การจำแนกทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรีโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

โองการ วณิชาชีวะ
ศรีสมร วนกรกุล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
2554
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

การจำแนกทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรีโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

โองการ วณิชาชีวะ
ศรีสมร วนกรกุล

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
2554
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

บทคัดย่อ

หัวข้อวิจัย	การจำแนกทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรีโดยเทคนิคอาร์เอพีดี
ผู้วิจัย	โองการ วณิชาชีวะ
	ศรีสมร วนกรกุล
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
พ.ศ.	2554

จากการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมเบื้องต้นของทุเรียนในจังหวัดนนทบุรีจำนวน 14 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ทดสอบด้วยไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 9 ไพรเมอร์ คือ OPAM-03, OPAM-12, OPAM18, OPB-01, OPB-14, OPC-01, OPC-05, OPK-05, และ OPZ-03 จากไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนทั้งหมด 145 แถบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 50 ถึง 3000 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 30 แถบ (20.68%) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนนนทบุรีได้ 2 กลุ่มโดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.235-0.929 กลุ่มที่หนึ่งได้แก่ กบสาวน้อย, กบวัดกล้วย, กบตาเต่า, กบชายน้ำ, กบแม่เฒ่า และกบตาขำ กลุ่มที่สองได้แก่ ย่ามะหวาด, ชะนี, ลวง, ทองย้อยฉัตร, ฉัตรสีทอง, ก้านยาว และหมอนทองจึงสรุปได้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่สามารถหาความสัมพันธ์ของทุเรียนในจังหวัดนนทบุรีได้

Abstract

Research Title	Classification of Durian cultivars in Nonthaburi province by RAPD technique
The Researcher	Ongkarn Vanijajiva
	Srisamorn Vanakornkul
Institution	Faculty of Science and Technology
Year	2011

Genetic variation among 14 accessions of cultivars Durian was investigated using RAPD. Nine primers (OPAM-03, OPAM-12, OPAM18, OPB-01, OPB-14, OPC-01, OPC-05, OPK-05, and OPZ-03) were chosen for further analysis. A total of 145 DNA fragments, varying from 50-3000 bp, were amplified, of which 30 bands (20.68%) were polymorphic. Based on the results from the dendrogram analysis, two clusters could be separated with similarity coefficients ranging from 0.235-0.929. The first subgroup was included Kop Saonoi, Kop Watklaul, Kop Tatao, Kop Chainam, Kop Maethao and Kop Takum. The second subgroup was included Yummawad, Chanee, Luang, Thongyoichat, Chatsrithong, Kanyao, Kampan and Monthong. Therefore, RAPD are rapid and suitable methods for analysis of genetic diversity among Nonthaburi's durian cultivars.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ซึ่งกรุณาสละเวลา ให้คำแนะนำตลอดการทำการวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับทำงานวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และผู้ทรงคุณวุฒิในการตรวจสอบและให้แนวคิดเพื่อให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคุณอดิศรณ์ ฉิมน้อย ที่ปรึกษาชมรมอนุรักษ์และฟื้นฟูทุเรียนนนทบุรี เจ้าของทุเรียนสวนตาก้านสำหรับสายพันธุ์ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี รวมทั้งความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์

คณะผู้จัดทำ

1 เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....(1)

Abstract.....(2)

กิตติกรรมประกาศ.....(3)

สารบัญ.....(4)

รายการตาราง.....(5)

รายการภาพ.....(6)

1. บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง.....1

1.2 บทตรวจเอกสาร.....2

1.3 วัตถุประสงค์.....13

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุพืช.....14

2.2 อุปกรณ์.....16

2.3 วิธีการ.....16

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การสกัดดีเอ็นเอทุเรียน.....21

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ.....21

3.3 การตรวจสอบสายพันธุ์ทุเรียนโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี.....22

3.4 การจำแนกความสัมพันธ์ของทุเรียน.....32

3.5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....35

4. สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุป.....37

4.2 ข้อเสนอแนะ.....38

5. เอกสารอ้างอิง.....39

6. ประวัติผู้วิจัย.....41

รายการตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา.....14

ตารางที่ 2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์.....15

ตารางที่ 3 ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์.....18

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์.....19

ตารางที่ 5 แสดงค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของทุเรียน 14 สายพันธุ์.....32

รายการภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะของทุเรียน....4

ภาพที่ 2 แผนที่ของจังหวัดนนทบุรี....7

ภาพที่ 3 หลักการทำงานของพีซีอาร์....11

ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการสกัดด้วย CTAB โดยใช้ใบอ่อนทุเรียน....21

ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-03....23

ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-12....24

ภาพที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-18....25

ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-01....26

ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14....27

ภาพที่ 10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-01....28

ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-05....29

ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPK-05....30

ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPZ-03....31

ภาพที่ 14 สายสัมพันธ์ของทุเรียน....33

ภาพที่ 15 กลุ่มความสัมพันธ์ของทุเรียน....34

1. บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยที่นับว่ามีข้อมูลการศึกษาด้านความหลากหลายและการศึกษาในระดับพันธุกรรมน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีปลูกในจังหวัดนนทบุรี นอกจากนี้ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกในบริเวณนี้ลดลงมาก เนื่องจากปัญหาน้ำท่วม ที่ส่งผลให้พื้นที่ปลูกทุเรียนเดิมเสียหายเป็นจำนวนมาก ประกอบกับชาวสวนทุเรียนในพื้นที่จังหวัดนนทบุรีบางส่วนเลิกปลูกทุเรียน หันมาปลูกพืชที่ต้นทุนต่ำ และให้ผลผลิตรวดเร็วกันมากขึ้น รวมทั้งนนทบุรีเป็นจังหวัดหนึ่งที่มีการขยายตัวของชุมชนเมือง มีการตัดถนนเพิ่มขึ้นหลายเส้นทาง ทำให้พื้นที่การปลูกทุเรียนลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการการศึกษาถึงความหลากหลายของทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นของจังหวัดนนทบุรีโดยเร่งด่วนเพื่อที่จะได้มีข้อมูลพื้นฐานของพืชในกลุ่มนี้ก่อนที่ทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นของจังหวัดนนทบุรีจะสูญหายไปในที่สุด

ความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นองค์ประกอบหนึ่งของความหลากหลายทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพด้านการเกษตรที่มีประสิทธิภาพ จึงควรจะต้องมีข้อมูลสถานะภาพทรัพยากรทางพันธุกรรมสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถสำรวจและประเมินได้โดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบสำคัญ ซึ่งเป็นพื้นฐานที่จะทำให้เกิดการวิวัฒนาการและมีโอกาสในการอยู่รอดและปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายและผันแปร ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงเป็นหัวใจหลักหนึ่งในการพัฒนากลยุทธ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่นำไปใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ทรัพยากรทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ในปัจจุบันจะต้องใช้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) เป็นหลักฐานข้อหนึ่งในการจดทะเบียนเพื่อแสดงความเป็นกรรมสิทธิ์ในพันธุ์พืชใหม่ตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืชที่กำลังดำเนินการออกเป็นกฎหมาย เครื่องหมายด้านโมเลกุล (Molecular marker) จึงเข้ามามีบทบาทในการตรวจสอบ และจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ตามลักษณะพันธุกรรมในพืชหลายชนิดดังนั้นการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการจำแนกพันธุ์ทุเรียน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครในฐานะหน่วยงานหนึ่งของมหาวิทยาลัยของรัฐที่มีภาระหน้าที่สำคัญในการศึกษาวิจัยเพื่อการพัฒนาท้องถิ่นได้ตระหนักและเห็นความสำคัญของทรัพยากรธรรมชาติที่

มีอยู่ในท้องถิ่นและกำลังจะสูญหายไป จึงเล็งเห็นว่าการศึกษาวิจัยเรื่อง “การจำแนกทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรีโดยเทคนิค อาร์เอพีดี” จะเป็นเครื่องช่วยสะท้อนภาพของทรัพยากรท้องถิ่นของจังหวัดนนทบุรีให้เป็นที่ประจักษ์ และมีส่วนช่วยผลักดันให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้เข้ามาช่วยเหลือสนับสนุน และช่วยกันพัฒนาให้ทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นเหล่านี้ดำรงอยู่อย่างมีเอกลักษณ์เฉพาะถิ่นในท่ามกลางกระแสการเปลี่ยนแปลงทางสังคมและวัฒนธรรมได้อย่างมั่นคงและยั่งยืนต่อไป

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 ทุเรียนพืชเศรษฐกิจ

ทุเรียน **ราชาแห่งผลไม้** (King of fruit) ได้ชื่อว่าเป็นผลไม้รสชาติอร่อยที่ยากจะหาผลไม้อื่นมาเทียบ มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นที่รู้จักและบริโภคในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มาตั้งแต่ยุคก่อนประวัติศาสตร์ ปัจจุบันทุเรียนนับว่าเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่ภาครัฐให้การยอมรับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ กลายเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั้งในและต่างประเทศ จนได้รับการส่งเสริมจากภาครัฐระบุให้เป็นหนึ่งในผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ นอกจากจะช่วยเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรยังทำรายได้เข้าประเทศจากการส่งออกเป็นจำนวนมหาศาล สร้างกระแสให้ได้รับความสนใจจากเกษตรกรในการปลูกทุเรียนเพิ่มมากขึ้น แต่ในการปลูกทุเรียนไม่สามารถปลูกได้ในทุกพื้นที่ของประเทศ ซึ่งต้องอาศัยสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่เหมาะสม ทำให้ภาครัฐต้องทำการคัดสรรพันธุ์ที่เหมาะสมกับการให้ผลผลิตที่มีคุณภาพและเพื่อการค้าต่อไป (Somsri, 2007)

