม้น้ำ และจะได้พัฒนาไพรเมอร์จากลำดับเบสของยีนชนิดต่างๆ จากพืชชนิดอื่นที่มีข้อมูลลำดับเบสอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เทคนิคดีเอฟแอลพี (DFLP: DNA Fragment Length Polymorphism) และ เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP: PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนจะนำมาหาลำดับเบสโดยตรง หรือผ่านการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ก่อนนำไปหาลำดับเบส วิเคราะห์ความจำเพาะของลำดับเบสที่ได้ รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างพลับพลึงธาร เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาพันธุ์และอนุรักษ์รักษายีนพลับพลึงธารให้คงอยู่อย่างยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. พัฒนา Co-dominant markers ชนิด SSR markers และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และระบุความจำเพาะของตัวอย่างพลับพลึงธาร
2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธารที่เก็บรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ จังหวัดระนองและพังงา โดยใช้ Dominant marker ชนิด AFLP และ ISSR markers
3. พัฒนาเครื่องหมาย PCR-RFLP จำเพาะกับยีน และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างพลับพลึงธารเปรียบเทียบกับพันธุ์พืชอื่นที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพลับพลึงธาร (Amarillidaceae) วิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วน (Partial Sequence) ของยีนจำเพาะของพลับพลึงธาร และเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนกับพืชชนิดต่างๆ ที่มีในฐานข้อมูล

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไปของปลั้วปลิงธาร

ปลั้วปลิงธารมีชื่อภาษาไทยหลายชื่อ ได้แก่ หอมน้ำ หนุ่ยช่อง ปลั้วปลิงน้ำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Crinum thaianum* Schulze. และมีชื่อสามัญว่า Water-onion พบว่าทั่วโลกมีพืชวงศ์ Amarillidaceae อยู่ประมาณ 85 สกุล 860 ชนิด (วรรณดา และ รัฐภัทร์, 2551) เป็นพืชที่ชอบความชื้นสูงและชอบขึ้นอยู่ใกล้กับบริเวณแหล่งน้ำ ดังนั้นจึงพบพืชในสกุลนี้เจริญเติบโตได้ดีในภูมิประเทศที่มีลักษณะร้อนชื้น ซึ่งในบรรดาทั้งหมด 85 สกุลนั้น มีเพียงสกุล *Crinum* เท่านั้น ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำ โดยพบอยู่เพียง 4 ชนิดทั่วโลก ได้แก่ *C. thaianum*, *C. aquaticum*, *C. natans* และ *C. purpurascens* (<http://www.siamensis.org/article/199>) สามารถจำแนกตามอนุกรมวิธานตาม Hiscock (2003) ได้ดังนี้

Kingdom	Plant
Division	Magnoliophyta
Class	Liliopsida
Order	Asparagales
Family	Amarillidaceae
Genus	<i>Crinum</i>
Species	<i>C. thaianum</i> Schulze.

เป็นพืชที่ชอบความชื้นสูงและชอบขึ้นอยู่ใกล้กับบริเวณแหล่งน้ำ ดังนั้นจึงพบพืชในสกุลนี้เจริญเติบโตได้ดีในภูมิประเทศที่มีลักษณะเป็นแบบเขตร้อนชื้น โดยพืชสกุล *Crinum* ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำ พบมีอยู่เพียง 4 ชนิดทั่วโลก (<http://www.siamensis.org/article/199>) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายชื่อและแหล่งที่พบการเจริญเติบโตของพืชสกุล *Crinum* 4 ชนิด ที่เป็นพืชน้ำ

รายชื่อ	แหล่งที่พบ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
1. <i>Crinum thaianum</i>	จังหวัดระนองและจังหวัดพังงาในประเทศไทย	
2. <i>Crinum aquaticum</i>	ประเทศแอฟริกาเขตร้อน	
3. <i>Crinum nathans</i>	ประเทศแอฟริกาเขตร้อน	
4. <i>Crinum purpurascens</i>	ประเทศบราซิลและเทือกเขาอินดีสตะวันออก	

พลับพลึงธารเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ในเฉพาะถิ่นเท่านั้น พบเพียงแห่งเดียวในโลกคือในประเทศไทย โดยพบว่าการกระจายตัวอยู่ในบริเวณพื้นที่เล็กๆ ระหว่าง 2 จังหวัด ทางภาคใต้ คือ บริเวณจังหวัดระนองตอนล่างเรื่อยไปจนถึงจังหวัดพังงาตอนบน โดยจะสามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะในแหล่งน้ำที่มีสภาพน้ำใสสะอาด น้ำไหลเรื่อยๆ และไม่แรงจนเกินไป ซึ่งสถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง (2553) รายงานผลการสำรวจพบพลับพลึงธารอยู่ในคลองต่างๆ ได้แก่ คลองนาคา อำเภอสุขสำราญ คลองบางปรู อำเภอกะเปอร์ ในจังหวัดระนอง และ คลองบางเผาหมู อำเภอตะกั่วป่า คลองบางหญ้าใหม่ อำเภอกะปง คลองตำหนัง อำเภอกระบุรี คลองสวนยาง อำเภอกระบุรี คลองนุ้ย อำเภอกระบุรี คลองกำนันหัด อำเภอกระบุรี คลองบางปง อำเภอกระบุรีคลองบางบ่อ อำเภอกระบุรี คลองบางซอ อำเภอกระบุรี คลองตาผุด อำเภอกระบุรี คลองท่ากะได อำเภอกระบุรี ในจังหวัดพังงา

การเจริญเติบโตตั้งแต่แตกออกจากเมล็ดจนถึงออกดอกจะใช้เวลาประมาณ 3 ปี ออกดอกปีละ 1 ครั้ง ซึ่งจะอยู่ในช่วงเดือน ตุลาคม-ธันวาคม ของทุกปี โดยจะชูช่อและออกดอกสีขาวบาน

สะพรั่งเหนือผิวน้ำตลอดสายลำธาร โดยเฉพาะลำคลองนาคา ส่งกลิ่นหอมอ่อนๆ ไปทั่วทั้งบริเวณ เป็นภาพที่สวยงามมากจนเคยได้นิยามว่า “ราชินีแห่งคลองนาคา”

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพลับพลึงธาร

ลักษณะโดยทั่วไปของพลับพลึงธารจัดเป็นไม้ล้มลุก มีหัวใต้ดิน เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7 เซนติเมตร มีรากเล็ก ใบออกเป็นวงรอบแทงขึ้นเหนือผิวน้ำ รูปแถบยาว มีประมาณ 20 หรือมากกว่า สีเขียวอ่อน เนื้อใบเหนียวและนุ่ม ขนาด 1.5-2.5 x 200-300 เซนติเมตร มีเส้นใบตามยาวจำนวนมาก ขอบใบหยักซี่ฟันเล็กน้อย ช่อดอกรูปร่ม มีกาบหุ้มช่อดอกสีแดง ก้านช่ออวบหนา 0.5-0.8 เซนติเมตร ยาวถึง 80 เซนติเมตร สีเขียวแกมม่วง ดอกย่อย 5-8 ดอก บานทีละ 1-3 ดอก หลอดกลีบรวมสีขาวเขียว ยาว 12-14 เซนติเมตร ปลายแยก 6 แฉก รูปแถบถึงรูปหอก ขนาด 0.8-1 x 8-10 เซนติเมตร สีขาว ก้านเกสรเพศผู้ 6 อัน เรียวยาวและแผ่กว้างสีขาวถึงแดง ยาว 6-8 เซนติเมตร อับเรณูติดที่ฐาน สีเหลืองอ่อน ยาว 1.2-1.5 เซนติเมตร ก้านเกสรเพศเมียสั้นกว่าก้านเกสรเพศผู้ ผลมีสีแดง จัดเป็นประเภทที่มีหลายเมล็ด เมล็ดมีสีเขียว ผิวไม่เรียบ ลักษณะบิดเบี้ยวและเป็นเหลี่ยมยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร (รัฐภัทร์ และ วรรณดา, 2551) ส่วนประกอบของพลับพลึงธาร (ภาพที่ 1 A-E) มีดังนี้

ลำต้น มีลักษณะเป็นหัวเจริญอยู่ใต้ดินในน้ำ และมีการลดรูปลงจนมีขนาดเล็ก ซึ่งบริเวณนี้จะเป็นจุดกำเนิดของใบเกิดจำนวนหลายใบซ้อนกันหลายๆ ชั้นจนมีลักษณะเป็นหัว

ใบ เป็นใบประเภทใบเดี่ยว โดยแตกออกจากลำต้นเป็นกอ โคนใบหุ้มประกบกัน ใบมีลักษณะเป็นรูปแถบ (Linear) คล้ายกับริ้วรับบินขนาดใหญ่ ขอบใบมีหยักเล็กๆ ปลายฟันเลื่อย ความกว้างของใบประมาณ 2-3 เซนติเมตร ส่วนความยาวของใบนั้นจะขึ้นอยู่กับระดับความลึกของน้ำในลำธาร โดยจะสามารถพัฒนาความยาวของใบขึ้นได้เรื่อยๆ จนถึงระดับของผิวน้ำ ใบมีสีเขียวอ่อน-เขียวแก่ ซึ่งสีของใบนั้นจะขึ้นอยู่กับความใสสะอาดของน้ำในลำธาร ถ้าแหล่งน้ำใดพบใบที่มีสีเขียวสดใสมากเท่าใดก็แสดงว่าแหล่งน้ำนั้นมีความใสสะอาดมากเท่านั้น

ดอก เป็นดอกชนิดสมบูรณ์เพศ คือมีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน ดอกมีสีขาว ตอนปลายแยกออกเป็น 6 แฉก มีลักษณะเป็นรูปหอก ก้านชูเกสรเพศผู้ (Filament) มีลักษณะเรียวยาวสีแดงจำนวน 6 ก้าน อับเรณู (Anthers) มีสีเหลือง ก้านชูเกสรเพศเมีย (Style) มีสีแดง ช่อดอก (Inflorescence) มีลักษณะเป็นช่อดอกแบบร่ม (Umbel) และในแต่ละช่อดอกจะมีก้าน

ช่อดอกหลายก้าน โดยที่แต่ละก้านจะยาวเท่ากัน มีสีเขียวแกมม่วง ซึ่งในแต่ละก้านจะทยอยกันออกดอกและบานในระยะเวลาแตกต่างกัน กาบหุ้มช่อดอกมีสีแดงและหลอดกลีบรวม (Tubes) มีสีเขียวอ่อน

ผล เป็นชนิดผลสด (Freshy fruit) เปลือกภายนอกมีลักษณะอ่อนนุ่ม (Pericarp) ภายในมีหลายเมล็ด (Berry) รูปร่างกลม ผิวไม่เรียบ ขณะเมื่อยังอ่อนจะมีสีเขียวและจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงอมแดงเมื่อผลเริ่มแก่ จากนั้นเปลือกจะเริ่มเปื่อยยุ่ยแล้วปล่อยให้เมล็ดที่อยู่ภายในหลุดออกจากกระเปาะ (ผล) ลอยไปตามกระแสน้ำ

เมล็ด มีสีเขียว ลักษณะเป็นเหลี่ยมหลายเหลี่ยม แต่ละเมล็ดจะมีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งคล้ายๆกับการประกอบชิ้นส่วนของจิ๊กซอรวมกันขึ้นเป็นผล มีขนาดตั้งแต่ < 1 จนถึง > 3 เซนติเมตร ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นอาหารให้กับต้นอ่อนที่อยู่ภายใน เมื่อเมล็ดหลุดออกจากกระเปาะ (ผล) ในเดือนธันวาคม-มกราคม ซึ่งในช่วงนี้น้ำจะเริ่มแห้ง ในขณะที่หลุดออกจากกระเปาะแล้วลอยไปตามกระแสน้ำนั้นเมล็ดจะมีการพัฒนาสายรกสำหรับส่งอาหารไปหล่อเลี้ยงต้นอ่อนที่มีการเจริญเติบโตอยู่ภายใน โดยต้นอ่อนจะได้รับอาหารจากสายรกเป็นเวลาประมาณ 2-3 เดือน หลังจากที่หลุดออกจากกระเปาะ จากนั้นต้นอ่อนจะเจริญเติบโตโดยจะมีใบและรากงอกออกมาเพื่อยึดเกาะกับพื้นน้ำ และค่อยๆเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งต้นอ่อนนั้นจะต้องยึดเกาะกับพื้นน้ำให้ได้ก่อนที่ฤดูฝนจะมาถึงในช่วงเดือนเมษายน เนื่องจากในช่วงหน้าฝนนั้นน้ำในลำคลองจะมีการไหลเชี่ยวและแรงขึ้น รวมทั้งระดับน้ำก็จะเริ่มสูงขึ้น ซึ่งมักจะเป็นอุปสรรคต่อการยึดเกาะกับพื้นน้ำของต้นอ่อนเอง ถ้าต้นอ่อนใดไม่สามารถยึดเกาะกับพื้นน้ำได้ ก็จะถูกกระแสน้ำพัดพาลงสู่ทะเลในที่สุด (รัฐภัทร์ และ วรณดา, 2551)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปลับปลิงธาร (A) ลำต้น (B) ใบ (C) ดอก (D) ผล (E) เมล็ด

3. การขยายพันธุ์ปลับปลิงธาร

ปลับปลิงธารสามารถขยายพันธุ์ได้ 3 วิธีดังนี้

1. การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual Reproduction)

เป็นการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ซึ่งเกิดจากการปฏิสนธิของ Gamete เพศผู้ และ Gamete เพศเมีย ได้เป็น Zygote ที่มีเซลล์เดียวอยู่ภายใน Ovule โดยภายใน Zygote จะมีข้อมูลทางพันธุกรรมที่จะทำให้เกิดพืชต้นใหม่ทั้งหมด

2. การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual Reproduction)

คือ การขยายพันธุ์โดยการเพิ่มจำนวนต้นพืช ที่มี Genotype เหมือนกับแม่โดยใช้ส่วนต่างๆ ของต้นพืชในการขยายพันธุ์ เนื่องจากเซลล์ในสิ่งมีชีวิตทุกเซลล์นั้นจะมีข้อมูลทางพันธุกรรม ที่บรรจุอยู่ในนิวเคลียสนั้นเหมือนกันในทุกๆ เซลล์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถนำมาขยายพันธุ์และได้สิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเหมือนกับต้นแม่ทุกประการ โดยใช้วิธีต่างๆ ดังนี้

- การแยก (Separation) คือ การแยกส่วนของพืชออกจากกัน เช่น การแยกหัวย่อยขนาดเล็ก (Bulblets) ออกจากหัวที่มีขนาดใหญ่ของปลับปลิงธารไปปลูกไว้ที่ทรายหรือกรวด

- การผ่าหัว (Bulb cutting) คือ การผ่าหัวตามยาว ให้ผ่านบริเวณจุดศูนย์กลางของหัว ซึ่งในแต่ละชิ้นนั้นจะมีจุดเจริญที่ให้งอกเป็นพืชต้นใหม่ได้ โดยในแต่ละชิ้นนั้นจะประกอบด้วยฐานหัวและกาบใบ

- การผ่าฐานหัว (Basal cutting) คือ การทำลายจุดเจริญ โดยทำให้เกิดบาดแผลที่บริเวณฐานหัว จากนั้นเมื่อนำอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จะมีการสร้างหัวย่อยเกิดขึ้นจากจุดเจริญที่บริเวณรอยแผลและที่ตาข้างระหว่างกาบใบ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. การคว้านหัว (Scooping) เป็นการคว้านส่วนของฐานหัวออกทั้งหมด
2. การบากให้เกิดรอยแผลบนฐานหัว (Scoring) เป็นการผ่าเนื้อเยื่อฐานหัวและเจาะให้เป็นร่องลึกถึงจุดเจริญของหัว

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture)

คือการนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ยอด ใบ ราก ดอก ผล หัว หรือเซลล์เพียงเซลล์เดียวจากใบ รวมทั้งเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ที่เรียกว่า โปรโตพลาสต์ นำมาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถกำหนดปริมาณผลผลิตและได้ต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพสูง รวมทั้งปราศจากโรค (สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, 2553)

4. ประโยชน์ของลัมปสิงคาร

1. เป็นพืชที่ใช้บ่งชี้คุณภาพของน้ำในลำธารได้ เนื่องจากลัมปสิงคารจะเจริญเติบโตได้ในเฉพาะลำน้ำที่มีความใสสะอาดเท่านั้น

2. เป็นพืชเศรษฐกิจเนื่องจากการนิยมนำเอาลัมปสิงคารไปใช้เป็นพืชประดับในตู้ปลาและใน Aquarium

3. เป็นพืชที่ส่งเสริมให้เกิดการท่องเที่ยวในท้องถิ่น สามารถสร้างรายได้ให้แก่คนในชุมชนได้เป็นอย่างดี เนื่องจากลัมปสิงคารเป็นพืชเฉพาะถิ่นซึ่งจะพบได้เฉพาะที่บริเวณจังหวัดระนอง

และพังงา ในประเทศไทยเท่านั้น ประกอบกับความสวยงามของตัวปลิงlingerarเอง จึงเป็นพืชที่ทำให้มีคณสนใจและไปเที่ยวชมเป็นจำนวนมาก

4. สามารถช่วยลดกระแสในลำคลองให้ไหลช้าลง ทำให้มีน้ำในลำคลองตลอดทั้งปีและไม่เกิดการขาดแคลนน้ำในหน้าแล้ง

5. ประโยชน์ทางด้านเป็นยา เป็นพืชสมุนไพร และทำครีมบำรุงผิว (รัฐภัทร์ และ วรรณดา, 2551)

5. ปลิงlingerarกับภาวะใกล้สูญพันธุ์

สถานะภาพของปลิงlingerarในปัจจุบันถูกจัดให้อยู่ในบัญชี Red data plant เนื่องจากเป็นพืชที่อยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ (Endangered plant) และกำลังจะผลักดันให้เข้าไปอยู่ในบัญชีแดงของไอยูซีเอ็น (IUCN Red List) โดยให้มีสถานะภาพเป็น Species ที่ใกล้สูญพันธุ์ เพื่อบ่งชี้ว่าเป็นพันธุ์ที่หายากในระดับโลก และให้ประเทศต่างๆ ที่นำเข้าปลิงlingerarเกิดความตระหนักและร่วมมือกัน ซึ่งขณะนี้ปลิงlingerarในแหล่งน้ำธรรมชาตินั้นลดลงอย่างรวดเร็วโดยมาจากหลายสาเหตุหลักๆ (สมศักดิ์, ม.ป.ป.) คือ

1. การลักลอบขุดหัวปลิงlingerarเป็นจำนวนมากเพื่อนำไปจำหน่าย แม้จะมีการห้ามการลักลอบขุดแต่ก็เป็นไปแบบไม่จริงจังมากนัก เนื่องจากปลิงlingerarไม่ได้อยู่ภายใต้การคุ้มครองของกฎหมายใดๆ โดย พรบ. พันธุ์พืช 2518 ไม่สามารถเข้ามาคุ้มครองพืชชนิดนี้ได้ เพราะจะคุ้มครองเฉพาะพืชที่อยู่ในบัญชี List ของ CITES เท่านั้น และการที่จะเอาปลิงlingerarเข้าสู่บัญชี CITES นั้นคงต้องใช้เวลานาน เพราะจะต้องมีการหารือและมีข้อตกลงกับประเทศสมาชิกอื่นๆ ก่อน อีกทั้งปลิงlingerarยังเจริญเติบโตและแพร่กระจายพันธุ์อยู่นอกเขตอนุรักษ์จึงไม่สามารถนำกฎหมายของอุทยานแห่งชาติหรือเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่ามาคุ้มครองได้

2. โครงการขุดลอกคลองเพื่อแก้ไขปัญหาน้ำท่วม นั้น เป็นสาเหตุให้ปลิงlingerarของคลองหลายคลองต้องหมดไป ซึ่งเป็นการทำลายระบบนิเวศในคลองอย่างสิ้นเชิง

3. เจ้าของที่ดินที่ติดกับลำคลองมีการเปลี่ยนแปลงการใช้ที่ดิน เช่น การทำลายต้นไม้สองฝั่งคลอง มีผลทำให้เกิดการชะล้างพังทลายของหน้าดินมากขึ้นและทำให้ลำคลองตื้นเขิน นอกจากนี้

ยังมีการขุดหินที่พื้นคลองเพื่อนำไปจำหน่ายซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรงเนื่องจากเป็นที่ยึดเกาะของหัวปลั้วปลิง

4. การปลูกพืชเศรษฐกิจเชิงเดี่ยว เช่น ยางพาราและปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นพืชที่มีประสิทธิภาพในการซึมซับน้ำได้น้อย ดังนั้นเมื่อฝนตกน้ำจะไหลลงสู่ลำคลองอย่างรวดเร็วและในปริมาณมากส่งผลให้หัวปลั้วปลิงที่ยังเกาะกับพื้นน้ำไม่แน่น หลุดลอยไปตามกระแสน้ำ และลงสู่ทะเลในที่สุด

6. เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction) หรือ พีซีอาร์พัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลาย ร่วมกับ ดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์ หรือ นำไปโคลน การทำพีซีอาร์เป็นกึ่งอัตโนมัติ ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สเข้ากันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย และมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์ คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมด หรือ ทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยา ทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับ ชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่ง ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส ผสมดีเอ็นเอรวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด และดีเอ็นเอพอลิเมอร์ ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณคือ ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (Denaturation) โดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย และมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมาย เข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (Annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ส เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (Primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกัน

หลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2545)

7. การวิเคราะห์ลำดับเบส (Nucleotide sequencing analysis)

การวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นเทคนิคที่สำคัญสำหรับนักชีวโมเลกุล เนื่องจากข้อมูลลำดับเบสเป็นข้อมูลที่ชัดเจน และเป็นเอกลักษณ์ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลได้อย่างกว้างขวาง วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสมี 2 วิธี ได้แก่ การหาลำดับเบสโดยวิธีทางเคมี (Chemical sequencing) และการหาลำดับเบสโดยวิธีใช้เอนไซม์ (Enzymatic sequencing) ในปัจจุบันมีการหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (Automated DNA sequencing) ใช้หลักการติดฉลากเบสของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน แล้วนำเบสเหล่านี้เข้าไปแทรก (Incorporate) ในสายดีเอ็นเอใหม่ โดยอาศัยดีเอ็นเอพอลิเมอเรส จากนั้นจึงนำไปเคลื่อนผ่านเจลที่มีความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า ด้วยหลักการอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกรวบรวมด้วยเครื่องรับสัญญาณแสง แล้วแปลงเป็นสัญญาณดิจิทัล ส่งไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยกระบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นอย่างอัตโนมัติภายใต้การทำงานของเครื่องหาลำดับเบส (DNA sequencer) (http://bsu.biotech.or.th/sequencing_overview.php, 2010)

8. เครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker)

เครื่องหมาย (Marker) ใช้เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ และคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในสปีชีส์ ประชากร หรือ แต่ละตัวอย่าง (สุรินทร์, 2552; Kumar, 1999) แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) เป็นเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยใช้วิธีเปรียบเทียบจากลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะใบ ลำต้น จำนวนเกสรเพศผู้ เป็นต้น ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้ อาจขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผิดพลาด บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยายังคงมีความสำคัญ เนื่องจากมีราคาถูก และใช้พิจารณาประกอบเครื่องหมายโมเลกุลอื่นได้

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) มี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker) เป็นการตรวจสอบโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน โดยแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมดูแถบดีเอ็นเอด้วยสารที่จำเพาะ ข้อดีของเครื่องหมายโปรตีน คือ ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก และแถบของโปรตีนที่ปรากฏแสดงการข่มร่วมกัน (Co-dominance) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบฮอโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ แต่ก็มีข้อจำกัด คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากนัก และการแสดงออกของยีนที่ศึกษาขึ้นอยู่กับ ชนิดเนื้อเยื่อ ระยะเวลา ระยะการเจริญเติบโต และอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้โปรตีนยังสูญเสียสภาพได้ง่าย ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้นาน จึงต้องวิเคราะห์ผลในระยะเวลาจำกัด อีกทั้งการตรวจสอบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีระดับต่ำเมื่อเทียบกับระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากเบสที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน และการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง อาจไม่มีผลต่อระยะการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนเมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีข้อดีกว่าการตรวจสอบด้วยโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นานกว่าโปรตีน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ ตรวจสอบได้ในเนื้อเยื่อใดๆ ที่มีการเจริญเติบโต ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบได้ทั้งในส่วนที่เป็นยีน และไม่ใช่นัย หรือส่วนที่มีการแสดงออก หรือไม่แสดงออก และครอบคลุมทั้งจีโนม มีวิธีการตรวจสอบมากมาย

9. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง และในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซม หรือ ดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (Variation) ของเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ เกิดภาวะพหุสัณฐาน (Polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ วิธีตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของดีเอ็นเอทำได้โดยหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552) หรือ ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ซึ่งแสดงออกในรูปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาจเป็น Hybridization-based DNA marker เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าสู่ของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Tanksley *et al.*, 1989) หรือ วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์เป็น PCR-based DNA marker เช่น RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้นๆ และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตร ในปี ค.ศ. 1993 เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณโดยอาศัยหลักการพีซีอาร์ (Vos *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอตามลักษณะการข่ม เช่น เครื่องหมายที่มีการข่มสมบูรณ์ (Dominant marker) แสดงลักษณะมี และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ RAPD และ AFLP ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษา โดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้ข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มาก่อน และศึกษาได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (Multi-locus detection) ส่วนเครื่องหมายที่มีการข่มร่วม (Co-dominant marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงการข่มร่วมกัน จึงสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่ RFLP, SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ Microsatellite และ SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอให้จำเพาะกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในจีโนม (Single-locus detection) เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืช และสัตว์อย่างกว้างขวาง

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ค้นพบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Alec John Jeffrey ในปี ค.ศ. 1984 โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งมีลักษณะเฉพาะในแต่ละบุคคล จำนวนซ้ำที่พบมีตั้งแต่ 2 ครั้งไปจนถึง 1,000 ครั้ง ซึ่งจำนวนซ้ำจะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ทำให้เกิดเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ แบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริไดเซชัน ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิม ได้จากการตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้ายแถบดีเอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์แล้วไฮบริไดซ์

กับโพรบที่ติดฉลาก ซึ่งโพรบนี้อาจมาจากดีเอ็นเอส่วนที่จำเพาะกับยีน หรือ ที่เป็นมิโนแซทเทลไลท์ หรือ ไมโครแซทเทลไลท์ เกิดเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับแต่ละบุคคล แถบดีเอ็นเอมีลักษณะเหมือนแท่งแถบรหัส (Bar code) ที่ใช้ในการกำหนดชนิดสินค้า ซึ่งมีความหมายเดียวกับคำว่า DNA profiling หรือ DNA typing ในปัจจุบัน ยังหมายรวมถึง วิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบหลายตำแหน่งพร้อมกัน (Multiplex PCR) โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่มาวิเคราะห์ร่วมกัน หรือ แบบจำเพาะครั้งละหนึ่งตำแหน่ง (Single-locus PCR) (สุรินทร์, 2545; www.rn.ac.th/ranee/genome)

9.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite marker)

ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งต่างๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำ ประกอบด้วย 1-6 เบส เรียงซ้ำติดต่อกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาว ซึ่งชุดที่ซ้ำกันนี้อาจอยู่ติดกันแบบหัวต่อหาง เช่น $(A)_n$, $(CA)_n$, $(TCC)_n$ และ $(GATA)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนชุดซ้ำ โดยมีจำนวนซ้ำ ตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป และไม่เกิน 100 ซ้ำ พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งในจีโนมของโพรแคริโอต และยูแคริโอต (Arie *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002) จากการที่ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้นๆ และไม่ซับซ้อน จึงมีชื่อเรียกอื่นอีกว่า Simple Sequence Repeat (SSR) พบว่า ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์นี้มีการกระจายทั้งจีโนม แต่ไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบน้อย ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลท์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือ ส่วนที่ไม่เข้ารหัสของยีน (Noncoding region) (สุรินทร์, 2552)

ลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ สามารถจำแนกได้ 3 ประเภท (Weber and May, 1990) ดังนี้

1. Perfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่มีลำดับเบส 2 ตัว หรือ มากกว่า เรียงตัวซ้ำกันไปเรื่อยๆ เช่น $(CA)_n$
2. Compound repeat เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่มีลำดับเบสซ้ำหลายชนิด เรียงต่อกัน เช่น $(CA)_n(GT)_n$
3. Imperfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่มีเบสอื่นเข้ามาแทรกในลำดับเบสซ้ำนั้น เช่น $(CA)_n(N)_n(CA)_n$

เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์เป็นลำดับที่มีอัตราการกลายสูงกว่าลำดับเบสทั่วๆ ไป โดยการกลายของไมโครแซทเทลไลต์มักเกิดจากการเพิ่มขึ้น (Insertion) หรือการขาดหายไป (Deletion) ของเบสในชุดซ้ำทั้งชุด ซึ่งต่างจากลำดับเบสทั่วไปที่มักเกิดจากการกลายแบบการแทนที่เบส (Base substitution) การเพิ่มขึ้น หรือ ลดลงของชุดซ้ำมีกลไก 2 แบบ คือ การเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กันขณะเกิดการจำลองโมเลกุล (Slip-strand mispairing) หรือ เรียกว่าเกิด Slippage (Levinson and Gutman, 1987) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน (Unequal crossing over) (Richard and Pâques, 2000)

หน้าที่ของไมโครแซทเทลไลต์ ยังไม่ทราบแน่ชัด พบไมโครแซทเทลไลต์บางชนิดในบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และบางชนิดทำหน้าที่เป็นส่วนนารหัสของยีนด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครแซทเทลไลต์บางชนิดทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (Enhancer) โดยจับกับโปรตีนที่จำเพาะ ซึ่งความผันแปรของจำนวนชุดซ้ำมีผลต่อการทำงานของยีน (Godldstein and Schlötterer, 1999) เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์เป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร มีอัตราการกลายสูง และมีกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม จึงมีการนำดีเอ็นเอส่วนนี้มาใช้ศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002)

การตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การทำ Southern blot hybridization โดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้ายแถบดีเอ็นเอสู่แผ่นเมมเบรน และไฮบริไดซ์กับโพรบที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งวิธีนี้จะตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์โดยใช้โพรบแบบใดแบบหนึ่ง หรือ หลายแบบพร้อมๆ กันได้ นอกจากนี้ยังสามารถดัดแปลงโดยใช้การสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์เพียงชนิดเดียวมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อเปรียบเทียบระยะระหว่างเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ที่เรียกว่า ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) ซึ่ง ISSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันโดยไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสใดๆ ในจีโนมมาก่อน (สุรินทร์, 2549)

การวิเคราะห์ความหลากหลายของจำนวนชุดซ้ำบนไมโครแซทเทลไลต์ เป็นการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ตำแหน่งจำเพาะ ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (Single locus marker) โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับบริเวณลำดับเบสที่ขนานข้างไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (Flanking DNA) ทั้งสองด้าน แยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลพอลิอะครีลาไมด์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารเคมี (Weber

and May, 1989) ในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาก่อน (สุรินทร์, 2552)

วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แบบดั้งเดิมนั้น จะใช้การเตรียมห้องสมุดจีโนม (Genomic library) โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาด 300-1,000 คู่เบสแล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ และคัดเลือกโคลนโดยการไฮบริไดเซชันกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite probe) สกัดพลาสมิด เพื่อหาลำดับเบสที่อยู่บนบั้งกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากได้โคลนที่ให้ผลบวกจำนวนน้อย (He *et al.*, 2003)

ปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่นิยมใช้มี 2 วิธีได้แก่

1. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากข้อมูลลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล เช่น NCBI (The National Center for Biotechnology Information), EMBL (The European Molecular Biology Laboratory) และ DDBJ (DNA Data Bank of Japan) ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่เสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนา เนื่องจากเป็นข้อมูลสาธารณะ ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีข้อมูลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ จำนวนมาก อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัดในสิ่งมีชีวิตที่มีการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมแล้วเท่านั้น

2. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากห้องสมุดจีโนมด้วยวิธี Enrichment โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวกับ Adapter เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และไฮบริไดซ์ชิ้นดีเอ็นเอกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (Biotin) แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย Magnetic bead ที่หุ้มด้วย Streptavidin (Edwards *et al.*, 1996) ซึ่งหลังจากกำจัดดีเอ็นเอส่วนเกินออกไปแล้ว จะมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ 50-90 เบอ์เซ็นต์ ก่อนเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป (Butcher *et al.*, 2002) วิธีการ Enrichment นี้มีประสิทธิภาพสูง และใช้เวลาในการพัฒนาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม เพราะสามารถเพิ่มจำนวนโคลนที่ให้ผลบวกเป็นจำนวนมาก (Billott *et al.*, 2001) จากข้อดีของวิธี Enrichment จึงมีผู้ใช้วิธีนี้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง เช่น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในถั่ว Azuki ด้วยวิธี Enrichment พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณโคลนที่ให้ผลบวกสูงกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 116 เท่า (Wang *et al.*, 2004) ข้อจำกัดของการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์วิธีนี้ คือ มีความยุ่งยาก และเสีย

ค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ได้แล้ว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อยและชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่ต้องมีคุณภาพมากนัก นอกจากนี้ ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีภาวะพหุสัณฐานสูง และยังมีการข่มแบบ Co-dominance จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮโมไซโกต และ เฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อย่างมากมาย (สุรินทร์, 2552)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในพืช

เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง จึงมีการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น

1. การจำแนกพันธุ์พืช ตรวจสอบความบริสุทธิ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในประเทศไทยมีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในมะเขือเทศจำนวน 8 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ สามารถบอกความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ระหว่างพ่อ และแม่ได้ดี (นัญญา, 2545) และใช้จำแนกพันธุ์ข้าวที่มีความหอม (ข้าวดอกมะลิ 105, กข 15 และ กข 6) ออกจากข้าวที่ไม่มีความหอม (ชัยนาท 1) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในตำแหน่ง RM 17 ในจีโนมของข้าว พบว่าข้าวที่มีกลิ่นหอม จะมีจำนวนซ้ำของเบส CT ของเครื่องหมาย RM 17 มากกว่าข้าวที่ไม่มีความหอม โดยข้าวพันธุ์ชัยนาทมีจำนวน 6 ซ้ำ ในขณะที่ข้าวขาวดอกมะลิ 105, กข 15 และ กข 6 มีจำนวน 14, 12 และ 13 ซ้ำ ตามลำดับ (ปรีชา และปิยวรา, 2548) นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบการปลอมปนในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (นฤมล และคณะ, 2547) และในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานในพืชต่างๆ มากมาย เช่น ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (Gupta and Varshney, 2000), ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) (Gimenes *et al.*, 2007), Lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) (Hicks *et al.*, 1998), *Pinus pinaster* Ait. (Mariettea *et al.*, 2001), Brazilian endangered tree (*Caryocar brasiliense*) (Collevatti *et al.*, 1999), *Populus tremuloides* (Rahman *et al.*, 2000), ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) (Paniego *et al.*, 2001), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) (Ashkenazi *et al.*, 2001), ถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) (Gaitán *et al.*, 2002), Peach (*Prunus persica* L.) (Dirle *et al.*, 2002), ถั่วเหลือง (*Glycine max*) (Hossain *et al.*, 2000), Melon (*Cucumis melo* L.)

(Chiba *et al.*, 2003; Ritschel *et al.*, 2004), Avocado (*Persea Americana* Mill.) (Ashworth *et al.*, 2004), *Cannabis sativa* (Alghanim and Almirall, 2003), Almond (*Prunus dulcis*) (Yong *et al.*, 2004), สตรอเบอรี่ (*Fragaria vesca*) (Hadonou *et al.*, 2004), Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) (Tani *et al.*, 2004), แอปเปิ้ล (*Malus pumila* Mill.) (Wunsch, 2006), ส้ม (*Citrus sinensis* L. Osback) (Novelli *et al.*, 2006), *Catharanthus roseus* L. (Shokeen *et al.*, 2007) และ Common elder (*Sambucus nigra*) (Clarke and Tobutt, 2006) เป็นต้น

2. ใช้ในการทำแผนที่ยีน หรือ จีโนม และติดตามยีนที่สนใจ

การที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูง จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด เช่น นำไปใช้ทำแผนที่พันธุกรรม (Genetic map) ในถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) (Gaitán-Solis *et al.*, 2002) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (Gupta *et al.*, 2002) และแตง (*Cucumis sativus*) (Ritschel *et al.*, 2004) รวมทั้งใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการติดตามยีนต่างๆ เช่น ในข้าวสาลีติดตามยีนด้านทานต่างๆ ได้แก่ ยีนด้านทาน Stripe rust หรือ Yellow rust (Fahima *et al.*, 1998; Chagué *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001) ยีนด้านทานโรค Leaf rust (Suenaga *et al.*, 2001; Schnurbusch *et al.*, 2004; Vikal *et al.*, 2004; McCartney *et al.*, 2005; Obert *et al.*, 2005) ยีนด้านทานโรค *Fusarium* head blight (Wei *et al.*, 2005) และยีนด้านทานเชื้อรา Powdery mildew (Chen *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005) นอกจากนี้ ยังมี ยีนด้านทานแมลง Russian wheat aphid (*RWA*) (Miller *et al.*, 2001) ยีนที่ทำให้แคระแกร็น (*Dwarfing gene*) (Korzun *et al.*, 1997; 1998) และยีน *Thermo-sensitive genic male-sterile* (Xing *et al.*, 2003) สำหรับในถั่วเหลืองมียีนด้านทานโรค Frogeye leaf spot (*FLS*) (Yang *et al.*, 2001) และการศึกษาติดตามยีนในข้าว เช่น ยีนด้านทานโรค Sheath blight (Che *et al.*, 2003) ยีนด้านทานโรค Bacterial leaf blight (*BB*) (Rao *et al.*, 2003) ยีน *Fertility-restoring* (*RF*) ในระบบ CMS (Cytoplasmic male sterility) (Tan *et al.*, 2004) ยีนด้านทานแมลง Whitebacked planthopper (*WBPH*) (Kadirvel *et al.*, 2003) และยีน *Premature senescence* (*Pse (t)*) (Li *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการติดตามยีนควบคุมสีของเมล็ดใน *Brassica juncea* (Padmaja *et al.*, 2005) เพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันในเมล็ดให้ดีขึ้น ยีนด้านทานโรค Leaf scald ในข้าวบาร์เลย์ (Genger *et al.*, 2003) และยีนทนต่อดินที่มีอลูมิเนียมสูงในข้าวบาร์เลย์ (Raman *et al.*, 2003) ในข้าวไรย์ (Matos *et al.*, 2005) เป็นต้น

สำหรับในประเทศไทย มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ช่วยในการคัดเลือกพริกที่มีลักษณะด้านทานโรค โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถ

ใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (อรรรัตน์, 2543)

9.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ (ISSR marker)

เป็นเครื่องหมายชนิด PCR-based marker เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแยกสิ่งมีชีวิตในระดับชนิดจนถึงภายในชนิดได้ พัฒนาขึ้นโดย Zietkiewicz ในปี 1994 โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำ หรือ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์เพียงชนิดเดียว ไพรเมอร์ที่ใช้อาจเป็น Di-, Tri-, Tetra- หรือ Penta-nucleotide ได้ เช่น $(AG)_6$ $(TC)_8$ หรือ $(ACG)_4$ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างลำดับเบสชุดซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถี่ของลำดับเบสชุดซ้ำนั้นในจีโนมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์กระจายอยู่ทั่วจีโนม จึงสามารถตรวจสอบจีโนมได้กว้างขวาง แต่ไพรเมอร์ที่ใช้อาจไม่จำเพาะในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ทำให้มีความยาวของชิ้นดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้ง จึงมีการเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 5' หรือ 3' ของไพรเมอร์ (5' or 3' anchored primer) เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสที่ขนาบข้างดีเอ็นเอชุดซ้ำได้ (Zietkiewicz *et al.*, 1994) ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถตรวจสอบได้โดยไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน ตรวจสอบพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และค่าใช้จ่ายในการศึกษาไม่สูงมากนัก และไม่ยุ่งยากซับซ้อน

9.3 Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR)

AS-PCR หรือ PCR amplification of specific allele (PASA) เป็น DNA marker ประเภท PCR-based marker ที่อาศัยเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่สนใจ ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้จะต้องมีข้อมูลลำดับเบสของยีน และตำแหน่งของ Exon และ Intron เพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะให้ครอบคลุมส่วนที่เป็น Intron ของยีน โดยอาศัยพื้นฐานที่ว่าลำดับเบสบริเวณ Intron มีความแตกต่างมากกว่าบริเวณ Exon สามารถตรวจสอบความแตกต่างของขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจล อะกาโรส เรียกเทคนิคนี้ว่า DFLP (DNA Fragment Length Polymorphism) หรือ ตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แตกต่างกันใน Non-denaturing polyacrylamide gel เรียกว่า เทคนิค SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Slabaugh *et al.*, 1997; Hongtrakul *et al.*, 1998) ในบางกรณีอาจนำผลผลิตพีซีอาร์ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนนำมาตรวจสอบโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส เรียก

เทคนิคนี้ว่า PCR-RFLP ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสความแตกต่าง อันเนื่องมาจากผลผลิตพีซีอาร์มี ตำแหน่งจุดตัดที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีการนี้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ และสามารถตรวจสอบการกลายที่เกิดจาก Deletion, Insertion และ Point mutation ที่ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ต่างกันได้

9.4 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานคือการตรวจสอบ ซีนติเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน การเพิ่มปริมาณซีนติเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ Adapter เข้าที่ปลายของซีนติเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย Adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ซีนติเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งลำดับเบสตรงกับส่วนของ Adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนซีนติเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมากและไม่สามารถจะแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีต่างๆ ไปได้ การสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำเอเอฟแอลพีจึงเพิ่มเบสคัดเลือกรวมเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับซีนติเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะ สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้นเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณซีนติเอ็นเอเพียงบางส่วนและสามารถกำหนดจำนวนซีนติเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไป แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่ง เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของซีนติเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (Random fingerprint) ใช้กับดีเอ็นเอใดๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกรวมที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (Reproducible) และสามารถเลือกกลุ่มสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลง

เบส (Point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปได้หรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มี การเพิ่มเบสเพื่อคัดลอกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาใน ระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบ ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของ แถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพีจีมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะเด่น (Dominance) โดยปรากฏเป็น การมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วม (Co-dominance) โดยปรากฏเป็นแถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพีจีจัดเป็นแบบที่เป็นลักษณะข่ม มากกว่า (สุรินทร์, 2552) การใช้ประโยชน์จากเทคนิคเอเอฟแอลพีจี มีการนำเทคนิคเอเอฟแอลพีจีมา ใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเทคนิคเอเอฟแอลพีจีมีข้อได้เปรียบกว่าเทคนิคอื่นๆ คือ ไม่ ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอพีดี จึงทำได้อย่างกว้างขวาง ทำให้ รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย ทำให้เกิด Polymorphism ได้จำนวนมาก สามารถ ใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี เช่นวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และการจำแนกสายพันธุ์ยางพาราพันธุ์ปลูก (สุนิดา มะยูโซ๊ะ, 2549) ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของ สิ่งมีชีวิต บ่งชี้ลักษณะเพศและความหลากหลายทางชีวภาพของปรงสกุล Cycas และ Zamia (สจี, 2547)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างปลับปลิงธารและพืชในวงศ์ Amaryllidaceae ที่ใช้ในการศึกษา

รวบรวมปลับปลิงธารจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้แก่ คลองกำพรวน คลองบางปรู คลองนาคาในจังหวัดระนอง และคลองเตริยม คลองตาผูด คลองคุระในจังหวัดพังงา โดยระยะห่างในการเก็บตัวอย่างประมาณ 1 เมตร และจากแหล่งจำหน่ายพันธุ์ได้แก่ บริษัทไวท์เครน และตลาดจตุจักร รวมทั้งตัวอย่างปลับปลิงธารจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง และพืชชนิดอื่นในวงศ์ Amaryllidaceae รวมจำนวน 115 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
ปลับปลิงธาร (<i>Crinum thaianum</i>)	
1. คลองเตริยม จังหวัดพังงา	15
2. คลองตาผูด จังหวัดพังงา	16
3. คลองคุระ จังหวัดพังงา	3
4. คลองกำพรวน จังหวัดระนอง	1
5. คลองบางปรู จังหวัดระนอง	2
6. คลองนาคาจังหวัดระนอง	5
7. บริษัทไวท์เครน	30
8. สวนจตุจักร	35
9. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง	3
พืชชนิดอื่นในวงศ์ Amaryllidaceae	
10. ปลับปลิงขาว (<i>C. asiaticum</i>) สวนจตุจักร	1
11. ปลับปลิงดินเปิด (<i>Hymenocallis littoralis</i>) สวนจตุจักร	1
12. ปลับปลิงแดง (<i>C. amabile</i>) สวนจตุจักร	1
13. <i>C. Nathans</i> บริษัทไวท์เครน	1
14. ปลับปลิงหนู (<i>Hymenocallis</i> sp.) สวนจตุจักร	1
รวม	115

2. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 2.1 โกร่งบดตัวอย่าง
- 2.2 เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง และบีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- 2.3 เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น KS 125B บริษัท IKA Labortechnik Stufen, Germany
- 2.4 เครื่องคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่อกับ Internet
- 2.5 เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) และภาพถ่าย (Gel documentation) รุ่น DOC-PRINT-1000/26M บริษัท Vilber Lourmat, France
- 2.6 เครื่องชั่งตวงวัด 3 ตำแหน่ง รุ่น AR 2130 บริษัท AdventurerTM, USA
- 2.7 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น PTC-100TM บริษัท MJ Research, USA
- 2.8 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 บริษัท Sigma, Germany, เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (Microcentrifuge) รุ่น 1010 บริษัท Century Scientific, England
- 2.9 เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Lamda UV/VIS spectrophotometer บริษัท Perkin Elmer, USA
- 2.10 ชุดเครื่องมือ Agarose gel electrophoresis
- 2.11 ชุดเครื่องมือ Acrylamide gel electrophoresis รุ่น Protein®II xi cell บริษัท Biorad, USA
- 2.12 ตู้เย็น รุ่น TH-890 บริษัท Sharp ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (บริษัท Mirage และ ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส รุ่น 8558 S/N 86939-206 Bio-freezer® บริษัท Forma Scientific, USA
- 2.13 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้ (Oven) บริษัท Gallenkamp, Japan
- 2.14 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Gilson, France พร้อม tip ขนาด 10, 200, 1,000 ไมโครลิตร
- 2.15 หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko, Japan
- 2.16 หลอดพลาสติก (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml) บริษัท Ward Medic, USA และหลอดใส่น้ำขนาด 15 ml
- 2.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Memmert, Germany
- 2.18 หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube) บริษัท Ward Medic, USA

2.19 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระดาษขึงสาร ช้อนตักสาร ปากกิบ ถุงมือ ถุงพลาสติก แผ่นพลาสติกใส แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถาดพลาสติก และแผ่น Cellophane เป็นต้น

3. โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

3.1 โปรแกรม BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, n.d. a.)