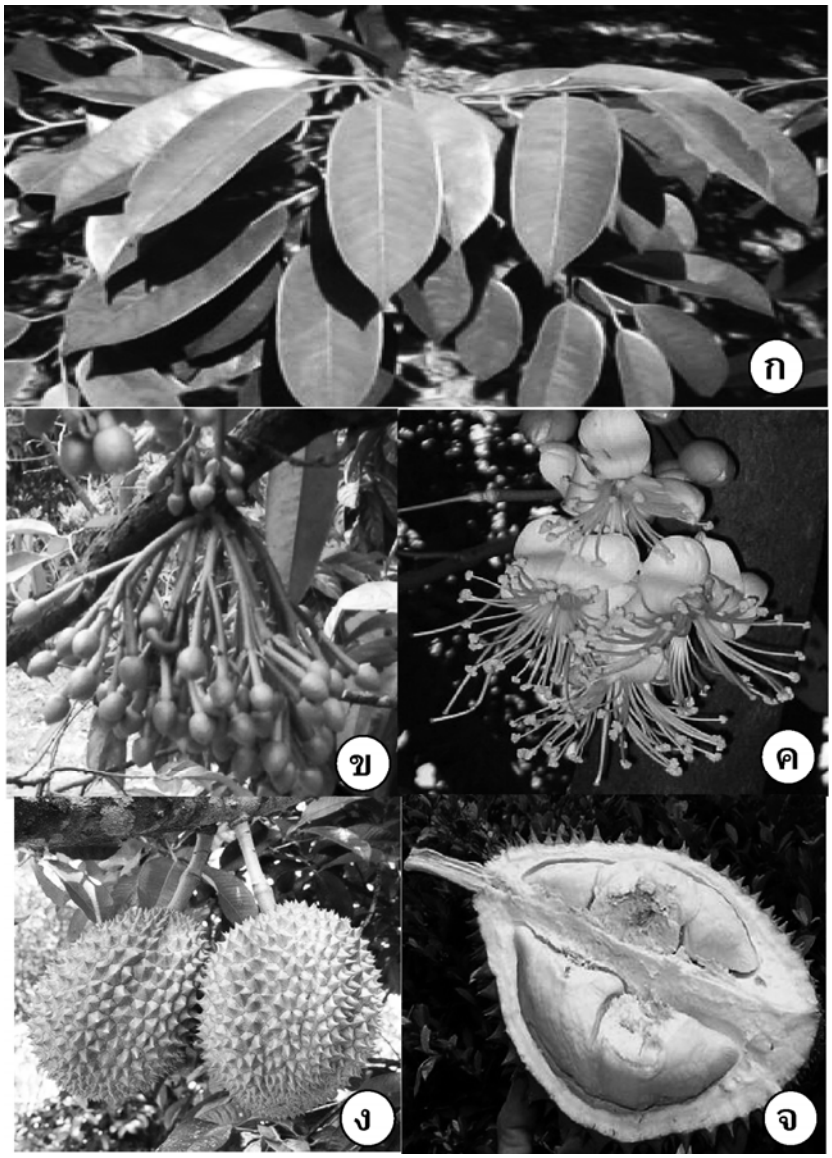
ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพในด้านการผลิตทุเรียน จากการสำรวจโดย กรมพัฒนาที่ดิน ในปีการผลิต พ.ศ. 2546 พบเนื้อที่ปลูกทุเรียน ทั้งประเทศมีพื้นที่ 736,355 ไร่ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2547) โดยมีตลาดภายในประเทศเป็นตลาดหลัก ในการรองรับผลผลิตส่วนใหญ่จากการศึกษาของ กรมพัฒนาที่ดิน พบว่า มีความต้องการบริโภคทุเรียนภายในประเทศ เกือบร้อยละ 90 ของผลผลิตทุเรียนทั้งประเทศ ในขณะที่การส่งออกทุเรียนสามารถทำรายได้เข้าประเทศได้อย่างน้อยปีละ 1,000 ล้านบาทต่อปี มูลค่าการส่งออกทุเรียนในระยะเวลา 5 ปี ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2544 ถึง 2548 โดยในปี พ.ศ. 2544 ประเทศไทยมีรายรับจากการส่งออก จำนวน 2,057.90 ล้านบาท ปี พ.ศ. 2545 มีมูลค่าการส่งออก จำนวน 1,737.60 ล้านบาท ปี พ.ศ. 2546 จำนวน 1,323.50 ล้านบาท ปี พ.ศ.2547 จำนวน 1,629.80 ล้านบาท และ ในปี พ.ศ. 2548 มีมูลค่าการส่งออกไปยังต่างประเทศถึง 2,190.90 ล้านบาท จากสถิติดังกล่าว มีการส่งออก ทุเรียนไปยังต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศไม่น้อยกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี จาก

ข้อเท็จจริงดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผู้บริโภคชาวต่างชาติ หันมาให้การยอมรับในรสชาติของทุเรียนมากขึ้น แม้ว่าจะมีการส่งออกในอัตราไม่คงที่แต่ยังคงมีระดับการส่งออกในอัตราสูง ประกอบกับทุเรียนเป็นสินค้าการเกษตรที่มีราคาสูง จึงเป็นสิ่งจูงใจให้ผู้ผลิตและผู้ส่งออก มุ่งพัฒนาและส่งเสริมการเพาะปลูกทุเรียนให้ได้คุณภาพและผลผลิตสูงขึ้น ปัจจุบันพบว่าประเทศไทยส่งออกทุเรียนเป็นอันดับหนึ่งของโลกโดยมีประเทศมาเลเซียและประเทศอินโดนีเซียเป็นอันดับรองลงมา พบว่าจากผลผลิต 1,006,466 ตันที่ผลิตได้ในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2550 มีการส่งออกถึง 132,781 ตัน ซึ่งนำรายได้เข้าประเทศกว่า 2,000 ล้านบาท (Somsri, 2008)

1.2.2 ลักษณะโดยทั่วไปของทุเรียน

ทุเรียนมีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-120 เซนติเมตร เปลือกสีเทาแก่ แข็งเป็นสะเก็ดขรุขระ มีรอยแตกเป็นทางยาว ใบเป็นใบเดี่ยว กว้าง 5-8 เซนติเมตร ยาว 15-20 เซนติเมตร ปลายใบแหลมแบบ ขอบใบเรียบ เนื้อใบหนา ด้านบนใบสีเขียวเป็นมัน ด้านล่างใบเป็นเกล็ดสีน้ำตาลอ่อนหรือสีทองไม่เป็นมัน ก้านใบสีน้ำตาลอ่อนแบ่งเป็นสองตอน ประมาณครึ่งหนึ่งของก้านใบที่ติดกับแผ่นใบมีขนาดใหญ่และเรียวเล็กจนถึงโคนก้านใบที่ติดอยู่กับกิ่ง ใบทุเรียนเมื่อยังอ่อนจะพับครึ่งตามความยาวของเส้นกลางใบ แผ่นใบยังแนบชิดกันอยู่ เมื่อใบเริ่มแก่จะแผ่คลี่ออก เส้นใบเป็นแบบร่างแห (แสวง, 2527) ทุเรียนออกดอกบนกิ่งแก่ ตาดอกรูปไข่ ออกดอกเป็นช่อมีแกนยาวแบบช่อเชิงหลั่น (corymb) ช่อหนึ่งมี 1-15 ดอก (ทรงพล, 2530) เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ริ้วประดับ (bract) แยกออกเป็นอิสระรูปไข่ 2-3 กลีบ โค้งเข้าด้านใน ร่วงหล่นได้ง่าย กลีบดอก 5 กลีบ รูปช้อนยาวประมาณ 2 เท่าของกลีบเลี้ยง ส่วนโคนเรียวเล็ก มีลักษณะคล้ายเล็บ โดยเมื่อดอกใกล้บาน ส่วนต่างๆ ของดอกขยายตัวอย่างรวดเร็วและดันริ้วประดับที่หุ้มดอกให้แตกออกเป็น 2-3 แฉก กลีบเลี้ยงชาวสวนเรียกหม้อตาล มีรูปคล้ายระฆัง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร เป็นที่สำหรับเก็บน้ำหวานเป็นหลอดติดกันมีรอยแบ่งเป็นส่วนๆ ตามจำนวนกลีบดอก ตอนปลายแยกเป็น 5 แฉก มีสีน้ำตาลปนเหลือง กลีบดอก มี 4-5 กลีบ สีขาวนวลหรือสีครีม เรียงซ้อนเหลื่อมกันเล็กน้อย (แสวง, 2527) เกสรเพศผู้ เป็นโครงสร้างที่อยู่ถัดจากกลีบดอกเข้าไป ก้านเกสรมีจำนวนมากเชื่อมติดกัน 5-6 มัด แต่ละมัดมีเกสรเพศผู้ 5-6 อัน ยาวประมาณ 4.5-6 เซนติเมตร อับเรณูอยู่ปลายเกสรเพศผู้ ดอกทุเรียนแต่ละดอกมียอดเกสรตัวเมียอยู่เพียง 1 อัน ส่วนของรังไข่อยู่เหนือส่วนอื่นของดอก เป็นพวก compound pistil รังไข่ประกอบด้วย 5 พู (carpel) (รัชฎา, 2533) ผลเป็นผลเดี่ยวชนิดแคปซูล (capsule) มีหนามที่เปลือก