3.2 โปรแกรม ClustalW เวอร์ชัน 1.82 (Thomson *et al.*, 1994)

3.3 โปรแกรม TFGA เวอร์ชัน 1.3 (Tools for Population Genetic Analyses) (Miller, 1997) เพื่อใช้คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity) ดังนี้

1. ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed heterozygosity, H_o) คำนวณได้ดังสมการที่ 1

$$H_o = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \quad (1)$$

2. ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง (Expected heterozygosity, H_e) (Nei, 1978) คำนวณได้ดังสมการที่ 2 และ 3

$$h_k = 2n(1 - \sum X_i^2)/2n-1 \quad (2)$$

$$H_e = \sum h_k/r \quad (3)$$

เมื่อ h_k คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ตำแหน่ง k

X_i คือ ความถี่ของอัลลีล i ที่ตำแหน่ง k

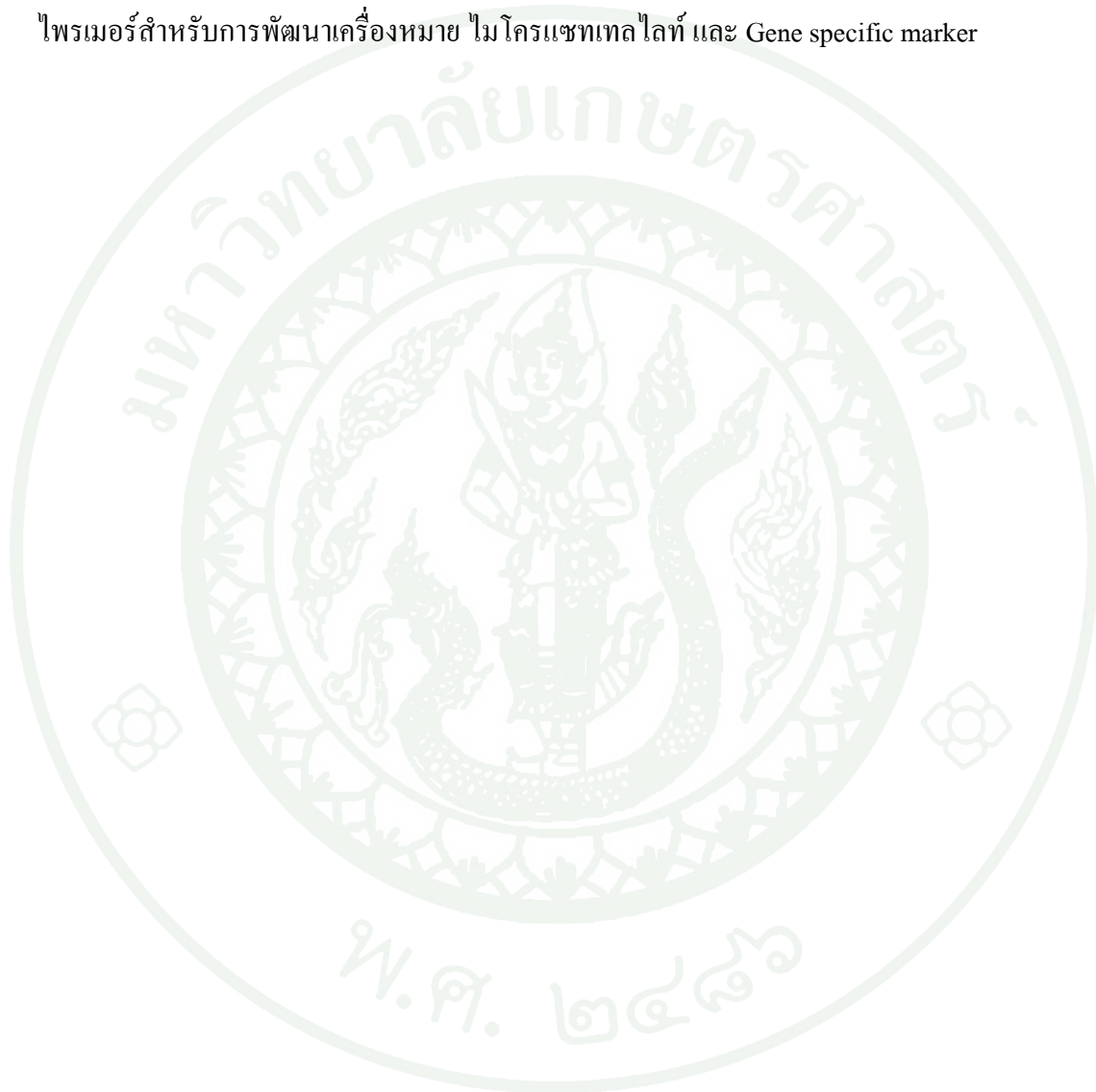
n คือ จำนวนอัลลีลที่ตำแหน่ง k

r คือ จำนวนตำแหน่งที่ทำการศึกษา

H_e คือ ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีต่อตำแหน่ง

3.3 โปรแกรม NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-pc เวอร์ชัน 2.20k) ใช้ในการสร้าง Dendrogram จากข้อมูลการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

3.4 โปรแกรม FastPCR (<http://fast-pcr.software.informer.com/6.2/>) ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการพัฒนาเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์ และ Gene specific marker



วิธีการ

1. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากปลับลึงธาร

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนปลับลึงธาร โดยใช้วิธีประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1990) มีวิธีการดังนี้

นำใบอ่อนปลับลึงธารน้ำหนักประมาณ 2 กรัม มาบดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ตักตัวอย่างใส่ในสารละลายของ 3X CTAB (3% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1% polyvinylpyrrolidone: PVP) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เดิมสารละลาย Beta-mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว และเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ดูดสารละลายใสส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร (ได้ประมาณ 6 หลอด) และเติม 10% CTAB (in 0.7 M NaCl) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน 300 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร โดยรวมสารละลายให้ได้ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใน 1 หลอด จากนั้นเติมเอทานอลสัมบูรณ์ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ้าดีเอ็นเอปริมาณมากใช้หลอดดูดปลายแหลมหัวงอเกี่ยวดีเอ็นเอ (DNA hook) ใส่หลอดใหม่ ถ้าดีเอ็นเอมีปริมาณน้อยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนสารละลายใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนอีกครั้งด้วย 90% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งอีกครั้ง คว่ำหลอดบนกระดาษ ซับให้แห้ง หรือ ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนใน TE buffer (10:0.1 = 10 mM Tris PH 8.0: 0.1 mM EDTA) 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตะกอนละลายเร็วขึ้น จากนั้นเติมเอนไซม์ RNase (10 mg/ml) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดย

วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง และตรวจสอบด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer ถ้าอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.6-1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ หากมีค่าต่ำกว่า 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน แต่ถ้าค่าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ การดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตของกรดนิวคลีอิกจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 20 หน่วย (A_{260}) ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้จาก

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (mg/ml)} = A_{260} \times 1/20$$

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 1/20 \times 1000$$

$$= A_{260} \times 50$$

กรณีที่ใส่สารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ต่อน้ำกลั่น 297 ไมโครลิตร) ในการตรวจสอบด้วยเครื่อง Spectrophotometer จะสามารถคำนวณปริมาณกรดนิวคลีอิกในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร ได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \times 100$$

1.2 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ออกแบบ

แยกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ ตามวิธีประยุกต์จาก Yaish and Vega (2003) โดยวิธีการดังนี้

1.2.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของปลิงปลิงธาร มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ (200ng/ μ l) 0.5 ไมโครลิตร 10X Reaction buffer 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* (10 U/ml) 1.0 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1

เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 µg/ml) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet, UV) บันทึกผลที่ได้

1.2.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ Adaptor โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดย สมบูรณ์ มาเชื่อมต่อเข้ากับ *MseI* adapter (ตารางที่ 4) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 48.0 ไมโครลิตร *MseI* adapter (12.5 pmol/µl) 8.0 ไมโครลิตร 10X T_4 ligase buffer 4 ไมโครลิตร T_4 DNA ligase (1 U/µl) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 2 ชั่วโมง

1.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ โดยนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ Adapter แล้ว มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 20.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ M1 (5' GACGATGAGTCCTGAG 3', 5 pmol/µl) 4.0 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 6.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer ((200 mM Tris-HCL pH 8.4 และ 500 mM KCl) 6.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 0.6 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 U/µl, Invitrogen Life Technology, Brazil) 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 60 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ ขั้นที่ 1 Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 3 Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสใน เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสง อัลตราไวโอเลต

1.2.4 การแยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาทำ ไฮบริไดเซชันกับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) ทางด้านปลาย 5' โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก เป็น Dinucleotide repeat จำนวน 2 ชนิด คือ $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ และกลุ่มที่สอง เป็น Trinucleotide repeat 2 ชนิด คือ $(CCT)_{10}$ และ $(ACC)_{10}$ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ ชนิดต่างๆ โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.3 ปริมาตร 56.0 ไมโครลิตร Biotinylated oligo (5 pmol/µl) ซึ่งประกอบด้วย B- $(CA)_{15}$ และ B- $(GA)_{15}$ สำหรับ Dinucleotide repeat หรือ B- $(CCT)_{10}$ และ B- $(ACC)_{10}$ สำหรับ Trinucleotide repeat ชนิดละ 2.0 ไมโครลิตร และ Hybridization buffer (6X SSC, 0.1% SDS) 40.0 ไมโครลิตร โดยเตรียมจาก Stock 20X SSC (Standard saline citrate

buffer) (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, Vivantis, Republic of Poland) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

1.2.5 การเตรียม Magnetic beads โดยดูด Magnetic beads ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Binding and washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันวางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ระวังอย่าดูด Magnetic beads ติดออกไป) (ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง) หลังจากดูดสารละลายออกหมดแล้ว จึงเติม Hybridization buffer ลงไป 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2.6 การทำปฏิกิริยาระหว่างโพรบกับ Magnetic beads โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอ จากข้อ 1.2.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Beads จากข้อ 1.2.5 ผสมให้เข้ากันแล้วบ่ม ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง (ผสมให้เข้ากันทุก 30 นาที)

1.2.7 การชะดีเอ็นเอออกจาก Beads โดยนำหลอดจากข้อ 1.2.6 วางลงในแท่นแม่เหล็กตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก เติมสารละลาย 2X SSC และ 0.1% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) จากนั้นเติมสารละลาย 1X SSC และ 0.1 % SDS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) และเติมสารละลาย 1X SSC และ 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) ล้างดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก Magnetic beads โดยเติม TE buffer (10:0.1) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงไปแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดใหม่อย่างรวดเร็ว

1.2.8 การทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายคู่ และเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเติมสารละลาย ดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.7 ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ M1 (5 pmol/μl) 1.33 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร MgCl₂ (50 mM) 0.8 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 U/μl) 0.5 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำเข้า

เครื่องพีชีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับข้อ 1.2.3 ตรวจสอบผลผลิตพีชีอาร์ที่ได้ โดยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิสในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสง UV และนำผลผลิตพีชีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยาลำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan)

1.2.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด โดยเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T Vector (Promega, USA) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.8 ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร 2X Ligation buffer 5.0 ไมโครลิตร พลาสมิด pGEM®-T Vector 1.0 ไมโครลิตร T₄ DNA ligase (400,000 U/μl, Fermentas, USA) 1.0 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

1.2.10 การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เดิมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีคอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (Heat shock) โดยจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย LB medium ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย คัดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือประมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน และคัดสารละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (Spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 2% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D galactoside) และ 20% IPTG (Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2.11 คัดเลือกโคโลนีสีขาว โดยเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วคัดสารละลายเซลล์ไปตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่สอดคล้องด้วยวิธีพีชีอาร์ ตรวจสอบโคลนที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization โดยตัดแผ่นไนลอนเมมเบรน ขนาด 8 x 12 ตารางเซนติเมตร และตัดกระดาษกรองให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นไนลอนเมมเบรนเล็กน้อย จุ่มไนลอนเมมเบรนลงในน้ำกลั่นให้เปียกทั่วทั้งแผ่น แล้วจุ่มลงในสารละลาย 20X SSC วางแผ่นไนลอนเมมเบรนลงบนกระดาษกรองเพื่อขับน้ำออกพองหมาดๆ จากนั้นจึงวางแผ่นไนลอนเมมเบรนลงบนพลาสติกใส ที่มีตำแหน่งของจุดที่จะทำการหดยดีเอ็นเอ นำผลผลิตพีชีอาร์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อได้ดีเอ็นเอเสียสภาพเป็นสายเดี่ยว แล้วย้ายหลอดใส่ในน้ำแข็งทันที เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันของดีเอ็นเอเป็น

สายคู่อีก และดูผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นเมมเบรนไนลอนที่เตรียมไว้แล้ว จากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับแผ่นเมมเบรนไนลอนโดยใช้แสง UV เป็นเวลา 10 นาที นำมาทำไฮบริดเชชันที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ Biotinylated oligo เป็นโพรบ และตรวจสอบผลโดยใช้ชุดตรวจสอบ Nortg2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit (Pierce Biotechnology, USA)

1.2.12 คัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกมาสกัดพลาสมิด ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) แล้วส่งพลาสมิดไปหาลำดับเบส

1.2.13 วิเคราะห์ลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมส่วน ไมโครแซทเทลไลต์ โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นมีความยาว 19-23 เบส และคำนวณค่า T_m ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้มีค่าใกล้เคียงกัน คัดเลือกไพรเมอร์ โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ มาตรวจสอบกับจีโนมิกดีเอ็นเอของปลับปลิงธาร 2 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/ μ l) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Forward (5 pmol/ μ l) 1.25 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Reverse (5 pmol/ μ l) 1.25 ไมโครลิตร dNTP (2mM) 0.625 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 0.375 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 1 รอบ สำหรับการคลายเกลียว และแยกสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที และ 35 รอบ สำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ในรอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ มาตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของปลับปลิงธารทั้งหมด

1.2.14 ตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลพอลิอะครีลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Caetano-Anolles (1997)

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธารโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ไอเอสเอสอาร์

ทดสอบเบื้องต้นว่า ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยใช้ไอเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ ทั้งหมด 16 ชนิด กับพลับพลึงธาร 2 ตัวอย่าง คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และชัดเจนจำนวน 6 ชนิด มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/μl) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 pmol/μl) 1.25 ไมโครลิตร dNTP (2mM) 0.75 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1.25 ไมโครลิตร MgCl₂ (50 mM) 1.00 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบ สำหรับการคลายเกลียว และแยกสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที และ 35 รอบ สำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที ในรอบสุดท้าย เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที แล้วย้อมเจลด้วย เอธิเดียมโบรไมด์

3. การพัฒนาเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับยีนในพลับพลึงธาร

3.1 การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนในพลับพลึงธาร

การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ทั้งหมด 7 ยีน ได้แก่ *NADH dehydrogenase subunit F (ndhF)*, *Acetyl-CoA carboxylase beta subunit (accD)*, *NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 7 (ndhH)*, *NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 1 (ndhA)*, *Photosystem I P700 apoprotein A2 (psaB)*, 18srDNA และ 26srDNA โดยเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสรูปแบบ Fasta ของยีนที่พบในพืชกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับพลับพลึงธาร โดยค้นหาใน Entrez <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> นำลำดับเบสของยีนต่างๆ ที่รวบรวมมา Alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW 1.82 จาก <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> ของสถาบัน European Bioinformatics Institute (EBI) ประเทศอังกฤษ ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนทั้งหมด โดย

ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความยาวประมาณ 20-23 เบส มีค่า T_m ใกล้เคียงกันทั้ง 2 ทิศทางคือ Forward (F) และ Reverse (R) primers ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนในลำดับพันธุกรรมที่พัฒนาจากข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูล

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	Annealing temperature (°C)	ความยาว (~bp)
1. <i>ndhF</i>	F: GGACTTCTGCTTATTCGG R: GGCTAATCCTCTTACACCC	55	1,762
2. <i>accD</i>	F: GGACATAGTGGTGGGAAGTG R: GGAAAGAAACCGTGGAGCTG	55	1,094
3. <i>ndhH</i>	F: ATGGGTCCTCACCACCCA R: TCATGATATCAGCCAATTTTC	61	1,006
4. <i>ndhA</i>	F: CGACAGAAATAGAAGTACAAGCT R: AAAGAAATTTCCACCCAAG	59	937
5. <i>psaB</i>	F: GCTCAGGATCCCACTACTCGTCGT R: CCTGATGTAGAGGCAATC	62	2,060
6. 18srDNA	F: CGACTTTTGAAGGGATGCA R: GGCAAATGCTTTCGCAGTTG	65	769
7. 26srDNA	F: TCAGGTGGGGACACCCGCTGAGT R: AGAGGGACCGTTCCGCATCCGAC	61	453

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของลำดับพันธุกรรมจำนวน 77 ตัวอย่าง และพืชในวงศ์เดียวกับลำดับพันธุกรรม (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ได้แก่ ลำดับพันธุกรรม (*C. asiaticum* L.) ลำดับพันธุกรรม (*Hymenocallis littoralis* Salish.) ลำดับพันธุกรรม (*C. amabile* Don.) *C. nathans* และ ลำดับพันธุกรรม (*Hymenocallis* sp.) (ภาพที่ 2) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย จีโนมิกดีเอ็นเอ (100 ng/ μ l) 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 pmol/ μ l) จำนวนชนิดละ 2.0 ไมโครลิตร dNTP (2mM) 1.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 1.0 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 25.0 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบ สำหรับการคลายเกลียว และแยกสาย ดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และ 35 รอบ สำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ

ดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing temperature (ประมาณ 55-65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับชนิดของไพรเมอร์) นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2.0 นาที ในรอบสุดท้าย เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที



<http://frynn.com/%E0%B8%9E%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B8%9A%E0%B8%9E%E0%B8%A5%E0%B8%B6%E0%B8%87/>

ภาพที่ 2 พืชในวงศ์เดียวกับปลับปลิงธรร (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยีน

3.3 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยเทคนิคดีเอฟแอลพี และ พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (DFLP marker) และตัดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ได้แก่ *MseI*, *StyI*, *AhaI*, *HaeIII*, *RsaI*, *BclI*, *EcoRI* และ *HpaII* ก่อนตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (PCR-RFLP marker) ใน 1X TBE buffer (Tris base 10.8 g, Boric acid 5.5 g และ 500 mM EDTA pH 8.0 4 ml) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

4. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลับปลิงธาร

4.1 ย่อยดีเอ็นเอของปลับปลิงธารด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ เอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (5'-GAATTC-3') และเอนไซม์ *MseI* ซึ่งมีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำขนาด 4 คู่เบส (5'-TTAA-3') แล้วเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอทั้งสองด้านด้วย Adapter 2 ชนิด คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter (ตารางที่ 3)

4.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 2 ขั้นตอน ดังนี้

4.2.1 Preselective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เฉพาะส่วนที่ต้องการ โดยนำดีเอ็นเอที่ต่อกับ Adapter เรียบร้อยแล้วมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI* และ ไพรเมอร์ *MseI* ที่ต่ออยู่กับเบส 1 ตัวที่ปลาย 3' (primer E+1, primer M+1) (ตารางที่ 4) ซึ่งในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จะประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อ Adapter 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ E+1 (E-A) (5 pmol/μl) 1.0 ไมโครลิตร และ ไพรเมอร์ M+1 (M-C) (5 pmol/μl) 1.0 ไมโครลิตร dNTP (2mM) 2.5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร MgCl₂ (50 mM) 0.75 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 25.0 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 25 รอบ สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ผลที่ได้จากการทำ Preselection amplification คือจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *EcoRI* และอีกปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *MseI* ในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้ถึง 16 เท่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ในขั้นตอนนี้จะเป็ยดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ Selective amplification ต่อไป จากนั้นแบ่งส่วนของสารละลายมาตรวจสอบในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และเจือจาง 20 เท่าด้วย TE buffer (10:0.1) เพื่อเป็นต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นต่อไป

4.2.2 Selective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI* และ ไพรเมอร์ *MseI* ที่ต่ออยู่กับเบส 3 ตัวที่ปลาย 3' (primer E+3, primer M+3) (ตารางที่ 4) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จะประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Preselective amplification 5.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ E+3 (E-ANN, 5 pmol/μl) 1.0 และ

ไพรเมอร์ M+3 (M-CNN, 5 pmol/μl) 1.0 ไมโครลิตร dNTP (2mM) 2.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร MgCl₂ (50 mM) 0.60 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20.0 ไมโครลิตร ใช้โปรแกรม Touch down 1 รอบ โดยขั้นที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิในขั้น Annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 35 รอบ ของขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นแบ่งผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ นำผลผลิตพีซีอาร์มาเติม AFLP loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol และ 0.1% xylene cyanol) จำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่พร้อมสำหรับทำ Polyacrylamide gel electrophoresis

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ และ Adapter ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปลับลึงธาร โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

ชื่อไพรเมอร์/Adapter	ลำดับเบสของไพรเมอร์/Adapter
<i>Eco</i> RI adapter	5' -CTCGTAGACTGCGTACC- 3' 3' -CATCTGACGCATGGTTAA- 5'
<i>Mse</i> I adapter	5' -GACGATGAGTCCTGAG- 3' 3' -TACTCAGGACTCAT- 5'
Primer E+1 (E-A)	5' -GACTGCGTACCAATTCA- 3'
Primer M+1 (M-C)	5' -GATGAGTCCTGAGTAAC- 3'
Primer E+3 (E-AAC)	5' -GACTGCGTACCAATTCAAC- 3'
Primer E+3 (E-ACC)	5' -GACTGCGTACCAATTCAACC- 3'
Primer E+3 (E-ACG)	5' -GACTGCGTACCAATTCAACG- 3'
Primer E+3 (E-AGG)	5' -GACTGCGTACCAATTCAAGG- 3'
Primer M+3 (M-CAA)	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAA- 3'
Primer M+3 (M-CAG)	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAG- 3'
Primer M+3 (M-CAT)	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAT- 3'
Primer M+3 (M-CTA)	5' -GATGAGTCCTGAGTAACATA- 3'
Primer M+3 (M-CTG)	5' -GATGAGTCCTGAGTAACCTG- 3'

4.3 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย Denaturing polyarylamide gel

เตรียมกระจกสำหรับเทเจล ทำความสะอาดกระจกทั้งสองแผ่นด้วย 95% เอทานอล แล้วเช็ดกระจกแผ่นตรงด้วย Bind silane (Bind silane (Plusone, 1 μ l, Glacial acetic acid 2 μ l และ Ethanol 500 μ l) แล้วเช็ดกระจกแผ่นหุกระต่ายด้วย Repel silane (Plusone,) ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด วาง Spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่าง โดยหันด้านที่ทา Bind silane และ Repel silane เข้าหากัน เตรียม Denaturing polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย Urea 27 กรัม, 10X TBE 6 มิลลิลิตร, 10% Ammonium persulfate 400 ไมโครลิตร, TEMED 100 ไมโครลิตร, 30% Acrylamide (29% Acrylamide และ 1% Methylene bisacrylamide) 9 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 30 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน เทเจลลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หัวลงไปด้านบน ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ดึงหัวออก และประกอบเข้าชุดกับ Sequencing gels เติมน้ำละลาย 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายไฟ จากนั้น Pre-run ด้วยความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ นาน 20-30 นาที แล้วปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างผิวหน้าของเจล นำตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละช่อง เปิดเครื่องจ่ายไฟโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิม เป็นเวลาประมาณ 2.5 ชั่วโมง ปิดเครื่องจ่ายไฟ ดูดบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออกให้หมด นำกระจกออก และนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรด ซึ่งคัดแปลงมาจากวิธีของ Caetano Anolles (1997) เพื่อให้แถบดีเอ็นเอปรากฏ นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย Fixative (10% Acetic acid) เป็นเวลา 5 นาที เช่าเบาๆ แล้วนำแผ่นกระจกมาย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรด ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (10 วินาที) เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรดส่วนเกินออก ย้ายแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย Developer (2.5% Sodium carbonate, 0.02% Formaldehyde และ 0.002% Sodium thiosulfate) เมื่อแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลใส่ใน Stop solution (5% Acetic acid และ 3% Glycerol) เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้งในอากาศ เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อ

5. การวิเคราะห์ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ไอเอสเอสอาร์ ฟิชอาร์-อาร์เอฟแอลพี และเอฟแอลพี

บันทึกแถบดีเอ็นเอของพลับพลึงธารที่ปรากฏบนลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ไอเอสเอสอาร์ ฟิชอาร์-อาร์เอฟแอลพี และเอฟแอลพี อ่านแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจลและบันทึกเป็นสัญลักษณ์ โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้สัญลักษณ์เป็น

“+” หรือให้คะแนนเป็น “1” ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น “-” หรือให้คะแนนเป็น “0” เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด ในการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเกิดปัญหาได้บ่อยๆ เช่น แถบดีเอ็นเอในบางแถวอาจหรือไม่ชัดเจนหรือตำแหน่งอาจคลาดเคลื่อนจากกันเนื่องจากเจตเกิด smile อันมีสาเหตุจากแถบดีเอ็นเอแถวที่อยู่ด้านนอกเคลื่อนที่ไปช้ากว่าแถบดีเอ็นเอที่อยู่แถวกลาง เป็นต้น ในกรณีดังกล่าวนี้ ถ้าแถบดีเอ็นเอในแถวใดไม่ชัดเจนไม่อาจบอกได้แน่ชัด ให้ตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปไม่ต้องนำมาคิด การให้คะแนนหรือตรวจดูแถบดีเอ็นเอนี้อาจดูด้วยสายตาหรือใช้เครื่องอ่านก็ได้ เปรียบเทียบความเหมือนของแบบของดีเอ็นเอที่จากแต่ละคู่โดยใช้ค่า similarity index (S) ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 4

$$S = 2 \times N_{ab} / (n_a + n_b) \quad (4)$$

เมื่อ n_a = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a
 n_b = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง b
 N_{ab} = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง

โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดย 0 คือ ทั้งสองตัวอย่างไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเลยและ S=1 หมายถึงทั้งสองตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด (สุรินทร์, 2545) ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k คำนวณความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธารและคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างพลับพลึงธารกับพืชในวงศ์เดียวกัน (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด และสร้างแผนภูมิพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Clustal analysis) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณทางสถิติเพื่อให้ทราบข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละแหล่งด้วย TFPGA (Tool for Population Genetic Analysis) computer software, version 1.3 (Miller, 1997) และการคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Genetic similarity: GS) ใช้วิธีของ Nei and Li (1978) ดังสมการที่ 5

$$S_{ij} = \frac{2a}{a + b + c} \quad (5)$$

เมื่อ S_{ij} = ค่า similarity ระหว่างพันธุ์ i และพันธุ์ j
 a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์
 b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ i แต่ไม่พบในพันธุ์ j

c_j = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ j แต่ไม่พบในพันธุ์ i

คำนวณค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ของแต่ละแถบดีเอ็นเอ หรือแต่ละ Marker ค่า PICs เป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ที่เลือกมาแบบสุ่ม กรณีของ Dominant marker และเป็นค่าที่บอกโอกาสของการพบตัวอย่างที่เป็น เฮเทอโรไซโกต กรณีของ Co-dominant marker ดังสมการที่ 6

$$PIC = 1 - \sum_{i=1} P_i^2 \quad (6)$$

โดย P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i สำหรับ Co-dominant marker และ P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่งประกอบด้วย P_a (Absent allele) และ P_p (Present allele) สำหรับ Dominant marker

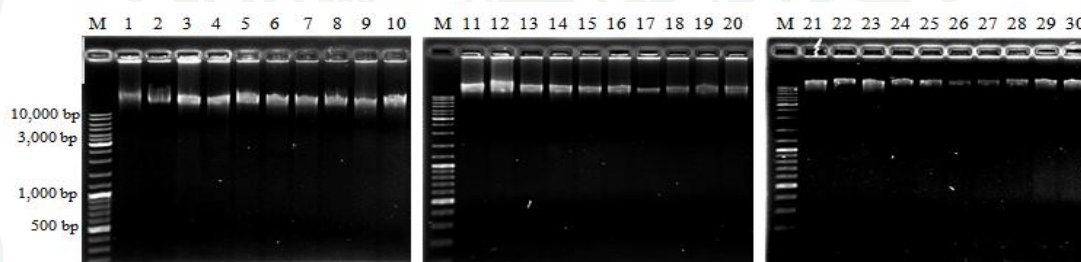
6. การและวิเคราะห์ลำดับเบส

วิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วน (Partial sequence) ของยีนของปลับปลิงธาร จากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม และส่งไปหาลำดับเบส (1st BASE, Malaysia) วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่โคลนได้จากปลับปลิงธารเปรียบเทียบกับพีซีอาร์อื่นที่มีข้อมูลยีนในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 5.0.6 (www.mbio.ncsu.edu) และ MEGA version 6.0.5 (Tamura *et al.*, 2013) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปลับปลิงธารกับพีซีอาร์ต่างๆ สร้าง Phylogenetic tree เพื่อจัดกลุ่มโดย Maximum likelihood (ML) และประเมินความเชื่อมั่นโดยการทำ Bootstrap 1,000 ครั้ง