ผลมี 5 พูส่วนใหญ่ในแต่ละพูมีเมล็ด บางพูไม่มีเมล็ด เนื้อติดเมล็ดมีสีตั้งแต่สีขาว สีเหลืองอ่อน สีเหลืองจนถึงสีเหลืองจำปา เนื้อทุเรียนเกิดจากการเจริญเติบโตของก้านโอวูล เรียกเนื้อนี้ว่า aril เมล็ดทุเรียนมีขนาดใหญ่และมีสีต่างๆกันตามพันธุ์ เมล็ดแก่จัดมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรืออมแดง (แสวง, 2527)



ภาพที่ 1 ลักษณะของทุเรียน (ก) ใบ (ข) ดอกอ่อน (ค) ดอกบาน (ง) ผล (จ) เนื้อผล

1.2.3 **สายพันธุ์ทุเรียน**

ทุเรียนจัดเป็นพืชในวงศ์ Bombacaceae ซึ่งมีมากกว่า 51 สกุลและมีจำนวนชนิดมากกว่า 200 ชนิด (Subhadrabandhu and Ketsa, 2001) ส่วนทุเรียนอยู่ในสกุล *Durio* ซึ่งมีมากกว่า 28 ชนิดมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้บริเวณประเทศมาเลเซีย และอินโดนีเซีย ปัจจุบันพบปลูกกระจายตัวอยู่ที่ประเทศแถบเส้นศูนย์สูตรขึ้นไปทางเหนือและใต้ประมาณ 13-14 องศา ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอากาศร้อนชื้นได้แก่ประเทศในแถบเอเชียคือ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ พม่า อินเดีย ศรีลังกา ไทยนอกจากนี้ก็มีปลูกในประเทศแถบแอฟริกา อเมริกากลาง หมู่เกาะอินดีสตะวันตก และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก โดยแพร่กระจายอยู่ในบริเวณเกาะบอร์เนียว (Borneo) 19 ชนิด, ในรัฐซาบา (Sabah) 14 ชนิด, ในซาราวัค (Salawak)16 ชนิด และมาเลเซีย 16 ชนิด (Subhadrabandhu and Ketsa, 2001) ในประเทศไทยพบเพียง 8 ชนิด คือ ทุเรียนไม่มีหนาม (*Durio* sp.), ทุเรียนรากขา (*D. kutejensis* (Hassk.)Becc.), ทุเรียนขั้วติด(*D. graveolens* Becc.), ทุเรียนนก (*D. griffithii* (Mast.) Bakh.), ทุเรียนนก (*D. lowianus* Scort.ex King), ทุเรียนดอน (*D. malaccensis* Planch), ทุเรียนซาเรียน (*D. mansoni* (Ganble) Bakh.) ส่วนทุเรียนที่เรารับประทานกันอยู่ทุกวันนี้คือ *Durio zibethinus* Murr. โดยมีปลูกทั่วประเทศไทย ซึ่งพบว่ามีมากกว่า 227 ชื่อพันธุ์ (หิรัญ และคณะ, 2542) โดยอาจแบ่งได้ 6 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มกบ มี 38 พันธุ์ ได้แก่ กบแม่เฒ่า กบเล็บเหยี่ยว กบตาขำ กบพิกุล กบวัดกล้วย กบชายน้ำ กบสาวน้อย กบสุวรรณ กบเจ้าคุณ กบตาท้วม กบตาปุ่น กบหน้าศาล กบจำปา กบเบา กบรัศมี กบตาโห้ กบตาแจ่ม กบทองคำ กบสีนาค กบทองก้อน กบไว กบงู กบตาเฒ่า กบชมพู่ กบพลเทพ กบพวง กบวัดเพลง กบก้านเหลือง กบตานวล กบตามาก กบทองเพ้ง กบราชเนตร กบแก้ว กบตานุช กบตามิตร กลีบสมุทร กบตาแม้น การะเกด

2. กลุ่มลวง มี 7 พันธุ์ ได้แก่ ลวงทอง ลวงมะรุม ชะนี ชะนีกิ่งม้วน ชมพูศรี ย่ำมะหวาด สายหยุด

3. กลุ่มก้านยาว มี 7 พันธุ์ ได้แก่ ก้านยาว ก้านยาววัดสัก ก้านยาวสีนาค ก้านยาวพวง ก้านยาวใบด่าง ทองสุก ชมภูบาน

4. กลุ่มกำปั่น มี 11 พันธุ์ ได้แก่ กำปั่นเดิม กำปั่นเหลือง กำปั่นแดง กำปั่นตาแพ กำปั่น พวง ชายมะไฟ ปิ่นทอง เม็ดในกำปั่น เหรา หมอนเดิม หมอนทอง

5. กลุ่มทองย้อย มี 10 พันธุ์ ได้แก่ ท้องย้อยเดิม ทองย้อยฉัตร ฉัตรสีทอง พวงฉัตร นมสวรรค์ ทับทิม ธรณีไหว นกหยิบ แดงรัศมี อีอึ่ง