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากปลับพลิงธาร

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนปลับพลิงธาร จำนวน 110 ตัวอย่าง และพืชในวงศ์เดียวกับ ปลับพลิงธาร (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ได้แก่ ปลับพลิงขาว ปลับพลิงดินเบ็ด ปลับพลิงแดง *C. nathans* และ ปลับพลิงหนู วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) โดยมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.8-1.9 พบว่าได้ ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี มีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอและโปรตีนเล็กน้อย (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ตัวอย่าง Genomic DNA ที่สกัดจากใบอ่อนปลับพลิงธาร ตัวอย่างที่ 1-30

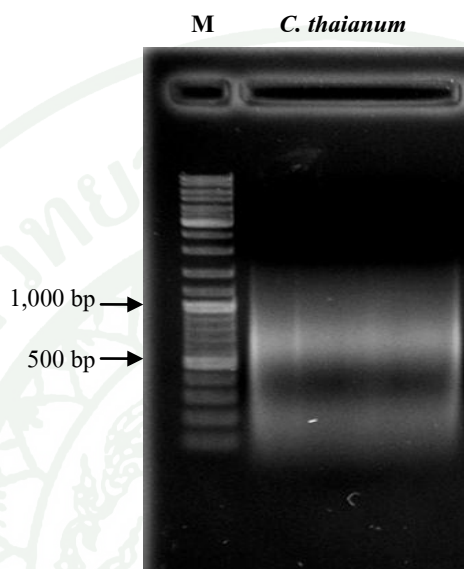
(M = DNA ladder mix)

2. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับปลับพลิงธาร

2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอตัวอย่างปลับพลิงธาร (ทดลองเตรียม จังหวัดพังงา หมายเลข 8) (ภาคผนวกที่ 1) มาพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับแถบมาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นสูง (ภาพที่ 4) และมีค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง $A_{260}:A_{280}$ 1.87 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ นำดีเอ็นเอของปลับพลิงธาร มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะ Smear แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอถูกตัดโดยสมบูรณ์ ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 200-1,000 คู่เบส นำ

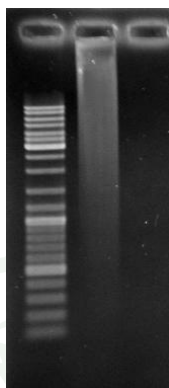
จีนดิเอ็นเอที่ตัดได้มาต่อเข้ากับ *MseI* adapter ตรวจสอบการเชื่อมต่อระหว่างจีนดิเอ็นเอกับ Adapter ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีลำดับเบสของ Adapter เป็นไพรเมอร์ เมื่อตรวจสอบผลด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่ามีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นแสดงว่าจีนดิเอ็นเอสามารถเชื่อมต่อกับ Adapter ได้ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 จีนดิเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* และต่อด้วย Adapter หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (M = DNA ladder mix)

คัดเลือกจีนดิเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบ ไมโครแซทเทลไลต์ด้วยกระบวนการ Enrichment โดยการไฮบริดซ์กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ ดังนี้ Dinucleotide repeat 2 ชนิด คือ $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ และ Trinucleotide repeat 2 ชนิด คือ $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ โดยโพรบแต่ละชนิดจะติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) จึงสามารถแยกจีนดิเอ็นเอที่เกาะกับโพรบได้ เมื่อทำปฏิกิริยากับ Streptavidin ที่เคลือบบน Magnetic bead เมื่อได้จีนดิเอ็นเอเป้าหมายแล้วนำมาเพิ่มปริมาณ และทำให้เป็นสายคู่ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 5) นำดิเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการ Enrichment เพื่อคัดเลือกเฉพาะจีนดิเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์

M DNA



ภาพที่ 5 ดีเอ็นเอที่ไฮบริดซ์กับไบโอตินโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ $(CA)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (M = DNA ladder mix)

2.2 การสร้างห้องสมุดจีโนม

เชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิด แล้วถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชัน พบว่าได้โคลนจากห้องสมุดจีโนมที่ใช้ Dinucleotide repeat และ Trinucleotide repeat เป็นโพรบ จำนวน 435 โคลน คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Colony PCR) ได้จำนวน 429 โคลน คิดเป็น 98.6 เปอร์เซ็นต์ ของโคลนที่สุ่มเลือกมาทั้งหมด ตรวจสอบการมีชิ้นดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ในแต่ละโคลน โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ไปหยดลงบนเมมเบรนไนลอนเพื่อทำ Dot blot hybridization เลือกโคลนที่สามารถไฮบริดซ์กับโพรบที่เป็นชุดซ้ำได้ชัดเจน บนแผ่นฟิล์มทั้งหมด 66 โคลน คิดเป็น 15.39 เปอร์เซ็นต์ของโคลนที่นำมาทำ Dot blot hybridization จากนั้นนำโคลนที่ให้ผลบวกจากการทำ Dot blot hybridization มาสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ และส่งหาลำดับเบส สามารถนำลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ มาจำแนกเป็นกลุ่ม คือ Dinucleotide repeat, Trinucleotide repeat และ Compound repeat และพัฒนาไพรเมอร์ได้จำนวนทั้งสิ้น 26 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 5 และ 6)

ตารางที่ 5 จำนวนโคลนที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ชั้นต่างๆ
จากห้องสมุดจีโนม

ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์	จำนวนที่ได้จากการ ทำห้องสมุดจีโนม	เปอร์เซ็นต์ที่ได้จาก การทำห้องสมุดจีโนม
1. จำนวนโคลนที่ได้จากการ ทรานสฟอร์มเมชัน	435	
2. จำนวนโคลนที่คัดเลือกได้จากการตรวจสอบ ด้วยวิธีพีซีอาร์	429	98.6
3. จำนวนโคลนที่ให้ผลบวกจากการ ตรวจสอบด้วยวิธี Dot blot hybridization	66	15.39
4. จำนวนโคลนที่ส่งหาลำดับเบส	66	
5. จำนวนไพรเมอร์ที่ออกแบบได้	26	39.4

เมื่อพิจารณาลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่างๆ (ตารางที่ 6) พบลำดับเบสชนิด Dinucleotide repeat มากที่สุด คิดเป็น 58 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น Compound repeat คิดเป็น 35.49 เปอร์เซ็นต์ และ Trinucleotide repeat คิดเป็น 6.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ที่พบมากที่สุดเป็น Dinucleotide repeat ชนิด (TG)_n คิดเป็น 35.49 เปอร์เซ็นต์ ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด จากรายงานการสำรวจลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่างๆ พบว่า ในพืชส่วนใหญ่มีลำดับเบสซ้ำเป็นชนิด (AT)_n มากที่สุด รองลงมาก็คือ (GA)_n และ (CA)_n ตามลำดับ (Wang *et al.*, 1994; Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante and Oliveiri, 1993) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ชนิด (AT)_n เนื่องจาก (AT)_n มักจะเกิดการจับกันเอง ลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ที่พบมากที่สุดรองลงมาเป็นชนิดซ้ำ (CA)_n โดยพบ 16.13 เปอร์เซ็นต์ ของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด และพบลำดับไมโครแซทเทลไลต์ชนิด Compound repeat ชนิดต่างๆ ในปริมาณใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่ยกเว้น (AG)_n และ (AGG)_n เป็น Compound repeat ที่พบมากที่สุด ประมาณ 12.90 เปอร์เซ็นต์ ของลำดับเบส ไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด (ตารางที่ 6) โดยสามารถจำแนกลำดับเบสในโคลนต่างๆ ออกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ (1) ลำดับเบสซ้ำที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ และมีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณตรงกลาง (2) ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ และมีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณส่วนต้น หรือ ส่วนปลายทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ (3) ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ แต่ไม่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ และ (4) ลำดับเบสไม่สมบูรณ์โดยมีความบกพร่องจากการอ่านลำดับเบส

จากลำดับเบสที่ได้ พบว่ามีเฉพาะลำดับเบสกลุ่มที่ 1 เท่านั้น ที่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะได้ สำหรับลำดับเบสกลุ่มที่ 2 นำมาออกแบบไพรเมอร์ไม่ได้ เนื่องจากลำดับเบสที่ขนานข้างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์บริเวณ 5' หรือ 3' มีขนาดสั้นเกินไป ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ไม่เหมาะสม โดยพบว่าลำดับเบสบริเวณขนานข้างของไมโครแซทเทลไลต์จำนวนมาก เป็นบริเวณที่มีเบส A และ T เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (AT rich) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* มีบริเวณจดจำเป็น 5' T[▽]TAA 3' จึงทำให้บริเวณที่ขนานข้างของไมโครแซทเทลไลต์ถูกตัดออกไป Hamilton *et al.* (1999) แก้ปัญหานี้ได้โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มโอกาสให้ได้ลำดับเบสรอบข้างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ยาวขึ้น ส่วนลำดับเบสกลุ่มที่ 3 ซึ่งไม่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ แต่ก็พบว่ามีลำดับเบสบางส่วนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ จึงอาจทำให้โพรบเข้าจับคู่ผิดได้ สำหรับลำดับเบสกลุ่มที่ 4 พบว่ามีลำดับเบสไม่สมบูรณ์ เครื่องหาลำดับเบสไม่สามารถอ่านผลได้ นอกจากนี้ยังพบลำดับเบสซ้ำกับกลุ่มที่ 1 และ 2 รวมทั้งยังพบโคลนที่มี 2 ลำดับเบสอยู่ร่วมกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนแรกของการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ คือ การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับ Adapter อาจแก้ไขได้โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดสองชนิดก่อนการเชื่อมต่อกับ Adapter ที่จำเพาะกับเอนไซม์นั้นๆ หรือ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียว แต่อาจตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ติดกับ Adapter ในขั้นตอนเดียวกัน เป็นต้น (สุรินทร์, 2552)

ตารางที่ 6 ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่างๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ของงูปลิงชรา

ชนิดของไมโครแซทเทลไลต์	จำนวนโคลนที่ได้	เปอร์เซ็นต์โคลนที่ได้
Dinucleotide repeat (58.00%)		
(TG) _n	22	35.48
(CA) _n	10	16.13
(GA) _n	4	6.45
Trinucleotide repeat (6.51%)		
(TTC) _n	2	3.20
(TCC) _n	2	3.20
Compound repeat (35.49%)		
(TC) _n (TG) _n	4	6.45
(AC) _n (AG) _n	2	3.20
(GT) _n (GA) _n (GGA) _n	2	3.20

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดของไมโครแซทเทลไลต์	จำนวนโคลนที่ได้	เปอร์เซ็นต์โคลนที่ได้
(AG) _n (AGG) _n	8	12.90
(TGG) _n (CA) _n	2	3.20
(TG) _n (AG) _n (GA) _n (GGA) _n (GGT) _n (AGG) _n	2	3.20
(TG) _n (GA) _n (GGA) _n (GGT) _n	2	3.20
รวม	62	100

หมายเหตุ จำนวนโคลนที่ได้ทั้งหมด ได้รวมโคลนที่มีลำดับเบสไม่สมบูรณ์ แต่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์ที่อยู่ในจำนวน 31 โคลน ด้วย

นำลำดับเบสที่มีขึ้นดีเอ็นเอสกัดแทรกสมบูรณ์ โดยมีลำดับแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่ตรงกลางมาวิเคราะห์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยแต่ละลำดับเบสจะออกแบบไพรเมอร์ 2 สาย คือ สาย Forward primer (F) และสาย Reverse primer (R) โดยให้ครอบคลุมส่วนไมโครแซทเทลไลต์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความยาวประมาณ 18-30 เบส และไม่มีลำดับเบสที่เข้าคู่กันเอง มีค่าอุณหภูมิหลอมตัว (T_m , Melting temperature) ใกล้เคียงกัน ซึ่งคำนวณค่าโดยประมาณได้จากสูตร T_m (องศาเซลเซียส) = $2(A+T)+4(G+C)$ โดย A, T, C และ G คือ จำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในไพรเมอร์นั้น และมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 100-350 คู่เบส (สุรินทร์, 2545)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อออกแบบไพรเมอร์ พบว่าไม่มีลำดับเบสใดที่ซ้ำกันเลย โดยโคลนที่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้มี จำนวน 26 โคลน นำไปพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะได้ทั้งหมด 26 คู่ไพรเมอร์ โดยอาศัยหลักการออกแบบไพรเมอร์ทั่วไป ร่วมกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ FastPCR นอกจากนี้ยังพบลำดับเบสจำนวนมากไม่สามารถนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ได้ เนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลต์อยู่ที่ปลายของขึ้นดีเอ็นเอ หรือ ลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงไม่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ นำไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งหมด มาทดสอบกับจีโนมดีเอ็นเอของปลับลึงธาร 2 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ และพบว่าไพรเมอร์หลายคู่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างมีลักษณะผลแบบส่ม เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ไพรเมอร์บางคู่ไม่ให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ ตามขนาดที่คาดหมาย ภายหลังปรับสภาพะของการทำพีซีอาร์ โดยการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้น Annealing และปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เพื่อให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ ยังพบว่าไพรเมอร์จำนวนมากไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการ หรือ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากจึงได้ตัดไพรเมอร์เหล่านี้ทิ้งไป

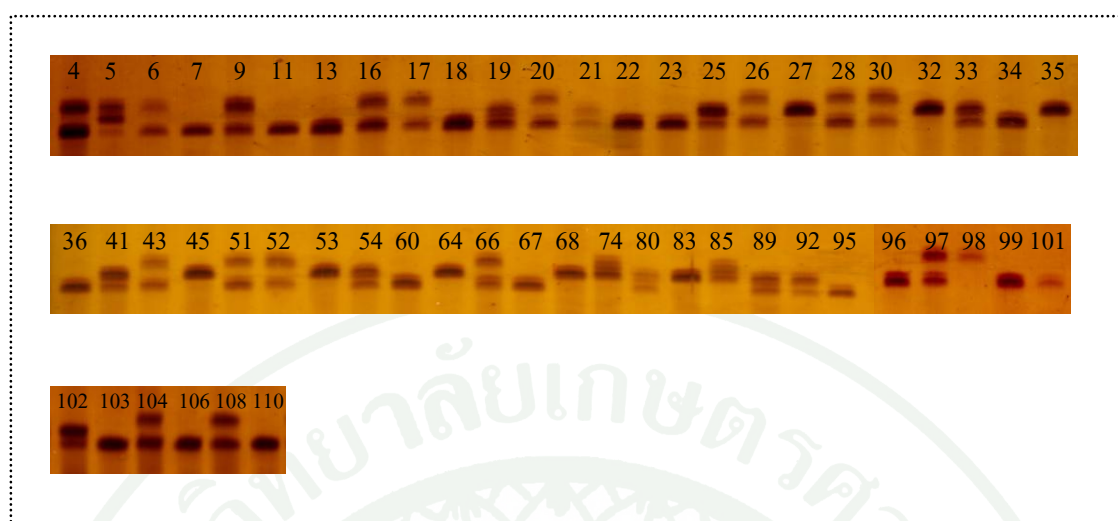
2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

คัดเลือกไพรเมอร์ 10 คู่ (ตารางที่ 7) ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจากไพรเมอร์ทั้งหมดที่พัฒนา 26 คู่ มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลับปลิงธารจำนวน 55 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างปลับปลิงธารที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ คลองเตริยม คลองคุระ คลองตาผุด (จังหวัดพังงา) และคลองนาคา (จังหวัดระนอง) และจากแหล่งจำหน่ายพันธุ์ ได้แก่ บริษัทไวท์เครน และตลาดจตุจักร โดยคู่ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1-2 แอลลีลต่อตำแหน่ง หรือ ต่อคู่ไพรเมอร์ และมีรูปแบบเดียว (Monomorphism) ในปลับปลิงธารทุกตัวอย่าง ยกเว้นไพรเมอร์ 5 คู่ คือ CriSat2, CriSat42, Crisat111, Crisat217 และ Crisat171 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันโดยมีแอลลีล 2-5 แอลลีล ต่อตำแหน่ง (ภาพที่ 6)

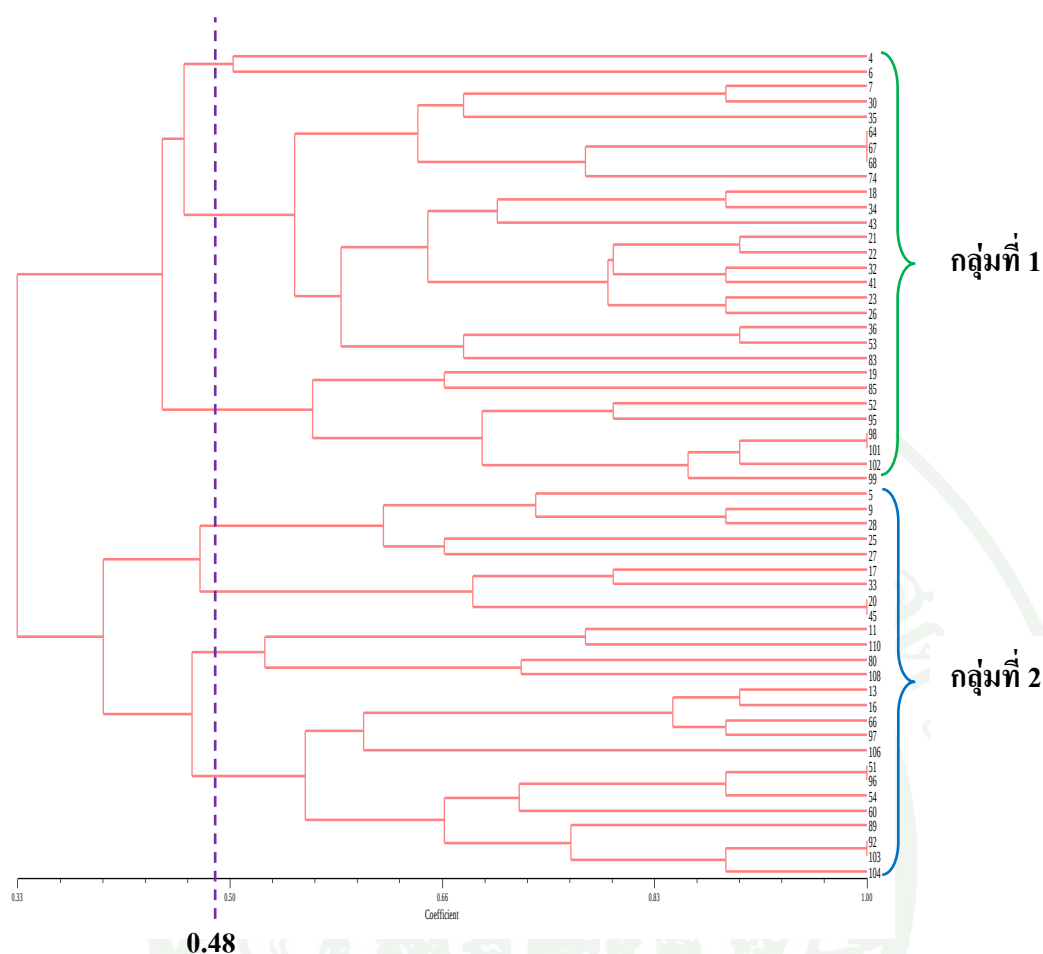
นำผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลับปลิงธารทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ มาวิเคราะห์ค่า PICs (Polymorphic Information Contents) พบค่า PICs มีค่าอยู่ในช่วง 0.53-0.76 โดยมีค่า PICs เฉลี่ย เท่ากับ 0.63 เมื่อคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมตามวิธีของ Nei and Li (1978) พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Genetic similarity) ตั้งแต่ 0.33-1.00 เฉลี่ยระหว่างตัวอย่างต่างๆ เท่ากับ 0.429 เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และสร้าง Dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA (NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k) สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ 7 กลุ่มย่อย (ที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.48) กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็นกลุ่มของปลับปลิงธารที่ได้จากแหล่งจำหน่ายพันธุ์ และที่เก็บมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ คลองเตริยม คลองคุระ และคลองตาผุด (จังหวัดพังงา) กลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นกลุ่มของปลับปลิงธารที่ได้จากแหล่งจำหน่ายพันธุ์ และที่เก็บมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ คลองเตริยม คลองตาผุด (จังหวัดพังงา) และคลองนาคา (จังหวัดระนอง) รวมทั้งปลับปลิงธารจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง (ภาพที่ 7) เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี Principle component analysis (PCA) ให้ผลที่สอดคล้องกับ Dendrogram ที่ได้ คือสามารถจัดจำแนกปลับปลิงธารได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยมีค่า PCA 1, 2 และ 3 เท่ากับ 22.02, 19.28 และ 10.60 ซึ่งครอบคลุมความแปรปรวนของตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 51.90 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าปลับปลิงธารของประเทศไทยยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างต่างๆ อยู่พอสมควร (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 7 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ชนิดของลำดับเบสซ้ำที่อยู่ในคู่ไพรเมอร์ ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ และ ค่า Annealing temperature ของไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ (* ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพลับพลึงธาร)

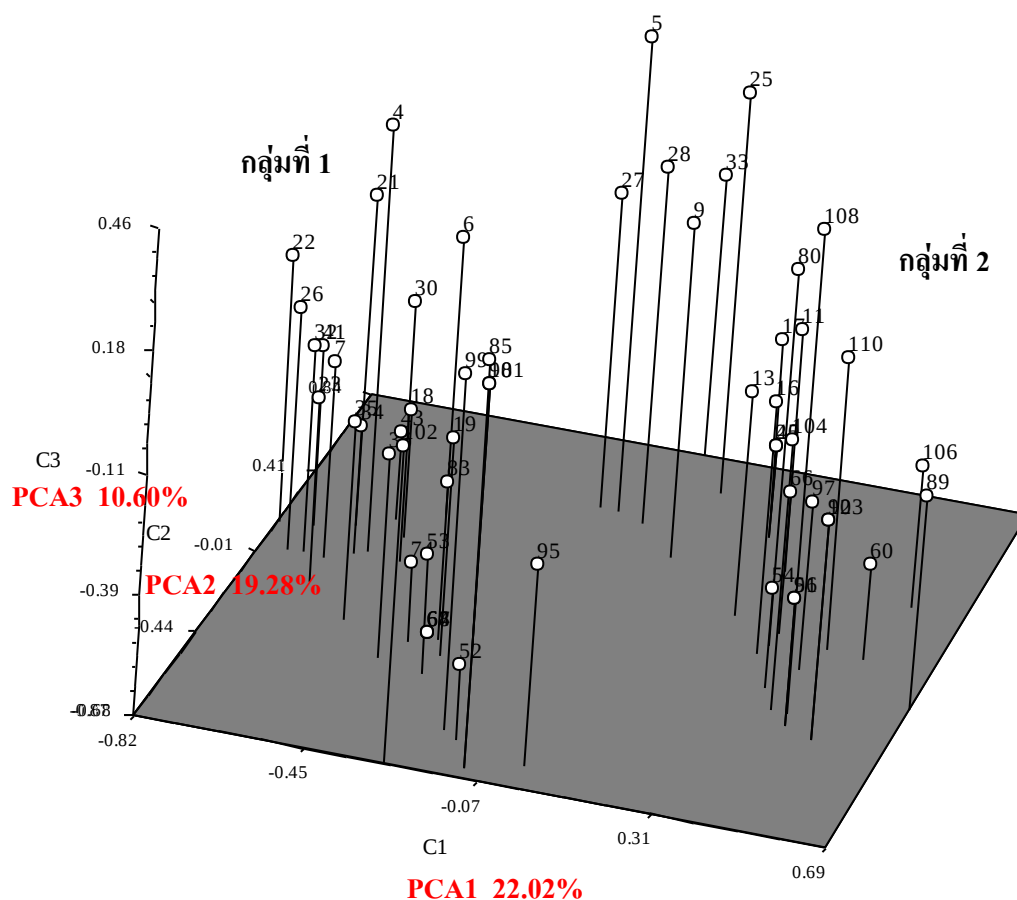
No.	คู่ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ลำดับเบสซ้ำ	ขนาด (~bp)	T _a (°C)
1.	CriSat2*	F: TATTCTTCTTTCTCTTGCACATACT R: GTAATAGAGTTTACACATGAAGGTG	(TTC) ₆ (TCC) ₈	245	55
2.	CriSat42*	F: TAGGCAAAGCCTAAACCCAAACCCT R: GACTTACAGTATGAGAGTGCATATA	(CA) ₅₅	302	55
3.	CriSat81	F: AGCAGTAAGTCATAAATAATGTTAT R: TATCAAACATTTTCATACATACATA	(CA) ₉	215	53
4.	CriSat111*	F: ACATGCAATCCTTGTCCTGACAC R: TCGATACATCAAGGTCTAGATAC	(GA) ₅₅ (CA) ₁₂	261	55
5.	CriSat306	F: CAGATATATGCTTGAACACGACTA R: TTCATATATTGTTGTGATGATTACG	(AC) ₂₄ (AG) ₆	444	55
6.	CriSat217*	F: GAGGGTAAACAGTAGGTGCTGTAAGG R: CCAATGCTTACGTATACCCCGATCC	(GT) ₁₁ (GA) ₁₈ (GGA) ₁₅	232	57
7.	CriSat69	F: GGAATTCGATTGATGAGTCCCG R: CAATCACATCCAAGTAAACC	(TG) ₂₁	401	59
8.	CriSat171*	F: GAATTGGGCCCCGACGTCGCA R: GACGATGGGTAGGGAAGATC	(AG) ₃₀ (AGG) ₃₁	345	55
9.	CriSat245	F: GGTATGGGTTTCAGGTTAGGG R: CCCTACACACACAACACCTG	(TG) ₁₅	225	57
10.	CriSat179	F: CTGTAGAGTACGAATAGCAGTAAG R: CACTCAAGGTATGCACCTAC	(TGG) ₉ (CA) ₂₀	344	57