6. กลุ่มเบ็ดเตล็ด ได้แก่ พันธุ์ทุเรียนที่ไม่ได้จัดอยู่ใน 5 กลุ่มข้างต้น เช่น กะเทยเนื้อขาว กระเทยเนื้อแดง กระเทยเนื้อเหลือง กระดุมทอง กระดุมสีนาค กระโปรงทอง กระปุกทอง ก้อนทอง เขียวตำลึง ขุนทอง จอกลอย ชายมังคุด แดงช่างเขียน แดงตาน้อย แดงตาเผื่อน แดงสาวน้อย ดาวกระจาย ตะพาบน้ำ ตะโก ตุ้มทอง ทศพิณ ทองคำตาพรวด ทองม้วน ทองคำ นกกระจิบ บาตรทองคำ บางขุนนนท์ เป็ดถบ ฝอยทอง พวงมาลัย พวงมณี เม็ดในยายปราง ยินดี ลำเจียก เม็ดในบางขุนนนท์ สีทอง สีไพร สาวชมเห็ด สาวชมฟักทอง หางสิงห์ เหรียญทอง ไอ้เข้ อินทรชิต อีล่า อีลีบ อียักษ์ อีหนัก เป็นต้น

1.2.4 **จังหวัดนนทบุรี**

นนทบุรีเป็นจังหวัดที่ตั้งอยู่ภาคกลางของประเทศไทย เป็นหนึ่งในจังหวัดปริมณฑล ได้แก่ นครปฐม สมุทรปราการ สมุทรสาคร ปทุมธานี และนนทบุรี โดยห่างจากกรุงเทพมหานคร 20 กิโลเมตร มีเนื้อที่ประมาณ 622,303 ตารางกิโลเมตร หรือประมาณ 388,939.37 ไร่ ปัจจุบันแยกออกได้เป็น 6 อำเภอ (ภาพที่ 2) ได้แก่ อำเภอเมือง มีพื้นที่ 77.018 ตารางกิโลเมตร อำเภอปากเกร็ด มีพื้นที่ 89.023 ตารางกิโลเมตร อำเภอบางกรวย มีพื้นที่ 96.398 ตารางกิโลเมตร อำเภอบางบัวทอง มีพื้นที่ 116.439 ตารางกิโลเมตร อำเภอไทรน้อย มีพื้นที่ 186.017 ตารางกิโลเมตร ตั้งอยู่บนเส้นรุ้งที่ (latitude) 13.80 เส้นแวง (longitude) 100.18 สภาพพื้นที่ตามลักษณะภูมิประเทศของจังหวัดนนทบุรี มีแม่น้ำเจ้าพระยาแบ่งพื้นที่ของจังหวัดออกเป็น 2 ส่วน ฝั่งตะวันออกและตะวันตก พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ราบลุ่ม มีคูคลองทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและเกิดจากการขุดขึ้นมาใหม่เป็นจำนวนมากเชื่อมติดกัน ลักษณะภูมิอากาศเป็นแบบร้อนชื้น อยู่ภายใต้อิทธิพลของลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ประกอบด้วยฤดูฝน ฤดูหนาวและฤดูร้อน แต่เนื่องจากลักษณะพื้นที่เป็นที่ราบลุ่มมีความแตกต่างของระดับพื้นดินเพียงเล็กน้อย สภาพภูมิอากาศจึงมีลักษณะค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดพื้นที่ (สำนักงานส่งเสริมเกษตรจังหวัดนนทบุรี, 2549)

ภาพที่ 2 แผนที่ของจังหวัดนนทบุรี

1.2.5 การปลูกทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี

มีผู้สันนิษฐานว่า ได้มีการนำเอาทุเรียนเข้ามาแพร่กระจายพันธุ์ในประเทศไทย ราวสมัยของพระพุทธยอดฟ้าจุฬาโลก คือ ในราวปี พ.ศ. 2330 โดยพบหลักฐานจากเอกสารฐานเกษตรกรรม ระบุว่าทุเรียนแพร่กระจายเข้ามาในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2330 จากภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศพม่าและแพร่เข้ามาทางใต้ของประเทศไทย (ฐานเกษตรกรรม, 2530) ต่อมาได้มีการนำเอาพันธุ์ทุเรียนต่าง ๆ เข้ามาปลูกเป็นสวนทุเรียนอย่างแพร่หลายในแถบธนบุรีตามแนวแม่น้ำเจ้าพระยาและขยายพื้นที่มาจนถึงจังหวัดนนทบุรี ทำให้ตลาดนนทบุรีในอดีตกลายเป็นแหล่งขายทุเรียนที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศ สังเกตได้จากคำขวัญประจำจังหวัดนนทบุรี ความว่า “**พระตำหนักสง่างาม ลือนามสวนสมเด็จ เกาะเกร็ดแหล่งดินเผา วัดเก่านามระบือ เลื่องลือทุเรียนนนท์ งามน่ายลศูนย์ราชการ**” ซึ่งแสดงถึงการเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายถึงทุเรียนของจังหวัดนนทบุรีในอดีตได้เป็นอย่างดี