ภาพที่ 6 ตัวอย่างผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของพลับพลึงธารด้วยคู่มือไพรเมอร์ CriSat2 (ตัวอย่างที่ 4, 5, 6, 7, 9, 64, 66 = คลองเตรียม จังหวัดพังงา 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 41, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 89, 92 = บริษัทไวท์เครน 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 74, 80, 83, 85 = สวนจตุจักร 60, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 102 = คลองตาผูด จังหวัดพังงา 67, 68 = คลองคูระ จังหวัดพังงา 103, 104 = Tissue culture ของกรมประมง และ 106, 108, 110 = คลองนาคา จังหวัดระนอง)



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลับปลิงธาร 55 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง โดยใช้วิธี UPGMA (NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k) (ตัวอย่างที่ 4, 5, 6, 7, 9, 64, 66 = คลองเตรียม จังหวัดพังงา 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 41, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 89, 92 = บริษัทไวท์เกรน 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 74, 80, 83, 85 = สวนจตุจักร 60, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 102 = คลองตาตุค จังหวัดพังงา 67, 68 = คลองคุระ จังหวัดพังงา 103, 104 = Tissue culture ของกรมประมง และ 106, 108, 110 = คลองนาคา จังหวัดระนอง)



ภาพที่ 8 การจัดกลุ่มพลับพลึงธารโดยการสร้าง PCA จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพลับพลึงธาร สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง (ตัวอย่างที่ 4, 5, 6, 7, 9, 64, 66 = คลองเตรียม จังหวัดพังงา 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 41, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 89, 92 = บริษัทไวท์เครน 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 74, 80, 83, 85 = สวนจตุจักร 60, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 102 = คลองตาผูด จังหวัดพังงา 67, 68 = คลองคูระ จังหวัดพังงา 103, 104 = Tissue culture ของกรมประมง และ 106, 108, 110 = คลองนาคา จังหวัดระนอง)

โดยทั่วไปเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความหลากหลายสูงในสิ่งมีชีวิต เนื่องมาจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ หรือ การเพิ่มขึ้นของลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์ที่เกิดจากกลไกต่างๆ ซึ่งถือว่ามีความถี่การกลายสูงกว่าลำดับเบสบริเวณอื่นๆ และเครื่องหมายเอพเอลลีก็ที่สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอปริมาณมาก ที่เกิดจากตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส จากความเหมาะสมของตำแหน่งการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ทั้ง 2 ซึ่งจะกระจายได้ทั่วทั้งจี

โนม (Genome) และมีจำนวนจุดตัดมากมาย ทำให้ได้ข้อมูลดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ผลจำนวนมาก อย่างไรก็ตามหากเพิ่มจำนวนของการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และ ไอเอสเอสอาร์ ในการตรวจสอบพันธุกรรมของปลับปลิงธารเพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่งต่างๆ ในจีโนมของปลับปลิงธารให้มากขึ้น ก็น่าจะให้ผลการประเมินพันธุกรรมของปลับปลิงธารได้ดียิ่งขึ้น

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลับปลิงธารด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ และ เทคนิคเอเอฟแอลพี

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลับปลิงธารด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

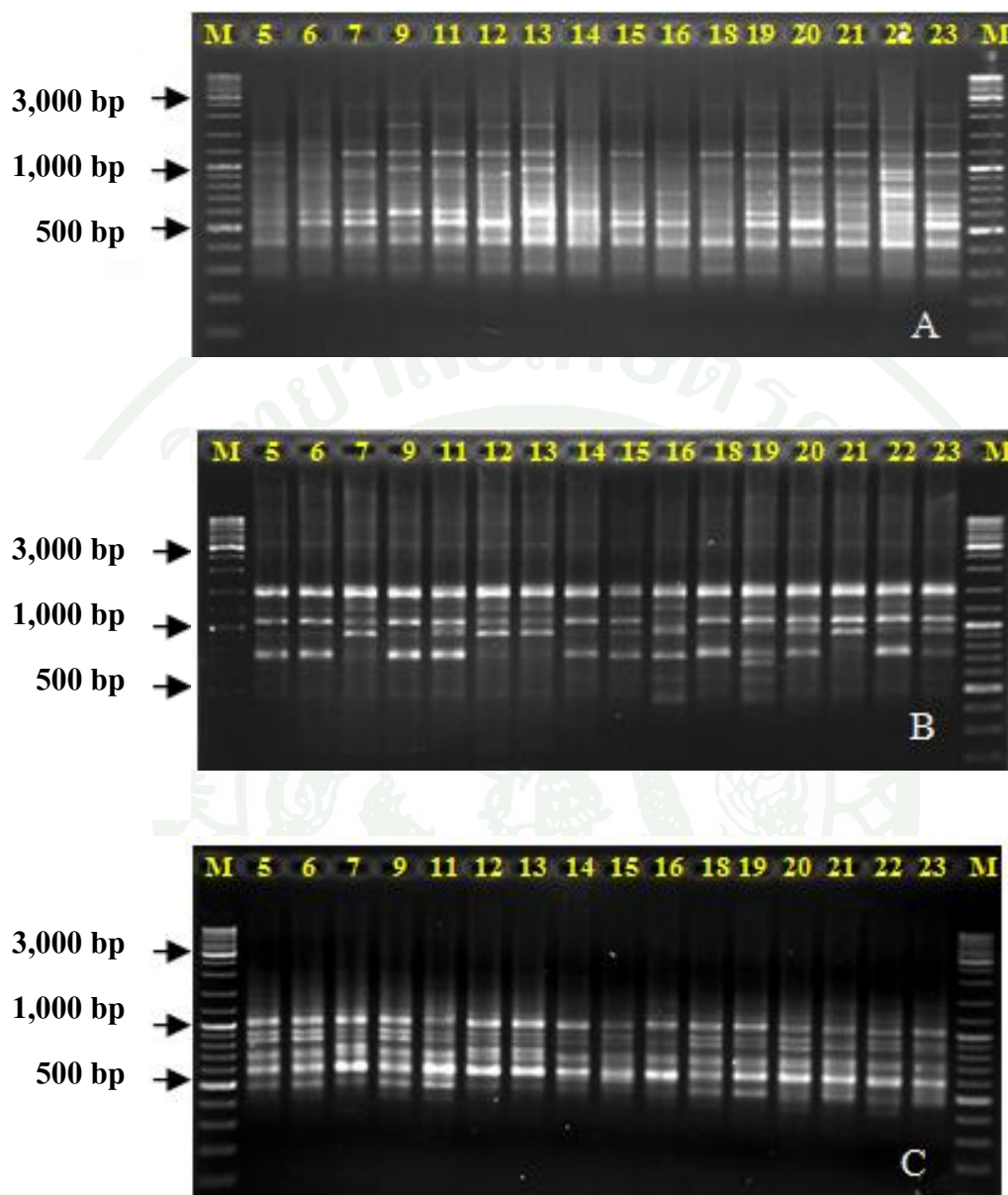
จากการทดสอบไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์จำนวน 16 ชนิด กับปลับปลิงธาร 2 ชนิด ซึ่งเป็นปลับปลิงธารจาก คลองเตรียม จังหวัดพังงา หมายเลข 1 และ คลองบางปรู จังหวัดระนอง หมายเลข 87 ที่ใช้ตรวจสอบเบื้องต้น และเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน จำนวน 6 ชนิด นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างปลับปลิงธาร 77 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิดให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างปลับปลิงธารที่ใช้ศึกษา

จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจน และเข้มปานกลางของแต่ละไพรเมอร์ พบอยู่ระหว่าง 5-7 แถบ (ตารางที่ 8) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ชนิด กับตัวอย่างปลับปลิงธาร 77 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 33 แถบ เฉลี่ย 5.5 แถบต่อชนิดของไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างปลับปลิงธาร (Polymorphic band) จำนวน 18 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ให้ความแตกต่าง (Monomorphic bands) จำนวน 15 แถบ คิดเป็น 54.55 เปอร์เซ็นต์ และ 45.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ (AC)₈YG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 7 แถบ เปอร์เซ็นต์ Polymorphic band ของแต่ละคู่ไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 20.00-83.33 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 52.47 เปอร์เซ็นต์ ต่อคู่ไพรเมอร์ ขนาดดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วง ประมาณ 0.4-2.0 กิโลเบส (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 8 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในพลับพลิงธารจากไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์แต่ละชนิด และ
จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส*	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่พบทั้งหมด	จำนวน Polymorphic band	% Polymorphic band
di-nucleotide, 3' –anchor primer	(CT) ₈ G	6	5	83.33
di-nucleotide, 3' –anchor primer	(CT) ₈ TG	5	2	40.00
di-nucleotide, 3' –anchor primer	(AC) ₈ YG	7	5	71.49
di-nucleotide, 3' –anchor primer	(TC) ₈ RT	5	3	60.00
di-nucleotide, 3' –anchor primer	(GTG) ₄ RT	5	1	20.00
di-nucleotide, 3' –anchor primer	(TC) ₈ G	5	2	40.00
รวม		33	18	54.55

* Y = C หรือ T, R = G หรือ A

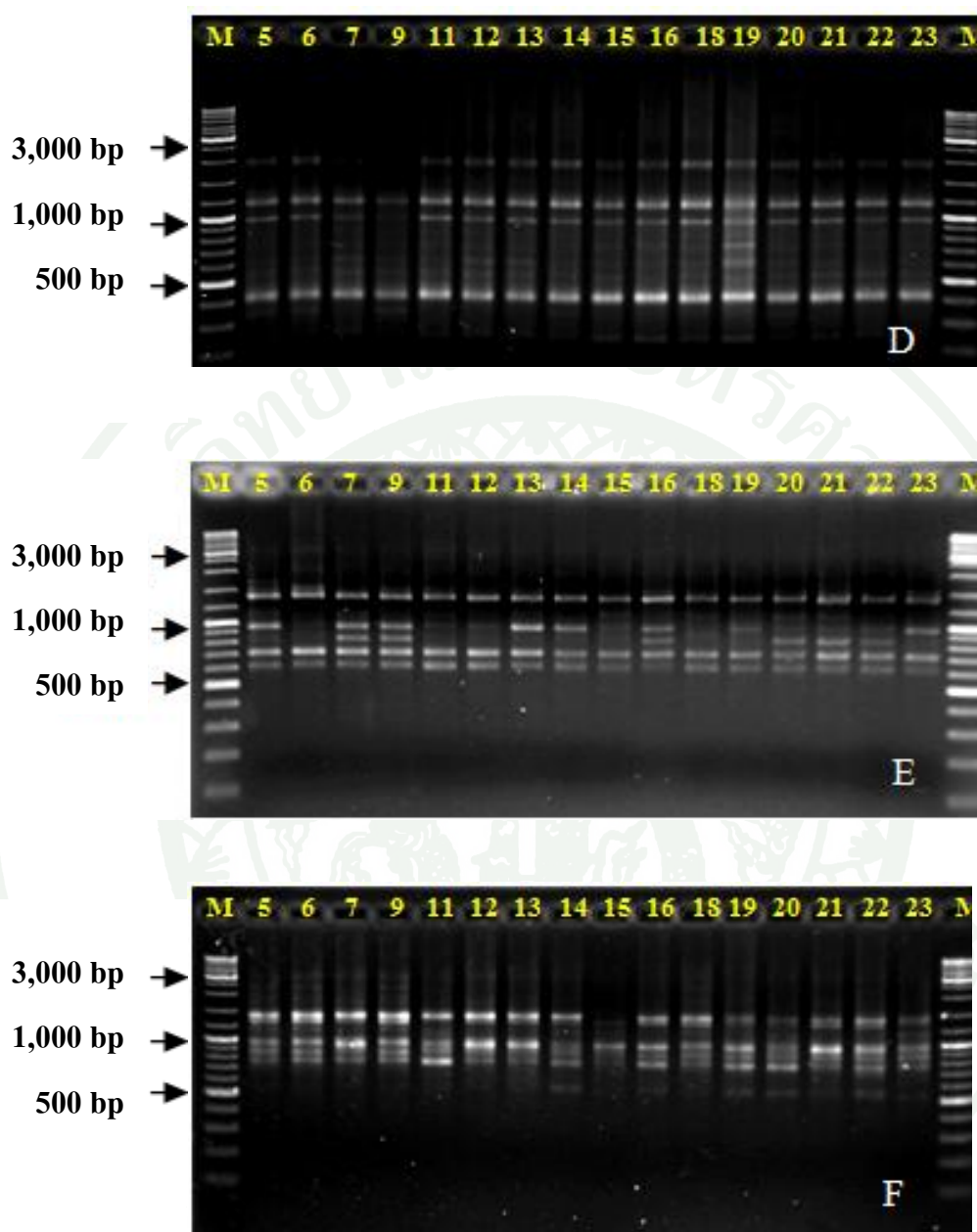


ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอพลัมฟิงหารจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

A = (AC)₈YG, B = (CT)₈G, C = (CT)₈TG, D = (GTG)₄RT, E = (TC)₈G, F = (TC)₈RT

(M = M = DNA ladder mix) (ตัวอย่างที่ 5, 6, 7, 9 = คลองเตรียม จังหวัดพังงา 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20 = บริษัทไวท์เครน 21, 22, 23 = สวนจุตุจักร)

(M = DNA ladder mix



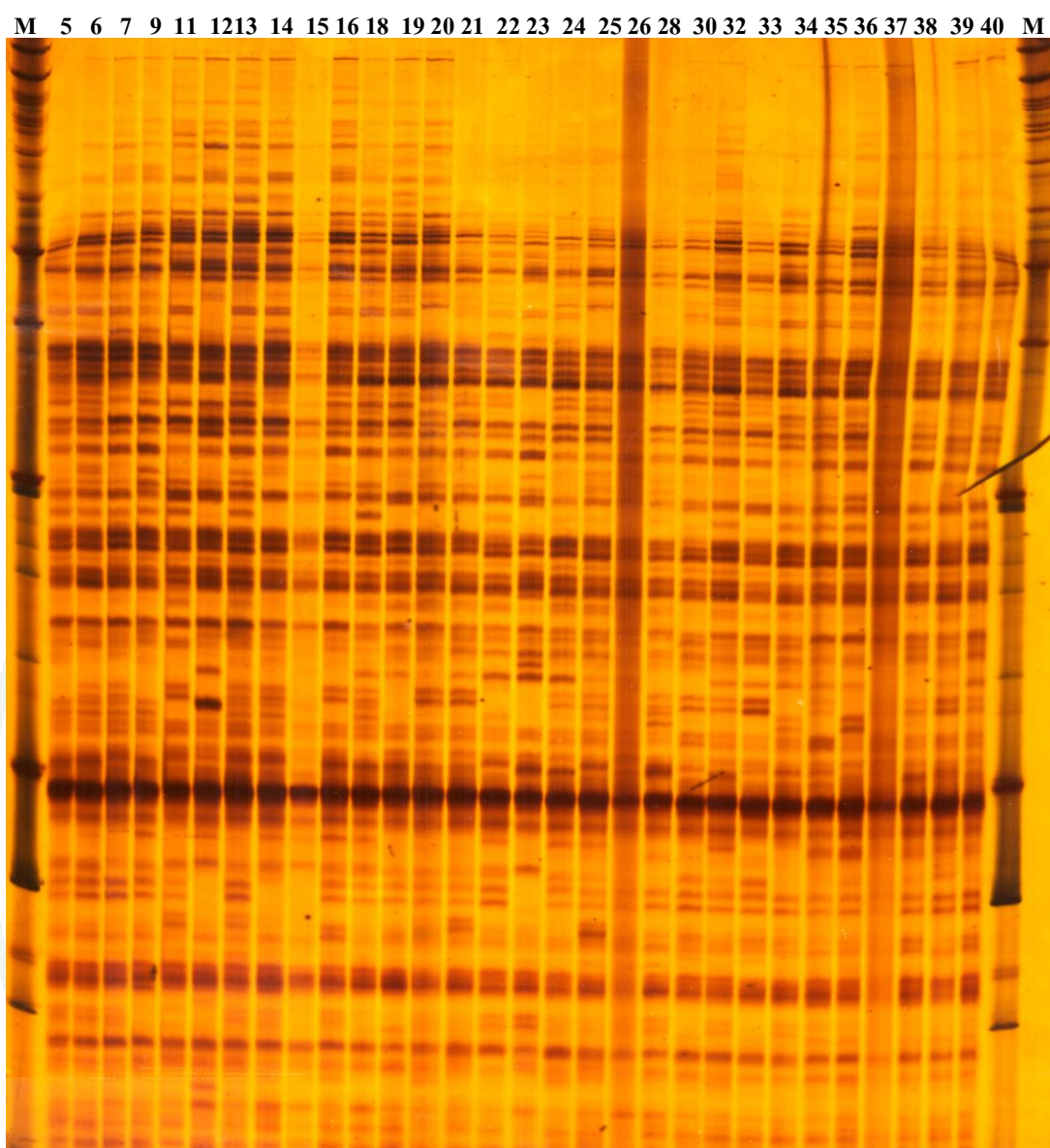
ภาพที่ 9 (ต่อ)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลับปลิงธารด้วยเทคนิคเอฟแอลพี

จากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ระหว่าง E+3 และ M+3 ได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจำนวน 8 คู่ (ตารางที่ 9) เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *EcoRI* adapter 5 ชนิดไพรเมอร์ และ *MseI* adapter 5 ชนิดไพรเมอร์ มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างปลับปลิงธารจำนวน 77 ตัวอย่าง แต่ละคู่ไพรเมอร์ที่ศึกษาพบแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 31-57 แถบ (ภาพที่ 10) ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 371 แถบ เฉลี่ย 46.37 แถบ ต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างปลับปลิงธาร (Polymorphic band) จำนวน 178 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ให้ความแตกต่าง (Monomorphic bands) จำนวน 193 แถบ คิดเป็น 47.98 เปอร์เซ็นต์ และ 52.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไพรเมอร์ E-AGG/M-CAA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 57 แถบ และไพรเมอร์ E-AGC/M-CAT ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 31 แถบ โดยเปอร์เซ็นต์ Polymorphic band ของแต่ละคู่ไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 34.55-65.96 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 50.99 เปอร์เซ็นต์ ต่อคู่ไพรเมอร์

ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลับปลิงธารโดยเทคนิคเอฟแอลพี จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ Polymorphism ในแต่ละคู่ไพรเมอร์

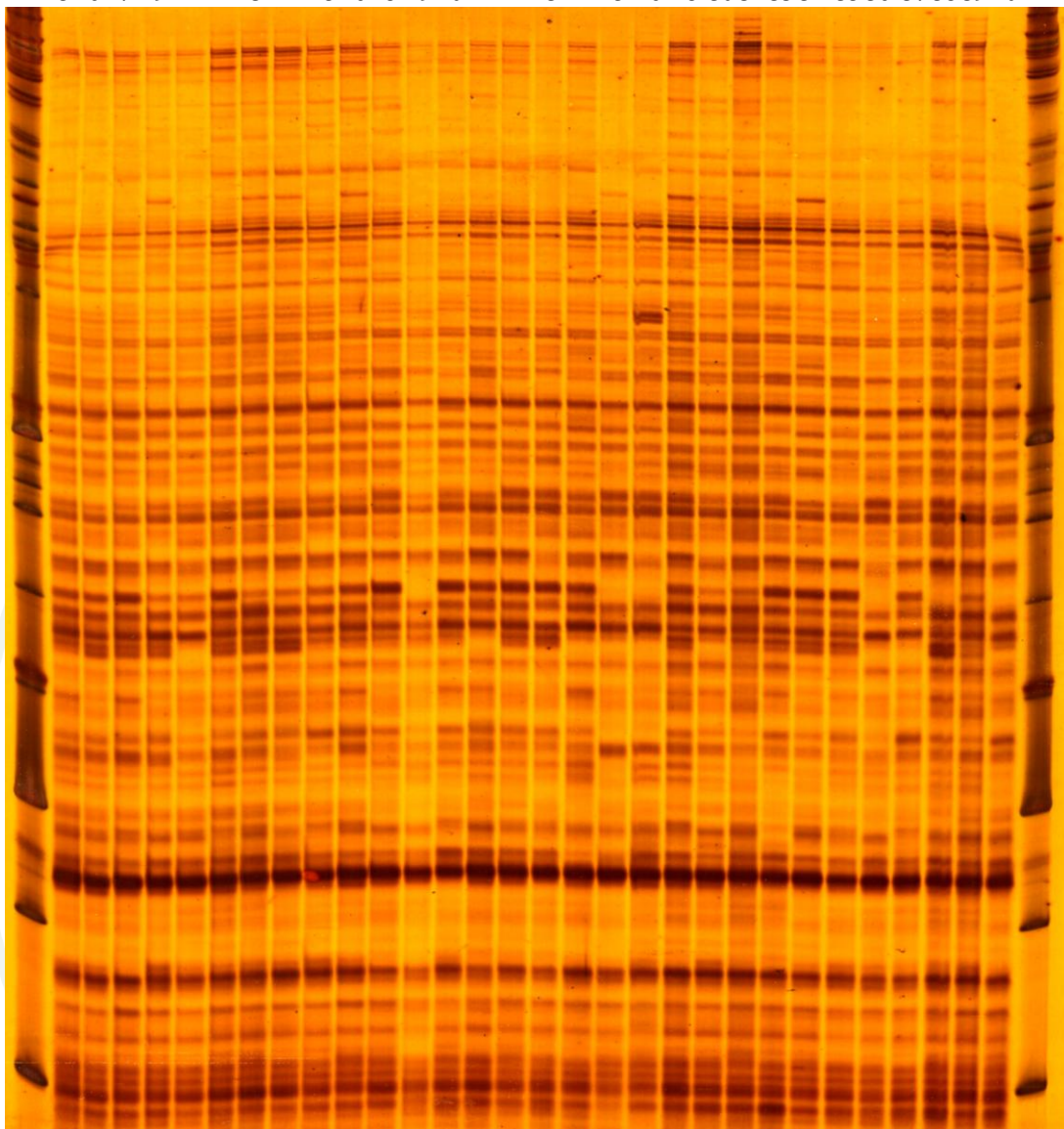
คู่ไพรเมอร์	จำนวน bands	จำนวน polymorphic bands	% polymorphisms
E-AAC/M-CAG	47	31	65.96
E-ACC/M-CAG	32	17	53.13
E-ACC/M-CTA	55	22	40.00
E-ACC/M-CTG	55	19	34.55
E-ACG/M-CAA	54	31	57.41
E-ACG/M-CTA	40	22	55.00
E-AGC/M-CAT	31	12	38.71
E-AGG/M-CAA	57	36	63.16
รวม	371	178	50.99



E-AAC/M-CAG

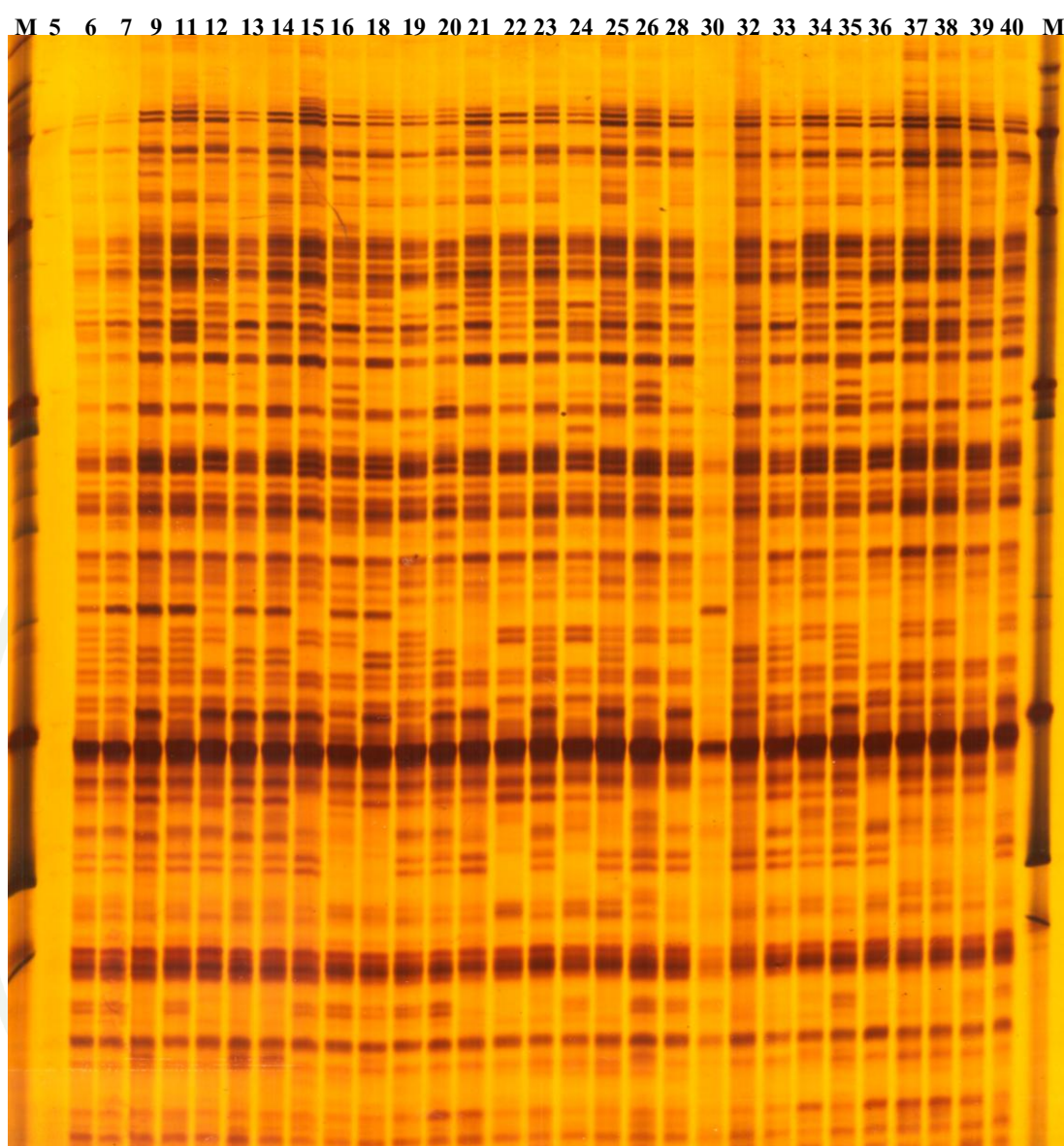
ภาพที่ 10 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพลับพลึงธาร จากเทคนิคเอเอฟแอลพี (ตัวอย่างที่ 5, 6, 7, 9 = คลองเตรียม จังหวัดพังงา 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20 = บริษัทไวก์เกรน 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 = สวนจตุจักร)
(M = DNA ladder mix)

M 5 6 7 9 11 12 13 14 15 16 18 19 20 21 22 23 24 25 26 28 30 32 33 34 35 36 37 38 39 40 M



E-ACC/M-CTA

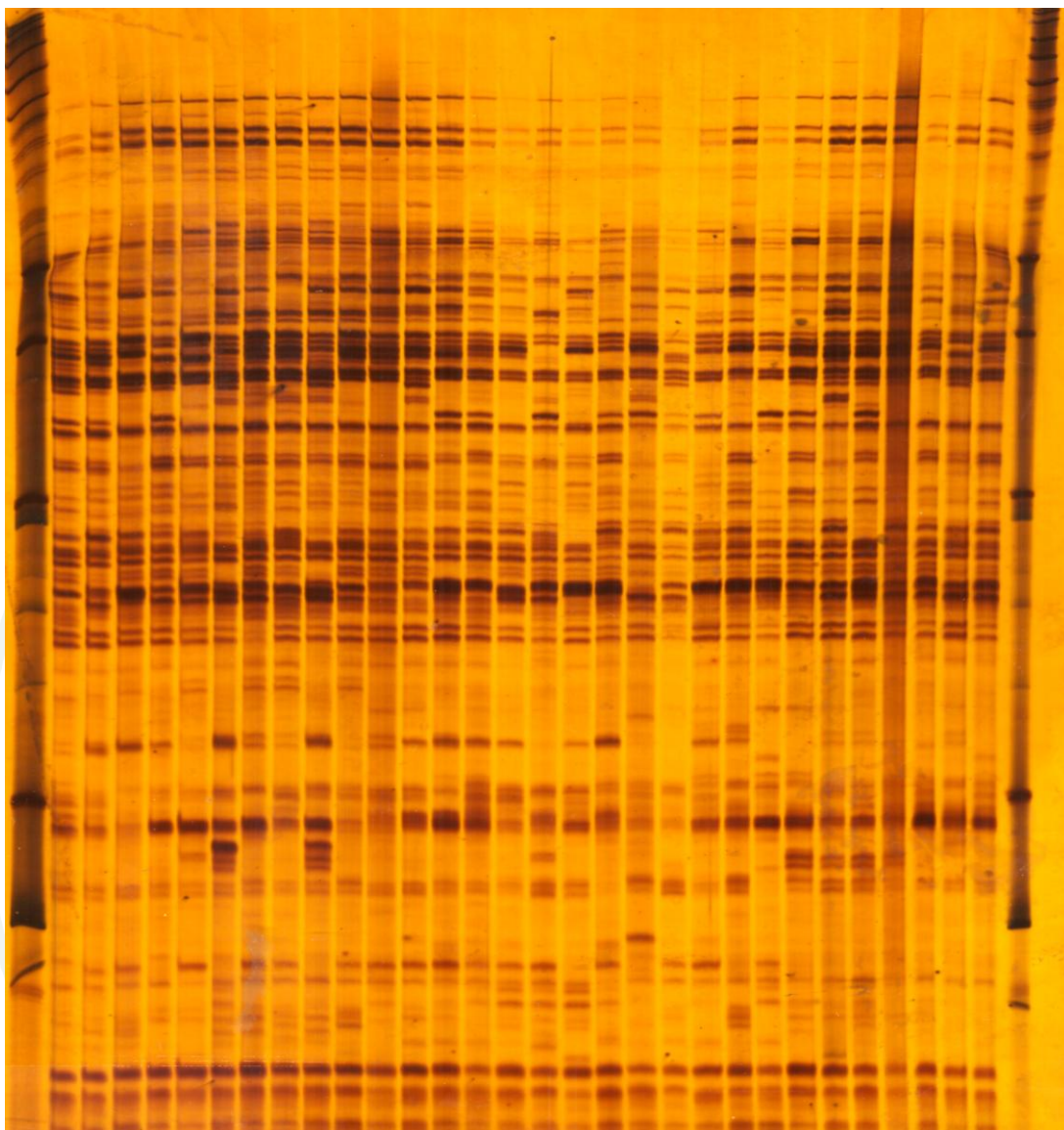
ภาพที่ 10 (ต่อ)



E-ACC/M-CTG

ภาพที่ 10 (ต่อ)

M 5 6 7 9 11 12 13 14 15 16 18 19 20 21 22 23 24 25 26 28 30 32 33 34 35 36 37 38 39 40 M



E-ACG/M-CAA

ภาพที่ 10 (ต่อ)

การวิเคราะห์ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์และเทคนิคเอเอฟแอลพี

ผลการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic differentiation) ของประชากรปลับปลิงธาร เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีกับตัวอย่างปลับปลิงธารทั้ง 7 แหล่ง ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวนมาก สามารถคัดเลือกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (Polymorphism) ได้ทั้งสิ้น 178 ตำแหน่ง (Loci) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TFPGA พบว่า ปลับปลิงธารทั้ง 7 แหล่ง มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism อยู่ ในช่วง 4.88 ถึง 59.15 ที่ค่าเฉลี่ย 31.45 แหล่งของปลับปลิงธารที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism สูงที่สุดถึงต่ำสุดเรียงตามลำดับดังนี้คือ 1. แหล่งจำหน่ายพันธุ์จากบริษัทไวท์เครน (59.15%) 2. แหล่งจำหน่ายพันธุ์สวนจตุจักร (52.44%) 3. คลองเตริยม จังหวัดพังงา (42.38%) 4. คลองตาตุค จังหวัดพังงา (37.20%) 5. คลองตาตุค จังหวัดพังงา (12.20%) 6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง (11.89%) และ 7. คลองบางปรู จังหวัดระนอง (4.88%) ดังตารางที่ 10 ส่วนตารางที่ 11 แสดงให้เห็นถึงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการคำนวณค่า Expected heterozygosity อยู่ในช่วง 0.020 ถึง 0.238 ที่ค่าเฉลี่ย 0.129 แหล่งของปลับปลิงธารที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดคือ แหล่งจำหน่ายพันธุ์บริษัทไวท์เครน มีค่าเท่ากับ 0.238 และแหล่งอื่นๆ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงตามลำดับ ส่วนคลองบางปรู จังหวัดระนอง มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.020

ตารางที่ 10 ค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphic loci ของปลับปลิงธารทั้ง 7 แหล่ง

ลำดับ	ชื่อแหล่ง	จำนวนตัวอย่าง	Polymorphic loci (%)
			95% criterion
1	ปลับปลิงธารจากคลองเตริยม จังหวัดพังงา	10	42.3781
2	ปลับปลิงธารจากคลองตาตุค จังหวัดพังงา	7	37.1951
3	ปลับปลิงธารจากคลองคุระ จังหวัดพังงา	2	12.1951
4	ปลับปลิงธารจากคลองบางปรู จังหวัดระนอง	2	4.8780
5	ปลับปลิงธารจากแหล่งจำหน่ายพันธุ์บริษัทไวท์เครน	23	59.1463
6	ปลับปลิงธารจากแหล่งจำหน่ายพันธุ์สวนจตุจักร	31	52.4390
7	ปลับปลิงธารจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง	2	11.8902
	Average	77	31.4500

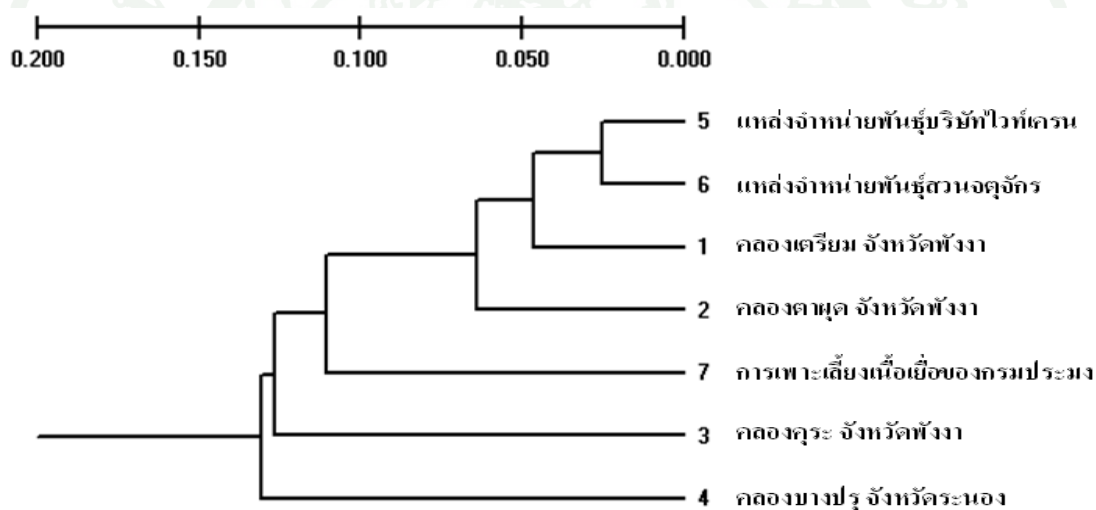
ตารางที่ 11 ค่า Expected heterozygosity ของปลับปลิงธารทั้ง 7 แหล่ง

ลำดับ	ชื่อแหล่ง	จำนวนตัวอย่าง	Expected heterozygosity
1	ปลับปลิงธารจากคลองเตริยม จังหวัดพังงา	10	0.1796
2	ปลับปลิงธารจากคลองตาผูด จังหวัดพังงา	7	0.1492
3	ปลับปลิงธารจากคลองคุระ จังหวัดพังงา	2	0.0505
4	ปลับปลิงธารจากคลองบางปรู จังหวัดระนอง	2	0.0202
5	ปลับปลิงธารจากแหล่งจำหน่ายพันธุ์บริษัทไวท์เครน	23	0.2380
6	ปลับปลิงธารจากแหล่งจำหน่ายพันธุ์สวนจตุจักร	31	0.2141
7	ปลับปลิงธารจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง	2	0.0493
Average		11	0.129

ผลการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งของปลับปลิงธาร จากการวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวทางพันธุกรรม (ตารางที่ 12) ด้วยเทคนิค Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม TFPGA พบว่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วงระหว่าง 0.0251 ถึง 0.1305 และสามารถจัดกลุ่มของปลับปลิงธารทั้ง 7 แหล่งตามลำดับความสัมพันธ์กันซึ่งแสดงไว้ในภาพที่ 11 กล่าวคือแหล่งจำหน่ายพันธุ์บริษัทไวท์เครน มีความสัมพันธ์กับแหล่งจำหน่ายพันธุ์สวนจตุจักรมากที่สุด โดยมีค่า Genetic distance รวมเท่ากับ 0.0251 ลำดับถัดมาคือแหล่งจากคลองเตริยม จังหวัดพังงา ซึ่งมีความสัมพันธ์ห่างออกมาโดยมีค่า Genetic distance รวมกับ 2 แหล่งแรกเท่ากับ 0.0466 ลำดับต่อมาคือแหล่งจากคลองตาผูด จังหวัดพังงา มีค่า Genetic distance รวมกับทั้ง 3 แหล่งแรกเท่ากับ 0.0640 ลำดับต่อมาคือแหล่งจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง มีค่า Genetic distance รวมกับทั้ง 4 แหล่งแรกเท่ากับ 0.1106 ลำดับต่อมาคือแหล่งจากคลองคุระ จังหวัดพังงา มีค่า Genetic distance รวมกับทั้ง 5 แหล่งที่ผ่านมาเท่ากับ 0.1264 และลำดับสุดท้ายซึ่งเป็นแหล่งที่มีความสัมพันธ์กับแหล่งอื่นน้อยที่สุดคือแหล่งจากคลองบางปรู จังหวัดระนอง มีค่า Genetic distance รวมทั้งหมดเท่ากับ 0.1305

ตารางที่ 12 ค่า Genetic distance (D) และ Identities (I) (NEI'S (1972/1978) Distance) ของ
 ปลับปลิงธารทั้ง 7 แหล่ง

I/D	1	2	3	4	5	6	7
1	-	0.0766	0.1106	0.1539	0.0544	0.0387	0.1262
2	0.9263	-	0.1331	0.1202	0.0572	0.0581	0.0964
3	0.8953	0.8754	-	0.1428	0.1388	0.0998	0.1497
4	0.8574	0.8868	0.8670	-	0.1359	0.1125	0.1178
5	0.9470	0.9444	0.8704	0.8729	-	0.0251	0.1149
6	0.9620	0.9435	0.9051	0.8936	0.9752	-	0.1049
7	0.8814	0.9081	0.8610	0.8889	0.8915	0.9004	-



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลับปลิงธารทั้ง 7 แหล่ง

4. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนในปลับปลิงธาร

4.1 การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนในปลับปลิงธาร

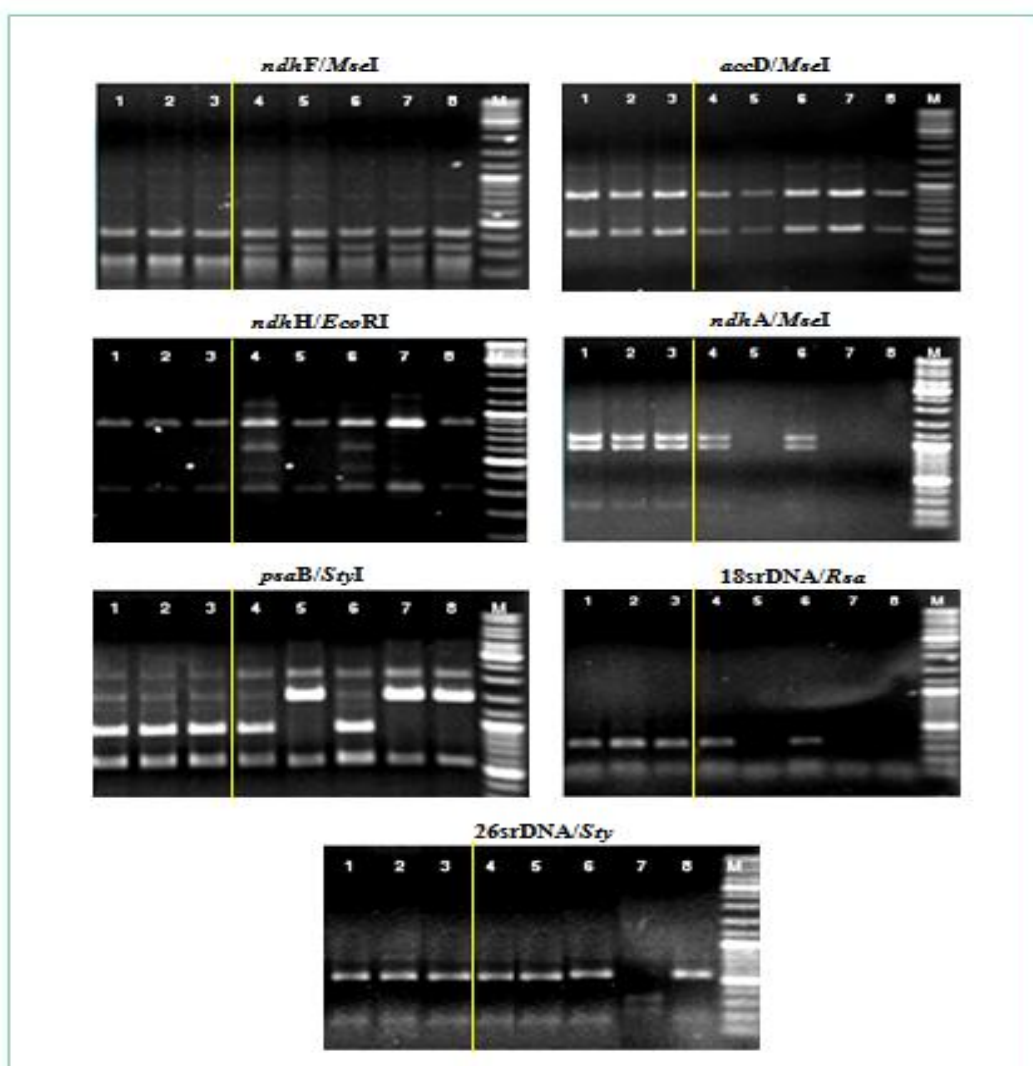
รวบรวมลำดับเบสของยีนในส่วน Coding sequences ของยีนในพืช จากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความจำเพาะกับยีน 7 ชนิด ได้แก่ *ndhF*, *accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*), 18srDNA และ 26srDNA เพื่อนำมาเปรียบเทียบหาบริเวณอนุรักษ์ และใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน โดยลำดับเบสของไพรเมอร์และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ดังในตารางที่ 5

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคดีเอฟแอลพี และ พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

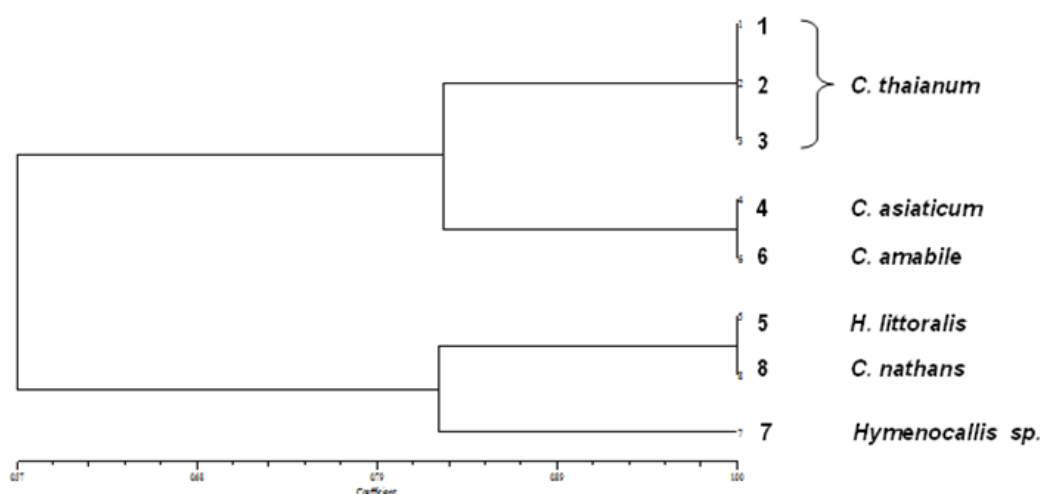
เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด ของพลับพลึงธาร 77 ตัวอย่าง และพืชในวงศ์เดียวกับพลับพลึงธาร (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ได้แก่ พลับพลึงขาว พลับพลึงดินเป็ด พลับพลึงแดง *C. nathans* และ พลับพลึงหนู มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรส (DFLP) ผลพบว่าเทคนิคดีเอฟแอลพีไม่ให้ความแตกต่างของแอลลีลภายในกลุ่มพลับพลึงธาร แต่พบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนบางไพรเมอร์สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพลับพลึงธารกับพืชในวงศ์เดียวกันได้ คือ ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *ndhH* และ *ndhA* เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ได้แก่ *MseI*, *StyI*, *AhlI*, *HaeIII*, *RsaI*, *BclI*, *EcoRI* และ *HpaII* ก่อนตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น (PCR-RFLP marker) โดยเลือกเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอได้ และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง พบว่าเทคนิค PCR-RFLP สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันได้ มีเพียงไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *accD* ชนิดเดียวที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันได้ หากเพิ่มชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะมากขึ้น ความสามารถในการระบุความแตกต่างระหว่างตัวอย่างก็น่าจะมากขึ้นด้วย

ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *ndhF* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* สามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกัน ออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพลับพลึงขาว พลับพลึงดินเป็ด พลับพลึงแดง *C. nathans* และพลับพลึงหนู ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *accD* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด (*MseI*, *AhlI*, *EcoRI*, *RsaI* และ *HpaII*) พบว่าไม่มีเอนไซม์ชนิดใดสามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันออกจากกันได้ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *ndhH* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* สามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันออกจากกันได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร พลับพลึงดินเป็ด *C. nathans* และพลับพลึงหนู กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พลับพลึงขาว และพลับพลึงแดง ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 26srDNA เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *StyI* สามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันออกจากกันได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร พลับพลึงขาว พลับพลึงดินเป็ด พลับพลึงแดง และพลับพลึงหนู กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. nathans* ส่วนผลผลิตพีซีอาร์ของยีนอีก 3 ชนิดยีนคือ *ndhA* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*, *psaB* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *StyI* และ 18srDNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* สามารถแยกกลุ่มของพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันได้รูปแบบที่เหมือนกันเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร พลับพลึงขาว และพลับพลึงแดง กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พลับพลึงดินเป็ด *C. nathans* และพลับพลึงหนู (ภาพที่ 12)

บันทึกแถบดีเอ็นเอของปลับปลิงธารและพืชในวงศ์เดียวกัน ที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ได้ทั้งหมด 26 แถบ นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างที่ศึกษาและสร้าง Dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA (NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k) พบว่าที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม ประมาณ 0.57 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 4 กลุ่มย่อย กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็น ปลับปลิงที่อยู่ในสกุล *Crinum* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มปลับปลิงธาร และกลุ่มปลับปลิง ขาวกับปลับปลิงแดง กลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นปลับปลิงในสกุล *Hymenocallis* และ *C. nathans* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มของปลับปลิงดินเปียกกับ *C. nathans* และปลับปลิงหนู (ภาพที่ 14) โดยหากเพิ่มชนิดและจำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษาพันธุกรรมของตัวอย่างพืชที่ศึกษา ทั้งหมดน่าจะสามารแยกปลับปลิงดินเปียกและ *C. nathans* ปลับปลิงขาวและปลับปลิงแดง หรือ แม้แต่ในกลุ่มของปลับปลิงธารที่ยังไม่สามารถแยกได้ จากการใช้ เครื่องหมายจำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิดที่ศึกษา อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาที่ได้พบว่าปลับปลิงธารมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม กับปลับปลิงขาว และ *C. nathans* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับปลับปลิงดินเปียกและปลับปลิง หนู



ภาพที่ 12 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพลับพลึงธารและพืชอื่นในวงศ์เดียวกัน โดยใช้เทคนิค ฟิชอาร์-อาร์เอฟแอลพี จำเพาะกับยีน (M = DNA ladder mix) (ตัวอย่างที่ 1, 2, 3 = พลับพลึงธาร 4 = พลับพลึงขาว 5 = พลับพลึงดินเป็ด 6 = พลับพลึงแดง 7 = *C. nathans* 8 = พลับพลึงหนู)



ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลับปลิงธรรกับพืชอื่นในวงศ์เดียวกัน 5 ชนิด สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จำเพาะกับยีน ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 26 แถบ โดยใช้วิธี UPGMA (NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k) (ตัวอย่างที่ 1, 2, 3 = ปลับปลิงธรร 4 = ปลับปลิงขาว 5 = ปลับปลิงดินเปิด 6 = ปลับปลิงแดง 7 = *C. nathans* 8 = ปลับปลิงหนู)