จากการศึกษาพบว่าพื้นที่ที่มีการปลูกทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ซึ่งอยู่ใกล้หรือติดกับแม่น้ำเจ้าพระยาหรือคลองแยกจากแม่น้ำเจ้าพระยา เพราะสวนทุเรียนต้องการระบายน้ำเข้าและออกจากสวนเป็นครั้งคราว ฉะนั้นท้องที่ที่มีการปลูกทุเรียนมากคือ อำเภอเมือง อำเภอบางกรวย อำเภอบางใหญ่อำเภอบางบัวทอง และอำเภอปากเกร็ด ซึ่งจากผลผลิตของทุเรียนสามารถทำรายได้ให้กับจังหวัดประมาณ ปีละกว่า ร้อยล้านบาท นอกจากนี้มีการระบุว่าการทำสวนทุเรียนในพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง ราวปี พ.ศ. 2527 สวนทุเรียนพันธุ์ดีปลูกอยู่แถบที่ราบลุ่มริมฝั่งแม่น้ำเจ้าพระยา ในเขตจังหวัดธนบุรีและจังหวัดนนทบุรี ซึ่งจากการขยายการปลูกจากธนบุรีไปทางจังหวัดนนทบุรีตามริมฝั่งแม่น้ำเจ้าพระยา เป็นการทำสวนแบบยกร่อง ด้วยพื้นที่ตามแนวฝั่งเดิมเป็นทุ่งนา จึงได้มีการยกร่องให้พ้นน้ำเพื่อป้องกันน้ำท่วม เป็นการยกร่องนำดินขึ้นมาถมเป็นคันเพื่อให้สูงขึ้น และถมเป็นคันล้อมรอบสวนให้สูงกว่าพื้นที่โดยรอบ (แสวง, 2527)

1.2.6 ปัญหาการปลูกทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี

ในอดีตมีการทำสวนทุเรียนมากตลอดแนวลำน้ำเจ้าพระยา โดยเริ่มจากเขตธนบุรีและขยายเรื่อยไปจนถึงจังหวัดนนทบุรี จนทำให้จังหวัดนนทบุรีกลายเป็นแหล่งผลิตและจำหน่ายที่มีชื่อเสียงต่อมาจนถึงปัจจุบัน แต่ด้วยเหตุการณ์น้ำท่วมใหญ่จากพายุไต้ฝุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2460 ปี พ.ศ. 2485 และภาวะฝนแล้ง ส่งผลน้ำเค็มเข้าสวน ในปี พ.ศ. 2538 ทำให้พืชผลทางการเกษตรเสียหาย รวมถึงทุเรียนพันธุ์ต่างๆ ในจังหวัดนนทบุรี จากรายงานของ สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดนนทบุรี ระบุรายละเอียดไว้ดังนี้ คือ ในปี พ.ศ. 2538 หลังเกิดน้ำท่วมใหญ่ ส่งผลให้พืชสวนในท้องที่จังหวัดนนทบุรีเสียหายเป็นจำนวนมาก ทำให้ชาวสวนส่วนใหญ่จะขอรับการสนับสนุนกล้าผลไม้ชนิดอื่น ๆทดแทน ได้แก่ มะม่วง ลิ้นจี่ มังคุด ขนุน หมาก มะพร้าว เป็นต้น โดยขอสนับสนุนพันธุ์ทุเรียนจากทางราชการเป็นพันธุ์ทุเรียนหมอนทอง และก้านยาว จำนวน 32,070 ต้น เท่านั้น (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดนนทบุรี, 2542) จากเหตุการณ์น้ำท่วมใหญ่ที่เกิดขึ้นหลายครั้งรวมทั้งในอดีตและปัจจุบัน ส่งผลให้พืชสวนรวมไปถึงทุเรียนในพื้นที่จังหวัดนนทบุรี เสียหายเป็นจำนวนมาก ทำให้พันธุ์ทุเรียนบางพันธุ์ที่มีอยู่เดิมสาบสูญไปจากพื้นที่ และยังทำให้ชาวสวนในพื้นที่จังหวัดนนทบุรีบางส่วนเลิกปลูกทุเรียน หันมาปลูกพืชที่ต้นทุนต่ำ และให้ผลผลิตรวดเร็วกันมากขึ้น ปัจจุบันสภาวะการผลิตทุเรียนของจังหวัดนนทบุรีมีปริมาณไม่มากนัก จากการสำรวจโดยกรมพัฒนาที่ดิน พบว่าปีการผลิต 2545/46 พื้นที่ปลูกทุเรียนในจังหวัดนนทบุรีมีเพียง 432 ไร่ และให้ผลผลิตรวม 68.20 ตัน (สำนักงานส่งเสริมเกษตรจังหวัดนนทบุรี, 2549) ผลกระทบ