4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในปลับปลิงธรร

วิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วน (Partial sequence) ของยีนในปลับปลิงธรร จากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด เพื่อยืนยันความจำเพาะของยีนนั้นๆ และเป็นข้อมูลระบุความจำเพาะของสายพันธุ์ปลับปลิงธรรของประเทศไทย โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม และส่งไปหาลำดับเบส (1st BASE, Malaysia) วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่โคลนได้จากปลับปลิงธรร โดยได้ขนาดความยาวของลำดับเบสดังนี้ *ndhF* ขนาด 1,762 bp, ยีน *accD* ขนาด 1,094 bp, ยีน *ndhH* ขนาด 1,006 bp, ยีน *ndhA* ขนาด 937 bp, ยีน *psaB* ขนาด 2,060 bp, ยีน 18srDNA ขนาด 769 bp และยีน 26srDNA ขนาด 453 bp (ภาคผนวกที่ 1)

เมื่อนำลำดับเบสของยีน 5 ชนิด (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26srDNA) ของปลับปลิงธรร มาเปรียบเทียบกับยีนในพืชชนิดอื่น ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank รวม 14 ชนิดพืช (ตารางที่ 13) และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 5.0.6 (www.mbio.ncsu.edu) และ MEGA version 6.0.5 (Tamura *et al.*, 2013) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ

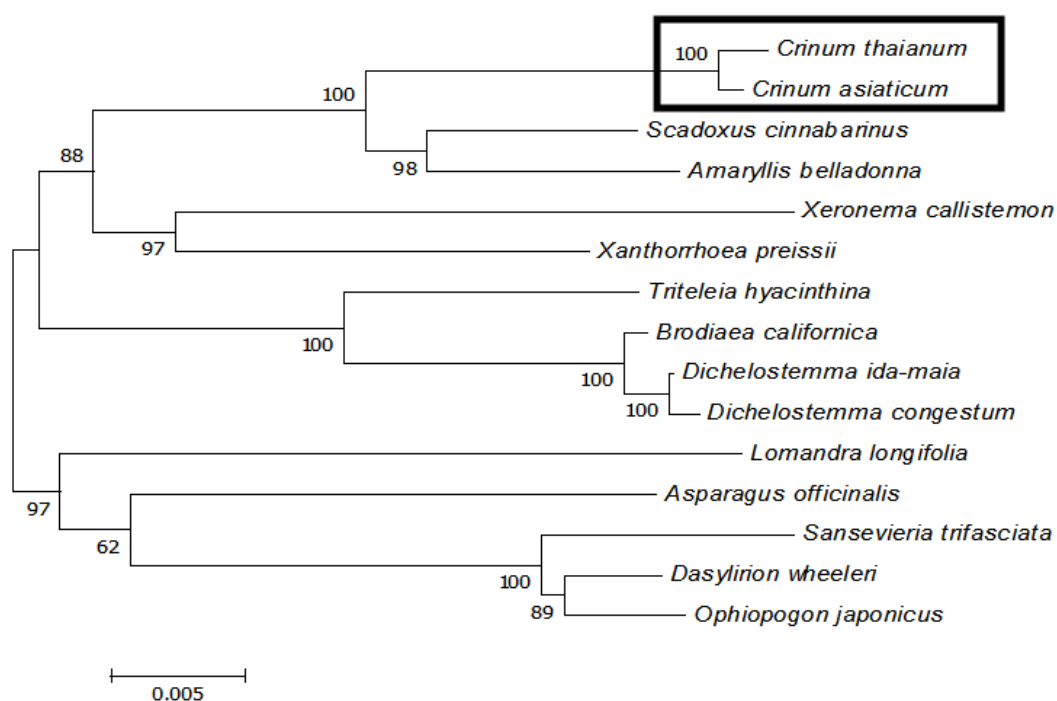
พลับพลึงธารกับพืชชนิดต่างๆ จัดกลุ่มด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) และประเมินความเชื่อมั่นโดยการทำ Bootstrap 1,000 ครั้งโดยใช้ Model of nucleotide substitution เป็น JC+I model และกำหนด Rate variation among site ชนิด Uniform rate พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มใหญ่ที่ 1 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย 4 ชนิดพืช ได้แก่ *Crinum thaianum*, *Crinum asiaticum*, *Scadoxus cinnabarinus*, *Amaryllis belladonna* โดย *C. thaianum* และ *C. asiaticum* มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมากที่สุด (Genetic distance = 0.003) สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้ เครื่องหมายพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จำเพาะกับยีน ดังกล่าวแล้ว กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย 2 ชนิดพืช ได้แก่ *Xeronema callistemon*, *Xanthorrhoea preissii* และ กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วย 4 ชนิดพืช ได้แก่ *Triteleia hyacinthine*, *Brodiaea californica*, *Dichelostemma ida-maia*, *Dichelostemma congestum* ส่วนกลุ่มใหญ่ที่ 2 ประกอบด้วย 5 ชนิดพืช ได้แก่ *Lomandra longifolia*, *Asparagus officinalis*, *Sansevieria trifasciata*, *Dasyllirion wheeleri* และ *Ophiopogon japonicas* โดย 3 ชนิดพืชหลังมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุดในกลุ่ม (ภาพที่ 14)

ตารางที่ 13 รายชื่อพืชทั้ง 14 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนกับพลับพลึงธาร และหมายเลข Accession No.

organism	genes	accD	ndhH	ndhA	psaB	26srDNA
1. <i>Crinum asiaticum</i> L.		JQ277076	JQ276880	JQ276444	JQ276150	JQ213893
2. <i>Scadoxus cinnabarinus</i> (Decne) Friis & Nordal		JQ277078	JQ276882	JQ276446	JQ276152	JQ283889
3. <i>Amaryllis belladonna</i> L.		JQ277075	JQ276879	JQ276443	JQ276149	JQ283852
4. <i>Lomandra longifolia</i> Labill.		JQ277096	HQ181207	HQ180915	HQ181672	JQ283856
5. <i>Triteleia hyacinthine</i> (Lindl.) Greene.		JQ277110	JQ276914	JQ276478	JQ276184	JQ283854
6. <i>Xeronema callistemon</i> W.R.B. Oliv.		JQ277112	JQ276913	JQ276480	JQ276186	JQ283862
7. <i>Dichelostemma ida-maia</i> (Wood) Greene.		JQ277109	JQ276916	JQ276477	JQ276183	JQ283868
8. <i>Sansevieria trifasciata</i> Prain.		JQ277103	JQ276907	JQ276471	JQ276177	JQ283880
9. <i>Brodiaea californica</i> Lindl.		JQ277106	JQ276910	JQ276474	JQ276180	JQ283865
10. <i>Dichelostemma congestum</i> (Sm.) Kunth.		JQ277108	JQ276912	JQ276476	JQ276182	JQ283867

ตารางที่ 13 (ต่อ)

organism	genes	<i>accD</i>	<i>ndhH</i>	<i>ndhA</i>	<i>psaB</i>	26srDNA
11. <i>Asparagus officinalis</i> L.		JQ277080	HQ181186	JQ276448	JQ276154	JQ283882
12. <i>Dasyllirion wheeleri</i> S. Watson ex Rothrock.		JQ277098	JQ276902	JQ276466	JQ276172	JQ283857
13. <i>Xanthorrhoea preissii</i> Endl.		JQ277111	JQ276915	JQ276479	JQ276185	JQ283890
14. <i>Ophiopogon japonicus</i> (L.f.) Ker Gawl.		JQ277101	JQ276905	JQ276469	JQ276175	JQ283876



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 15 ชนิด สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับเบส บางส่วนของยีน 5 ชนิด (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, *26srDNA*) โดยใช้วิธี Maximum likelihood (ML) ในโปรแกรม BioEdit version 5.0.6

สรุป

1. ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากปลับปลิงธาร ด้วยวิธี Enrichment ร่วมกับเทคนิค Dot blot hybridization โดยใช้ $(CA)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ เป็นโพรบ โดยสามารถพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 26 คู่ คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ชัดเจน ขนาดตามที่คาดหมาย จำนวน 10 คู่ มาตรวจสอบกับปลับปลิงธารทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติจากจังหวัดระนองและจังหวัดพังงา รวมทั้งแหล่งจำหน่ายพันธุ์และกรมประมง พบว่าไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1-2 แถบ ในปลับปลิงธารทุกตัวอย่าง ยกเว้นไพรเมอร์ 5 คู่ คือ CriSat2, CriSat42, Crisat111, Crisat217 และ Crisat171 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยมีแอลลิล 2-5 แอลลิล ต่อตำแหน่งหรือต่อเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ค่า PICs ของแต่ละเครื่องหมายมีค่าอยู่ในช่วง 0.53-0.76 โดยมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.63 เมื่อคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ตามวิธีของ Nei and Li (1978) พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Genetic similarity) ตั้งแต่ 0.33-1.00 เฉลี่ยแต่ละคู่ตัวอย่างเท่ากับ 0.429 เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และสร้าง Dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA (NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k) สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างปลับปลิงธาร 55 ตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ 7 กลุ่มย่อย ที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.48 กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็นกลุ่มของปลับปลิงธารที่ได้จากแหล่งจำหน่ายพันธุ์ และที่เก็บมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ คลองเตริยม คลองคุระ และคลองตาซูด จังหวัดพังงา กลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นกลุ่มของปลับปลิงธารที่ได้จากแหล่งจำหน่ายพันธุ์ และที่เก็บมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ คลองเตริยม คลองตาซูด จังหวัดพังงา และคลองนาคา จังหวัดระนอง รวมทั้งปลับปลิงธารที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกรมประมง สรุปปลับปลิงธารในประเทศไทยยังคงพบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่าง

2. ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลับปลิงธารในตัวอย่าง 77 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์และเอเอฟแอลพี จากการใช้ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 33 แถบ เฉลี่ย 5.5 แถบต่อชนิดของไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างปลับปลิงธาร จำนวน 18 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ให้ความแตกต่างจำนวน 15 แถบ ไพรเมอร์ $(AC)_8YG$ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 7 แถบ ขนาดดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วง ประมาณ 0.4-2.0 กิโลเบส จากการใช้อีเอฟแอลพีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 371 แถบ เฉลี่ย 46.37 แถบ ต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างปลับปลิงธารจำนวน 178 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ให้ความแตกต่างจำนวน 193

เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TFPGA เพื่อประเมินสถานภาพทางพันธุกรรมพบว่า พลับพลึงธารทั้ง 7 แหล่งเก็บตัวอย่างมีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphic loci เฉลี่ยเท่ากับ 31.45% โดยพบว่าแหล่งจำหน่ายพันธุ์บริษัทไวท์เครน มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism สูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 59.15% ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมประเมินจากค่า Expected heterozygosity โดยเฉลี่ยของทุกแหล่งมีค่าเท่ากับ 0.129 ซึ่งแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุดคือแหล่งจำหน่ายพันธุ์บริษัทไวท์เครน (Expected heterozygosity = 0.238) ในขณะที่แหล่งที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphic loci ต่ำที่สุดคือแหล่งจากคลองบางปรู จังหวัดระนอง มีค่าเท่ากับ 4.878% ซึ่งสอดคล้องกับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำที่สุด (Expected heterozygosity = 0.020) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าตัวเลขที่ได้จากการวิเคราะห์นี้ ได้มาจากการประเมินตัวอย่างจากแหล่งคลองบางปรู จังหวัดระนอง ซึ่งมีจำนวนเพียง 2 ตัวอย่าง เป็นผลมาจากการที่พลับพลึงธารพบเจอในธรรมชาติได้ยาก จำนวนตัวอย่างที่น้อยนี้ ส่งผลต่อโอกาสในการตรวจพบ ความหลากหลายทางพันธุกรรม

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าพลับพลึงธารจากคลองเตรียม จังหวัดพังงา เป็นแหล่งที่มีค่าความความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดจากแหล่งน้ำธรรมชาติ จึงควรใช้พื้นที่ดังกล่าวเป็นแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมของพลับพลึงธารในแหล่งกำเนิด และควรให้มีการฟื้นฟูความหลากหลายทางพันธุกรรมในพื้นที่อื่นๆ ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ

3. ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนในพลับพลึงธาร จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *ndhF*, *accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 18srDNA และ 26srDNA โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด จากลำดับเบสของพืชชนิดต่างๆ ใน GenBank และใช้ตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DFLP ในพลับพลึงธารร่วมกับพืชในวงศ์เดียวกันอีก 5 ชนิด (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ได้แก่ พลับพลึงขาว พลับพลึงดินเป็ด พลับพลึงแดง *C. nathans* และ พลับพลึงหนู พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพืชทั้งหมดที่ศึกษาได้ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ (PCR-RFLP) พบว่ายังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพลับพลึงธาร แต่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพลับพลึงธารกับพืชในวงศ์เดียวกันได้

จากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 26 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างที่ศึกษาและสร้าง Dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA (NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.20k) พบว่าที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.57 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 4 กลุ่มย่อย กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็นพลับพลึงที่อยู่ในสกุล *Crinum*

ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มปลับปลิงธาร และกลุ่มปลับปลิงขาวกับปลับปลิงแดง กลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นปลับปลิงในสกุล *Hymenocallis* และ *C. nathans* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มของปลับปลิงตีนเป็ดกับ *C. nathans* และปลับปลิงหนู

ได้วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนในปลับปลิงธารทั้ง 7 ชนิด เพื่อยืนยันความจำเพาะของยีน และเป็นข้อมูลระบุความจำเพาะของสายพันธุ์ปลับปลิงธารของประเทศไทย เมื่อนำลำดับเบสของยีน 5 ชนิด (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26srDNA) ของปลับปลิงธาร มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนเดียวกันในพืชชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank รวม 14 ชนิดพืช วิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มด้วยวิธี Maximum likelihood พบว่าปลับปลิงธารและปลับปลิงขาว มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด ด้วยค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic distance) = 0.

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ณัฏฐา ศรีสวัสดิ์. 2545. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมะเขือเทศโดยการใส่
ดีเอ็นเอเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นฤมล เข้มกลัดเงิน, โชคชัย เอกทัศนาวรรณ และวิภา หงส์ตระกูล. 2547. การพัฒนาเครื่องหมายดี
เอ็นเอเพื่อการตรวจสอบการปลอมปนของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม, น. 134-135. ใน
รายงานผลงานโครงการที่ได้รับทุน IRPUS ประจำปี 2547. กรุงเทพฯ.
- ปรีชา ประเทพา และปิยวรา มีชัย. 2548. ลักษณะโมเลกุลของไมโครแซทเทลไลต์อาร์เอ็ม 17 ใน
พันธุ์ข้าวหอมและไม้อหอมของไทย, น. 378-392. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์
แห่งชาติ ครั้งที่ 14. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.
- วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และ รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอมน้ำ.
สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรม
ประมง.
- สจี อิ่มแดง. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศและความหลากหลายทาง
ชีวภาพของปรงสกุล *Cycas* และ *Zamia* โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญา
โท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 2553.
โครงการฝึกอบรมการอนุรักษ์พรรณไม้น้ำพลับพลึงธารเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน 12
มิ.ย. 2553. 15 หน้า
- สมศักดิ์ สุนทรนวกัฏ. ม.ป.ป. มารูจัก พลับพลึงธาร..พืชใกล้สูญพันธุ์กันดีกว่า (อัครำเนา)
- สุรินทร์ ปิยโชคนากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2549. เครื่องหมายโมเลกุลเซพเทลไลท์, น. 19-23. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. กรุงเทพฯ.

_____. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรรรัตน์ มงคลพร. 2543. การสร้าง **microsatellite marker** สำหรับพริก. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alghanim, H.J. and J.R. Almirall. 2003. Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. **Anal. Bioanal. Chem.** 376: 1225-1233

Areshchenkova, T. and M.W. Ganai. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theor. Appl. Genet.** 104: 229-235.

Ashworth, V.E.T.M., M.C. Kobayashi, M. De La Cruz and M.T. Clegg. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea Americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. **Scientia Hort.** 101: 225-267.

Ashkenazi, V., E. Chani, U. Lavi, D. Levy, J. Hillel and R.E. Veilleux. 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. **Genome** 44: 50-62.

Billotte, N., A.M. Risterucci, E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard and F.C. Baurens. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaxis guineensis Jacques*) microsatellite markers. **Genome** 44: 413-425.

- Butcher, P.A., S. Decroocq, Y. Gray and G.F. Moran. 2002. Developmental, inheritance and across-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. **Theor. Appl. Genet.** 101: 1282-1290.
- Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA amplification using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, in Micheli, R.M. and Bova, R. eds. Fingerprinting methods based on PCR. **Springer-Verlag**, Heidelberg, 199-134.
- Chagué, V., T. Fahima, A. Dahan, G.L. Sun, A.B. Korol, Y.I. Ronin, A. Grama, M.S. Röder, and E. Nevo. 1999. Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Yr15 gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. **Genome** 42: 1050-1056.
- Che, K.P., Q.C. Zhan, Q.H. Xing, Z.P. Wang, D.M. Jin, D.J. He and B. Wang. 2003. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. **Theor. Appl. Genet.** 106: 293-297.
- Chen, X.M., Y.H. Lou, X.C. Xai, O.Q. Xai, X. Chen, Z.L. Ren and J.Z. Jia. 2005. Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using marker analysis. **Plant Breed.** 124:225-228
- Chiba, N., K. Suwabe, T. Nunome and M. Hirai. 2003. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. **Genome** 47: 1091-1104.
- Clarke, J.B. and K.R. Tobutt. 2006. Development of microsatellite primers and two multiplex polymerase chain reaction for the common elder (*Sambucus nigra*). **Mol. Ecol.** 6: 453-455.
- Collevatti, R.G., R.V. Brondani and D. Grattapaglia. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity** 83: 748-756.

- Dirle, W.E., P. Cosson, M. Tavaud, M.J. Aranzana, C. Poizat, A. Zanetto, P. Arús and F. Laigret. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theor. Appl. Genet.** 105: 127-138.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.
- Edwards, K.J., J.H.A. Barker, A. Daly, C. Janes and A. Karp. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequence in plants. **Biotechnology** 20: 758-760.
- Fahima, T., M.S. Röder, A. Grama and E. Nevo. 1998. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. **Theor. Appl. Genet.** 96: 187-195.
- Fang, D.Q. and M.L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theor. Appl. Genet.** 95: 408-417.
- Gaitán-Solís, E., M.C. Daque, K.J. Edwards and J. Tohme. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. **Crop Sci.** 42: 2128-2136.
- Genger, R.K., K.J. Williams, H. Raman, B.J. Read, H. Wallwork, J.J. Burdon and A.H.D. Brown. 2003. Leaf scald resistance genes in *Hordeum vulgare* and *Hordeum vulgare* ssp. *Spontaneum*: parallels between cultivated and wild barley. **Aus. J. Agr. Res.** 54: 1335-1342
- Giimenes, M. A., A. Hoshino, A.V. Barbosa, D.A. Palmieri and C.R. Lopes. 2007
Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biol.** 7(9): 148-160.

- Goldstein, D.B. and C. Schöllerter. 1999. **Microsatellite Evolution and Application**. 1st ed. Oxford University Press, Great Britain.
- Gupta, P.K. and R.K. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica** 113: 163-185
- Gupta, P.K., H.S. Balyan, K.J. Edward, P. Isaac, V.Korzum, M. Röder, M.F. Gautier, P. Joudrier, A.R. Schlatter, S. Dubcovsky, R.C. De la Pena, M. Khairallah, G. Penner, M.J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R.C.C. Wang, J.P. Hardouin and P. Leroy. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bred wheat. **Theor. Appl. Genet.** 105: 413-422.
- Hadonou, A.M., D.J. Sargent, F. Wilson, C.M. James, and D.W. Simpson. 2004. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. **Genome**. 47: 429-438.
- Hamilton, M.B., E.L. Pincus, A. Di-Fiore and R.C. Fleischer. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellite. **Biotechniques**. 27: 500-507.
- He, G., R. Meng, M. Newman, G. Gao, R.N. Pittman and C.S. Prakash. 2003. Microsatellite as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biol.** 3(3): 1-6.
- Hicks, M., D. Adams, S.O. Keefe, E. Macdonald and R. Hodgetts. 1998. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. latifolia). **Genome** 41: 797-805

- Hongtrakul, V., M.B. Slabaugh, and S.J. Knapp. 1998. DFLP, SSCP and SSR markers for 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of unflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. **Mol. Breed.** 4: 195-203.
- Hossain, K.G., H. Kawai, M. Hayashi, M. Hoshi, N. Yamanaka and K. Harada. 2000. Characterization and identification of (CT)_n microsatellite in soybean using sheared genomic libraris. **DNA Res.** 7: 103-110
- Kadirvel, P., M. Maheswaran and K. Gunathilagaraj. 2003. Detection of simple sequence repeat markers associated with resistance to whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath), in rice. **Plant Breed.** 28: 22-23
- Korzun, V., M.S. Röder, A.J. Warland and A. Börner. 1997. Intrachromosomal mapping of the genes for *dwarfing* (*Rht12*) and *vernalisation response* (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. **Plant Breed.** 116: 227-232.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucl. Acid. Res.** 21: 1111-1115.
- Levinson, G. and G.A. Gutman. 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Echerichia coli* K-12. **Nucl. Acids. Res.** 15: 5323-5338.
- Li, F., G. Hu, Y. Fu, H. Si, X. Bai and Z. Sun. 2005. Genetic analysis and high-resolution mapping of a premature senescence gene *Pse(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome** 48: 738-746.
- Mariettea, S., D. Chagné, S. Decroocq, G. Giovanni, C. Lalannea, D. Madur and C. Plomion. 2001. Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. **Ann. For. Sci.** 58: 203-206

- Matos, M., M.V. Camacho, V. Pérez-Flores, B. Pernaute, O. Pinto-Carnide and C. Benito. 2005. A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. **Theor. Appl. Genet.** 111: 360-369.
- Miller, C.A., A. Altinkut and N.L.V. Lapitan. 2001. A microsatellite marker for tagging *Dn2*, a wheat gene conferring resistance to the Russian wheat aphid. **Crop Sci.** 41: 1584-1589.
- Morgante, M. and A.M. Oliveiri. 1993. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **Plant J.** 3: 175-182.
- National Center of Biotechnology Information (NCBI). n.d. a **BLAST Reference Manual Pages**. Available http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_http.html, April 17, 2002.
- Nei, M. and W. Li. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. **Genetics** 89: 583-590.
- Novelli, V. M., M. Cristofani, A. Souza and M.A. Machado. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genet. Mol. Biol.** 29: 90-96.
- Padmaja, K.L., N. Arumugam, V. Gupta, A. Mukhopadhyay, Y.S. Sodhi, D. Pental and A.K. Pradhan. 2005. Mapping and tagging of seed coat color and the identification of microsatellite markers for marker-assisted manipulation of the trait in *Brassica juncea*. **Theor. Appl. Genet.** 111: 8-14.
- Paniego, N., M. Echaide, M. Munoz, L. Fernández, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeni, E.Y. Suárez and H.E. Hopp. 2001. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Genome** 45: 34-43.
- Rahman, M.H., S. Dayanandan and O.P. Rajora. 2000. Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. **Genome** 43: 293-297.

- Raman, H., A. Karakousis, J.S. Moroni, R. Raman, B.J. Read, D.F. Garvin, L.V. Kochian and M.E. Sorrells. 2003. Development and allele diversity of microsatellite markers linked to the aluminium tolerance gene *Alp* in barley. **Aust. J. Agr. Res.** 54: 1315-1321.
- Rao, K.K., K.K. Jena and M.L. Narasu. 2003. Molecular tagging of a new bacterial blight resistance gene in rice using RAPD and SSR markers. **Plant Breed.** 28: 16-17.
- Richard G.F. and F. Pâqjues. 2000. Mini-and microsatellite expansion: the recombination connection. **EMBO Rept.** 11: 122-126.
- Ritschel, P.S., T.C.L. Lins, R.L. Tristan, G.S.C. Buso, J.A. Buso and M.E. Ferreira. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biol.** 4: 1-14.
- Shokeen, B., N.K. Sethy, S. Kumar and S. Bhatia. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers for analysis of molecular variation in the medicinal plant Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Plant Sci.** 172: 441-451.
- Slabaugh M.B., G.M. Huestis, J. Leonard, J.L. Holloway, C. Rosato, V. Hongtrakul, N. Martini, R. Toepfer, M. Voetz, J. Schell and S.J. Knapp. 1997. Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformational polymorphism for the fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. **Theor. Appl. Genet.** 94: 400-408.
- Suenaga, K., R.P. Singh and H.M. Manilal. 2001. **Tagging of Slow Rusting Genes for Leaf Rust, Lr34 and Lr46, using Microsatellite Markers in Wheat.** Available Source: (<http://ss.jircas.affrc.go.jp/english/publication/highlights/2001/pdf/2001-04.pdf>, Feb 1, 2770.)
- Sun, M. and K.C. Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **Am. J. Bot.** 88: 2180-2188.

- Tan, X.L., Y.L. Tan, Y.H. Zhao, X.M. Zhang, R.K. Hong, S.L. Jin, X.R. Liu, and D.J. Huang. 2004. Identification of the Rf gene conferring fertility restoration of the CMS Dian-type 1 in rice by using simple sequence repeat markers and advanced inbred lines of restorer and maintainer. **Plant Breed.** 123: 338-341.
- Tani, T., T. Ujino-Ihara, H. Iwata, K. Yoshimura and Y. Tsumura. 2004. Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. **Ann. For. Sci.** 61: 569-575.
- Thompson, I.J. Gibson. 1994. CLUSATL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22 (22): 4673-4680.
- Vikal, Y., P. Chuneja, R. Singh and H.S. Dhaliwal. 2004. Tagging of an *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene Lr 28 with a microsatellite markers in wheat. **J. Plant Biochem. Biotechnol.** 13: 47-49.
- Vos, P., R. Hogers, M. Blecker, M. Reijans, T. vande Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Wang, X.W., A. Kaga, N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. **Theor. Appl. Genet.** 109(2): 352-60.
- Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theor. Appl. Genet.** 88: 1-6.
- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be types using polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 388-396.

- Wei, Y.M., Y.C. Hou, Z.H. Yan, W. Wu, Z.O. Zhang, D.C. Liu and Y.L. Zhenf. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. **J. Appl. Genet.** 46: 3-9.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.I. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 18: 6231-6235.
- Xing, Q.H., Z.G. Ru, C.J. Zhou, X. Xue, C.Y. Liang, D.E. Yang, D.M. Jin and B. Wang. 2003. Genetic analysis, molecular tagging and mapping of the thermo-sensitive genic male sterile gene (*wtms1*) in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 107: 1500-1504.
- Yang, W., D.B. Weaver, B.L. Nielsen and J. Qiu. 2001. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in 'Peking'. **Plant Breed.** 120: 73-78.
- Yong, X., M. Rong-Cai, X. Hua, L. Jian-Ting and C. Ming-Qing. 2004. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees China and Mediterranean region. **Genome** 47: 1091-1104.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.



1. *ndhF* gene

AGTGTTTTGATGCTAAGTATAGCTATGGTATTTTCGGCCAATCTGTCTATTCAACAAATAAATGGA
 AATTTTATCTATCAATATCTATGGTCTTGGACTGTCAATAATGATTTTTCTTTAGAGTTCGGACACT
 TGATCGATCCACTTACTTCTATTATGTCAATATTAATTACTACTGTTGGAATCATGGTTCTTATTTA
 TAGTGACAATTATATGTCTCACGATCAAGGATATTTGAGATTTTTTGCTTATATGAGTTTTTTCAAT
 ACTTCTATGTTGGGATTAGTTACTAGTTCCAATTTGATACAAATTTATATTTTTTGGGAACCTTGTAG
 GAATGTGTTTCGTATTTATTAATAGGTTTTTGGTTTCACACGTCCAATTGCGGCAAGTGCTTGTCAAA
 AAGCTTTTGTAACCAATCGTATAGGGGATTTTGGTTTATTATTAGGAATTTTAGGACTTTATTGGAT
 AACTGGTAGTTTAGAATTTGCGGATTTGTTTCGAAATAGTTAATAACTTAGTTCGTAATAATGGAGT
 GGATTCTTTATTTGCTACTCTGTGTGCTTCTTTTTATTTGTTCGGTGCAGTTGCTAAATCCGCACAAT
 TCCCTCTTCACATATGGTTACCCGATGCTATGGAGGGACCTACTCCCATTTTCGGCTCTTATACATGC
 TGCTACTATGGTAGCAGCGGAATTTTCTTGTAGCTCGGCTTCTTCCCCTTTTCATAGTTATACCT
 TACATAATGAATCTCATTCTTTAATAGGCGTAATAACAGTACTATTAGGAGCTACTTTAGCTCTT
 GCTCAAAGAGACATTAAGAAGTTTAGCTTATTCTACAATGTCTCAATTGGGTTATATTATGTTA
 GCTCTGGGTATAGGTTCTTATCGAGCCGCTTTATTCCATTTGATCACTCATGCCTATTCGAAAGCTT
 TATTGTTTTTGGGATCCGGATCCATTATTCATTCAATGGAACCCATTGTTGGATATTCACCAGAGA
 AAAGTCAAAATATGGTTCTTATGGGGGGTTTAACAAAATATGTTCCAATTACAAGAATTACTTTTT
 TATTAGGTACACTCTCTCTTTGTGGTATTCCACCTCTTGCTTGTTTTTGGTCCAAAGACGAAATTCT
 TAATGATAGTTGGTTGTATTACCAATTTTCGCAATAATAGCTTCCTTCACAGCAGGATTAACCGC
 ATTTTATATGTTTCGGATGTATTTACTTACCTTTGATGGACATTTGCGGATTCATTTTCAAATTAC
 AGTAGCACTCAAATAGTTCTTTCTATTCAATATCTTTATGGGGAAAAGAAGTACCCAAAGCAGTC
 AATAGAAATTTACTTTTATCAACAATGAACAATAAGGTCTTTTTTTTTCAAAGATACATATCGA
 ATTGATGATAATGTAAGAAATAGAGTACGATACTTTAGTACTTACTTTAGCTTTAGAAATAAATAC
 ACTTACACCTATCCTCACGAATCAGACAATACTATGTTATTTCCACTGCTTGTATTGGTACTATTTA
 CTTTATTCGTTGGAGCAATCGGAATTCATTTTGATCGAGGAGTAATAGATTTTGATCTATTGTCTGA
 AATGGTTAACTCCATCCGCAAAATTTTCCATCCAAATTCGAACGGTCTTCGGATTGGTATGATTT
 TTTTAAAAATGCAGTTTTTTTCGGTAAGTATAGCTCTTTTTGGATTATTTGTAGCATCCATTTTATAT
 GGATCTGTTTATTCATCTCTACAGAATTTGG

ภาพผนวกที่ 1 ลำดับเบสที่บางส่วน (Partial sequence) ของยีนในปลับปลิงธาร
 ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด

2. *accD* gene

ACACATTCCTAGTTGGAATGATAGTGGTAGTTATAGTTTCAGTAATGTTGATTATTTATTTGATATC
CGGAATATTTGGAGTTTTCTCTCTGATAACACTTTTTTAGTTAGGGATGGTAATGGTGACAGTTATT
CTGTATATTTTGACATTGAAAATCATATTTTTGAGATTGACAATAATAGTTTTTTTTCTGAGTGAAC
AGAAAGCTTTTTTCCAGTTATTTGAATAATAGGCCTAAGAGTAACAATCACTACTATTATCATT
CATGTATGATACTCAATCTAGTTGGAATAATCACATTAATAGTTGCATTGATAGTTATCTTCGTTTT
GAAGTCAGTATTCATAGTTACATTTTCGATGGTACCGAAAATTACAGTGACAGTTACATTTCTAGT
TTCATTTGTAAGGCGTAAGCAGTAGTGCAAGTGGGAATTCTAGTATAAGAACTGGTGGTAA
TAGCCGTGATTTCAATATAAGAGGAGGATCTAATGATTTAGATAGAAATAAAAAATACAGAAATT
TATGGGTTCAATGCGAAAATTGTTATGGATTAAATTATAAAAAATTTTTAGGTCAAAAATGAATA
TTTGCGAACAGTGTGGATATCATTTGAAAATGAGTAGTTCAGATAGAATCGAACTTTTGATTGATC
CGGGCACTTGGGATCCTGTGGATGAAGATATGGTCTCCACGGACCCCATGAATTTCAATCAGAGG
AGGAACCTTATAGAGATCGTATCGATTCTTATCAAAGAAGGACAGGTTTAACTGAAGCTGTTCAA
ACGGGCATAGGTCAACTAAATGGTATTCCCATAGCAATTGGGGTTATGGATTTTCAGTTTTTGGGA
GGTAGTATGGGATCCGTAGTAGGCGAGAAAATCGCGCGTTTGATCGAATATGCTACTAATCGATC
TCTACCAGTCATTATTGTGTGTGCTTCTGGAGGAGCACGCATGCAAGAAGGAAGTTTAAGCTTGAT
GCAAATGGCTAAAATATCTTCTGCTTCATATAATTATCAATCAAATAAAAAGTTATTCTATGTATC
AATCCTTACATCTCCTACAACCTGGTGGAGTAACCTGCCA

3. *ndhH* gene

GGGGTTCTTAGACTGATCGTTACTCTCGATGGTGAAGATGTTATTGACTGTGAACCCGTATTGGGT
TATTTACACAGAGGGATGGAAAAATAGCGGAAAATCGAACAATTATACAATATTTGCCTTATGT
AACACGATGGGATTATTTAGCCACTATGTTACAGAAGCAATAACAGTAAATGCACCAGAACGTT
TGGAAAGTGTCCAAGTGCCTAAAAGAGCCAGTTACATTAGAGTAATTATGCTAGAACTGAGTCGT
ATAGCTTCTCATTTGTTATGGCTTGGGCCTTTTATGGCGGATATCGGTGCACAGACTCCCTTTTCT
ATATTTTCAGAGAAAGGGAATTGTTATATGATCTATTCGAAGCCGCTACAGGTATGCGAATGATGC
ATAATTATTTCCGTATTGGGGGAGTTGCTGCTGATCTACCTTATGGCTGGATAGATAAATGTTTGG
ATTTCTGCGATTATTCTTTAACAGGAATTGTTGAATATCAAAAACCTTATTACGCGGAATCCTATTTT
TTTGGAACGAGTTGAAGGGTGGGCATTATTAGGGGAGAGGAAGCAATAAATTGGGGTTTATCAG
GACCGATGCTACGAGCTTCCGGAATCCAATGGGATCTTCGTAAAGTTGATCATTATGAGTGTATA

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

ATAAATTCGATTGGGAAGTCCAATGGCAAAAAGAAGGAGATTCACTAGCCCGTTATTTAGTACGA
 ATCGGTGAAATGAAGGAATCTATAAAAATTATTCAACAGGCTCTGGAAGGAATTCCTGGAGGACC
 CTATGAAAATTTAGAAGTCCGACGCTTTGATAGAGCAAAAAATCCCGAATGGAATAATTTTGAAT
 ATAGATTTATTACTAAAAAACTTTACCCAATTTTGAATTGTCGAAACAAGAACTTTATGTGAGAG
 TAGAAGCCCCAAAAGGGGAATTAGGAATTTATTTGATAGGAGATAGTAGTGTTTTCCCCTGGAGA
 TGGAAAATTCGTCCGCCTGGTT

4. *psaB* gene

CCGCGCATGACTTTGAGAGTCATGATGATATTACTGAGGAACGTCTTTATCAGAACATTTTTGCTT
 CTCACTTTGGGCAGTTAGCAATAATCTTTCTGTGGACGTCCGGAATCTGTTTCATGTAGCATGGC
 AAGGAAATTTTGAGTCATGGATACAGGACCCTTTACATGTAAGACCTATTGCTCATGCAATTTGGG
 ATCCTCATTTTGGTCAACCAGCCGTAGAAGCCTTTACTCGAGGAGGTGCTATCGGCCCAGTGAATA
 TCGCTTATTCGGTGTTTATCAGTGGTGGTATACAATCGGATTACGCACCAATGAGGATCTTTATA
 CTGGAGCTCTTTTTCTATTATTTCTTTCTGCTATATCCTTAATAGCGAGTTGGTTACACCTACAACC
 TAAATGGAAACCGAGCGTTTCGTGGTTCAAAAATGCCGAATCTCGTCTCAATCATCATTTGTCAGG
 ACTTTTTGGAGTAAGCCCTTGGCTTGGACAGGACATTTAGTTCATGTGCTATTCCCGGATCCAGG
 GGACAGTACATCAGATGGAATAATTTCTTAGACGTATTACCGTATCCCCAAGGGTTGGAACCGCTT
 CTTACGGGTCAGTGAATCTTTATGCCAAAACCCCGATTCCAGTAGTCATTTATTTGGTACCTCC
 CAAGGAGCAGGAACTGCCATTCTAACCCTTCTTGGGGGATTCCATCCACAAACGCAAAGCTTATG
 GCTGACCGATATTGCTCATCATCATTTAGCTATTGCATTTATTTTCTCGTTGCCGGTCATATGTAT
 AGAACTAACTTCGGGATTGGGCATAGTATCAAAGATCTTTTAGAAGCGCATACTCCTCCGGGGGG
 CCGATTAGGACGCGGGCATAAGGGTCTATATGACACAATCAATAATTCGATTCATTTTCAATTAGG
 CCTTGCTCTAGCCTCTTTAGGGGTTATTACTTCCTTAGTAGCCCAACACATGTATTCTTTACCTGGT
 TATGCATTCATAGCACAAGACTTTACTACTCAAGCTGCATTATATACTCATCACCAATACATAGCG
 GGGTTTATCATGACAGGAGCCTTGCTCATGGAGCTATATTCTTCATTAGAGATTATAACCCGGAG
 CAGAATGAGGATAATGTATTGGCAAGAATGTTAGACCATAAGGAAGCTATCATATCTCATTTAAG
 TTGGGCCAGCCTCTTCCTGGGGTTCCATACCCTAGGTCTTTATGTTTCATAACGACGTCATGCTCGCT
 TTTGGTACTCCGGAAAAACAAATCTTGATCGAACCATATTTGCCCAATGGATACAATCCGCTCAT
 GGTAAGACTTCATATGGGTTTCGATGTACTTTTATCTTCAACAACCGGACCGGCATTCAATGCAGGT
 CGAAGCATATGGTTACCCGGTTGGTTAAATGCTATTAATGAAAATAATAATTCCTCTTCTTAACA

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

ATAGGTCCGGGGGATTCTTGGTTCATCATGCAATTGCTCTAGGTTTGCATACAACACTACATTGATTT
 TAGTAAAAGGTGCTTTAGATGCACGTGGTTCCAAATTAATGCCAGATAAAAAGGATTTTCGGTTAT
 AGTTTTCTTTCGACGGCCAGGACGTGGGGGTACTTGTGATATTTCTGCTTGGGACGCATTTTAT
 TTGGCAGTTTTCTGGATGTTAAATACCATCGGATGGGTCACTTTTTTATTGGCATTGGAAACACATC
 ACATTATGGCAGGGTAATGTTTCACAATTTAATGAATCTTCCACTTATTTGATGGGGTGGTTAAGA
 GATTATCTATGGTTAAACTCTTCACAACCTTATCAATGGATATAACCCTTTTGGTATGAATAGTTTAT
 CGGTATGGGCATGGATGTTTTTATTTGGACATCTTGTTTGGGCTACTGGATTTATGTTCTTAATTTT
 CTGGCGGGGCTATTGGCAGGAATTAATTGAACTTTAGCATGGGCTCATGAACGCACACCTTTGG
 CTAATTTGATTTCGATGGAGAGATAAGCCAGTGGCTCTTTCCATTGTGCAAGCAAGATTAGTTGGAT
 TAGCACACTTT

5. 26srDNA gene

GGGGACACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCTT
 AGTAACGGCGAGCGAACCAGGAGAGAGCCAGCCTGGGAATCGGGCGGCTGTGCCGTCTGAATTGT
 AGTCTGGAGAAGCGTCCTCAGCGACGACTGGGCCAAGTCCCCTGGAAAGGGGTGCCTGGGAGG
 GTGAGAGCCCCATTTCGGCCCGGACCCTGCCGCATCACGAGGCGTTGTTCGGCGAGTCGGGTTGTTTG
 GGAATGCAGCCCCAATTGGGCGGTAAATTTCTGCCAAGGCTAAATAGCGGCGAGAGGCCGACAGC
 GAACAAGTACCGCGAGGGAAAGATGAAAAGGACTTTGAAAAGAGAGTCAAAGAGTGCTTGAAAT
 TGTCGGGAGGGAAGCGGATGGGGGTTCGGCGATGTGCGTCGGTCGGATGCGGAACGGTCCCTCT

6. *ndhA* gene

GAAGTCTATGGACTCATATGGATCTTTGTTCTTATTTTCGCCCTTATATTGGGAATCACAATAGGGG
 TACTAGTAATTGTGTGGTTAGAAAGAGAAATATCCGCAGCAATACAACAACGTATTGGGCCTGAA
 TATGCGGGCCCATTAGGAATTCTTCAAGCTCTAGCGGACGGGACCAAATTACTTTTTAAAGAGGAC
 CTCCTCCCATCTAGAGGAGATATTCGTTTGTTCAGCGTGGGACCGTCTATAGCGGTCATATCAGTTC
 TACTAAGTTATTTAGTAATTCCTTTTGGGTATCGCCTTGTTTTGGCCGATCTCAGTATAGGAGTCTT
 TTTATGGATCTCCATTTCAAGTATTGCTCCTATGGGGCTTCTTATGTCAGGATATGGATCGAATAAT
 AAATATTCCTTTGTGTTATCAATATCTCTATCAGGTGGTCTACGGGCTGCTGCTCAATCTATTAGTT
 ATGAAATACCATTAACTCTATGTGTGTTATCAATATCTCTATTATCTAATAGTTCAAGTACAGTTGA
 TATAGTTGAGGCACAGTCAAAATATGGGTTTTGGGGATGGAATCTTTGGCGTCAGCCTATAGGGTT
 TGTGTTTTTTCTAATTTCTTCTCTAGCGGAATGTGAGAGATTACCCTTTGATTTACCAGAAGCAGAG
 GAGGAATTAGTAGCAGGGTATCAAACAGAATATTCAGGTATCAAATACGCTCTATTTTACCTTGCT
 TCTTACCTAAATTTATTAGTTTCTTCATTATTTATAACAGTTCTTTACTTAGGTGGGTGGAATTTCTC

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

CATTCCGTACATATCCATTCTGAACTTTTCGGAATAAAATAAAATGGCTGGAGTCTTTGGAATGAC
AATTGGGACTTATATATTTATTACATTAGCTAAAGCTTATTTGTTTCTGTTTCATTCTATCGCAGCA
AGAT

7. 18s rDNA

TTTTGGAAGGGATGCATTTATTAGATAAAAGGTCAATGCGGGCTCTGCTCGGTGCTCTGATGATTC
ATGATAACTAGACGGATCGCACGGCCCATGTGCTGGCGACGCATTCGAATTTCTGCCCTATCA
ACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGATT
CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC
AATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTCTATCGAGTCTGGTAATTG
GAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAGCGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTT
GGGTTGGGACGGTCGGTCCGCCATCGGTGAGCACCGACCGTCTTGTCCTTCTGCCGGTGATGCGC
TCCTGGACTTAAATGGCCGGGTCTGTCCTCCGGCGCCGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAA
GCAAGCTTACGCTCTGTATACATTAGCATGGGATAACATCACAGGATTTCCGGTCCTATTGTGTTGG
CCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAAGAGGGATAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCATAGTCAGAGGT
GAAATTCTTGATTATGAAAGACGAACAACCTGCGAAGCCATTGCCAA

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อตัวอย่าง
1	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 1 จังหวัดพังงา
2	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 2 จังหวัดพังงา
3	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 3 จังหวัดพังงา
4	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 4 จังหวัดพังงา
5	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 5 จังหวัดพังงา
6	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 6 จังหวัดพังงา
7	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 7 จังหวัดพังงา
8	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 8 จังหวัดพังงา
9	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 9 จังหวัดพังงา
10	พลับพลึงธาร คลองเตรียม 10 จังหวัดพังงา
11	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 1 บริษัทไวท์เครน
12	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 2 บริษัทไวท์เครน
13	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 3 บริษัทไวท์เครน
14	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 4 บริษัทไวท์เครน
15	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 5 บริษัทไวท์เครน
16	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 6 บริษัทไวท์เครน
17	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 7 บริษัทไวท์เครน
18	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 8 บริษัทไวท์เครน
19	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 9 บริษัทไวท์เครน
20	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 10 บริษัทไวท์เครน
21	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 11 สวนจตุจักร
22	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 12 สวนจตุจักร
23	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 13 สวนจตุจักร
24	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 14 สวนจตุจักร
25	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 15 สวนจตุจักร
26	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 16 สวนจตุจักร
27	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 17 สวนจตุจักร
28	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 18 สวนจตุจักร
29	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 19 สวนจตุจักร
30	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 20 สวนจตุจักร
31	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 21 สวนจตุจักร
32	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 22 สวนจตุจักร

ภาพผนวกที่ 2 รายชื่อพลับพลึงธารและพืชชนิดอื่นในวงศ์ Amaryllidaceae

หมายเลข	ชื่อตัวอย่าง
33	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 23 สวนจตุจักร
34	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 24 สวนจตุจักร
35	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 25 สวนจตุจักร
36	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 26 สวนจตุจักร
37	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 27 สวนจตุจักร
38	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 28 สวนจตุจักร
39	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 29 สวนจตุจักร
40	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 30 สวนจตุจักร
41	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 31 บริษัทไวท์เครน
42	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 32 บริษัทไวท์เครน
43	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 33 บริษัทไวท์เครน
44	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 34 บริษัทไวท์เครน
45	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 35 บริษัทไวท์เครน
46	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 36 บริษัทไวท์เครน
47	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 37 บริษัทไวท์เครน
48	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 38 บริษัทไวท์เครน
49	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 39 บริษัทไวท์เครน
50	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 40 บริษัทไวท์เครน
51	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 41 บริษัทไวท์เครน
52	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 42 บริษัทไวท์เครน
53	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 43 บริษัทไวท์เครน
54	พลับพลึงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 44 บริษัทไวท์เครน
55	พลับพลึงธารคลองตาสุด 1 จังหวัดพังงา
56	พลับพลึงธารคลองตาสุด 2 จังหวัดพังงา
57	พลับพลึงธารคลองตาสุด 3 จังหวัดพังงา
58	พลับพลึงธารคลองตาสุด 4 จังหวัดพังงา
59	พลับพลึงธารคลองตาสุด 5 จังหวัดพังงา
60	พลับพลึงธารคลองตาสุด 6 จังหวัดพังงา
61	พลับพลึงธารคลองตาสุด 7 จังหวัดพังงา
62	พลับพลึงธารคลองเตรียม 11 จังหวัดพังงา
63	พลับพลึงธารคลองเตรียม 12 จังหวัดพังงา
64	พลับพลึงธารคลองเตรียม 13 จังหวัดพังงา

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อตัวอย่าง
65	ปลั๊กปลิงธารคลองเตรียม 14 จังหวัดพังงา
66	ปลั๊กปลิงธารคลองเตรียม 15 จังหวัดพังงา
67	ปลั๊กปลิงธารคลองคุระ 1 จังหวัดพังงา
68	ปลั๊กปลิงธารคลองคุระ 2 จังหวัดพังงา
69	ปลั๊กปลิงธารคลองคุระ 3 จังหวัดพังงา
70	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 45 สวนจตุจักร
71	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 46 สวนจตุจักร
72	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 47 สวนจตุจักร
73	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 48 สวนจตุจักร
74	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 49 สวนจตุจักร
75	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 50 สวนจตุจักร
76	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 51 สวนจตุจักร
77	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 52 สวนจตุจักร
78	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 53 สวนจตุจักร
79	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 54 สวนจตุจักร
80	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 55 สวนจตุจักร
81	ปลั๊กปลิงธารคลองกำพวน 1 จังหวัดระนอง
82	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 56 สวนจตุจักร
83	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 57 สวนจตุจักร
84	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 58 สวนจตุจักร
85	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 59 สวนจตุจักร
86	ปลั๊กปลิงธารคลองตาผูด 8 จังหวัดพังงา
87	ปลั๊กปลิงธารคลองบางปรู 1 จังหวัดระนอง
88	ปลั๊กปลิงธารคลองบางปรู 2 จังหวัดระนอง
89	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 60 บริษัทไวท์เครน
90	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 61 บริษัทไวท์เครน
91	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 62 บริษัทไวท์เครน
92	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 63 บริษัทไวท์เครน
93	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 64 บริษัทไวท์เครน
94	ปลั๊กปลิงธารแหล่งจำหน่ายพันธุ์ 65 บริษัทไวท์เครน
95	ปลั๊กปลิงธารคลองตาผูด 9 จังหวัดพังงา
96	ปลั๊กปลิงธารคลองตาผูด 10 จังหวัดพังงา

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อตัวอย่าง
97	ปลั๊บลึงธารคลองตาผุด 11 จังหวัดพังงา
98	ปลั๊บลึงธารคลองตาผุด 12 จังหวัดพังงา
99	ปลั๊บลึงธารคลองตาผุด 13 จังหวัดพังงา
100	ปลั๊บลึงธารคลองตาผุด 14 จังหวัดพังงา
101	ปลั๊บลึงธารคลองตาผุด 15 จังหวัดพังงา
102	ปลั๊บลึงธารคลองตาผุด 16 จังหวัดพังงา
103	ปลั๊บลึงธาร Tissue culture 1 กรมประมง
104	ปลั๊บลึงธาร Tissue culture 2 กรมประมง
105	ปลั๊บลึงธาร Tissue culture 1 กรมประมง
106	ปลั๊บลึงธารคลองนาคา 1 จังหวัดระนอง
107	ปลั๊บลึงธารคลองนาคา 2 จังหวัดระนอง
108	ปลั๊บลึงธารคลองนาคา 3 จังหวัดระนอง
109	ปลั๊บลึงธารคลองนาคา 4 จังหวัดระนอง
110	ปลั๊บลึงธารคลองนาคา 5 จังหวัดระนอง
111	ปลั๊บลึงขาว จังหวัดระนอง สวนจตุจักร
112	ปลั๊บลึงดินเป็ด สวนจตุจักร
113	ปลั๊บลึงแดง สวนจตุจักร
114	<i>Crinum Nathans</i> แหล่งจำหน่ายพันธุ์ บริษัทไวท์เกรน
115	ปลั๊บลึงหนู สวนจตุจักร

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวเมธิญา ช้างเจริญ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 พฤศจิกายน 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต) สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง (พ.ศ. 2551)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนวิจัยมหาวิทยาลัย สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (MAG Window I) ปี 2554 - ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัย และพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2554