จากปัจจัยดังกล่าว คือ น้ำท่วม ฝนแล้ง และการขยายตัวของเมือง เป็นปัจจัยส่วนหนึ่งที่ทำให้การปลูกทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี มีพื้นที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการปลูกทุเรียนในพื้นที่จังหวัดนนทบุรีลดน้อยลง แต่ความนิยมในทุเรียนของจังหวัดยังมีให้พบเห็น โดยสำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดนนทบุรี ระบุว่า ทุเรียนนนทบุรีได้รับการยอมรับว่ามีชื่อเสียง ในด้านเนื้อทุเรียนที่มีเนื้อละเอียดนุ่ม รสชาติ และความหลากหลายพันธุ์ กล่าวกันว่า ดินในแถบนนทบุรี เป็นดินเหนียวที่มีธาตุอาหารของพืชอย่างบริบูรณ์ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากดินในแถบอื่น ๆ ที่มีการปลูกทุเรียน จึงทำให้เนื้อทุเรียนที่มาจากจังหวัดนนทบุรีละเอียดเนื้อหนาและรสดีมาก (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดนนทบุรี, 2542) นอกจากนี้ภาคเอกชน จึงได้มีการจัดตั้ง ชมรมขึ้นเพื่ออนุรักษ์ทุเรียนของจังหวัดนนทบุรีไว้ เช่น ชมรมอนุรักษ์ทุเรียนของอำเภอบางกรวย และชมรมอนุรักษ์ทุเรียนของจังหวัดนนทบุรี เป็นต้น และจากสภาพจังหวัดนนทบุรีมีพื้นที่ 622.303 ตารางกิโลเมตร หรือ 388,939 ไร่ และมีพื้นที่ชลประทานถึงสิ้นปี พ.ศ. 2544 มีจำนวนทั้งสิ้น 229,790 ไร่ (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดนนทบุรี, 2542) ซึ่งในปัจจุบันพบว่า มีการปลูกทุเรียน เพียงร้อยละ 0.11 ของพื้นที่ทั้งจังหวัด ในขณะที่ภาครัฐ ได้มีการประชุมคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 25 มิถุนายน พ.ศ. 2545 ให้มีนโยบายจัดตั้งกลุ่มบริหารสินค้าเกษตร เพื่อรับผิดชอบในการแก้ไขปัญหาไม้ผลอย่างครบวงจร ซึ่งทุเรียนเป็นหนึ่งในไม้ผลที่อยู่ในแผนการบริหารของภาครัฐที่จัดตั้งขึ้น นอกจากนี้เอกสารแผนการใช้ที่ดิน จังหวัดนนทบุรีโดยกรมพัฒนาที่ดิน ระบุว่า มีการวางแผนการใช้ที่ดิน เพื่อการอนุรักษ์การปลูกทุเรียน และการปลูกไม้ผล ไปจนถึงการส่งเสริมระบบการเกษตรแบบเข้มข้น อีกทั้งต้องการคุ้มครองพื้นที่เกษตรที่สมบูรณ์ ซึ่งได้แก่พื้นที่ที่มีศักยภาพเหมาะสมด้านการเกษตร นอกจากสำนักงานจังหวัดนนทบุรี ได้จัดทำแผนยุทธศาสตร์การพัฒนาจังหวัดนนทบุรี ปี พ.ศ. 2547– 2550 ระบุว่า ตามแผนการบริหารจังหวัดแบบบูรณาการ โดยมีผู้ว่าราชการจังหวัดเป็นผู้บริหารสูงสุด มุ่งพัฒนาด้านที่อยู่อาศัย และแหล่งผลิตและพัฒนาสายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ เพื่อการส่งออก (สำนักงานส่งเสริมเกษตรจังหวัดนนทบุรี, 2549)จากนโยบายส่งเสริมด้านการเกษตรกรรมในพื้นที่จังหวัดนนทบุรี แต่มีลักษณะการส่งเสริมที่แตกต่างกันในแต่ละนโยบายของรัฐ แสดงถึงนโยบายเบื้องต้นของหน่วยงานภาครัฐที่ไม่มีความสอดคล้องกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการปลูกทุเรียนของจังหวัดนนทบุรีได้ แต่จากความนิยมบริโภคทุเรียนในปัจจุบัน นอกจากนี้รัฐได้มีการจัดการประกวดทุเรียน และจัดทำมาตรฐานทุเรียนเพื่อการส่งออก ทำให้ได้ทุเรียนพันธุ์ที่มีลักษณะตามต้องการ ทั้งในด้านรูปทรง กลิ่น และรสชาติ เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ตลาดการบริโภคทั้งในและต่างประเทศเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ชาวสวนมีการปลูกทุเรียนเพื่อสนองความต้องการของตลาดเพิ่มขึ้น โดย

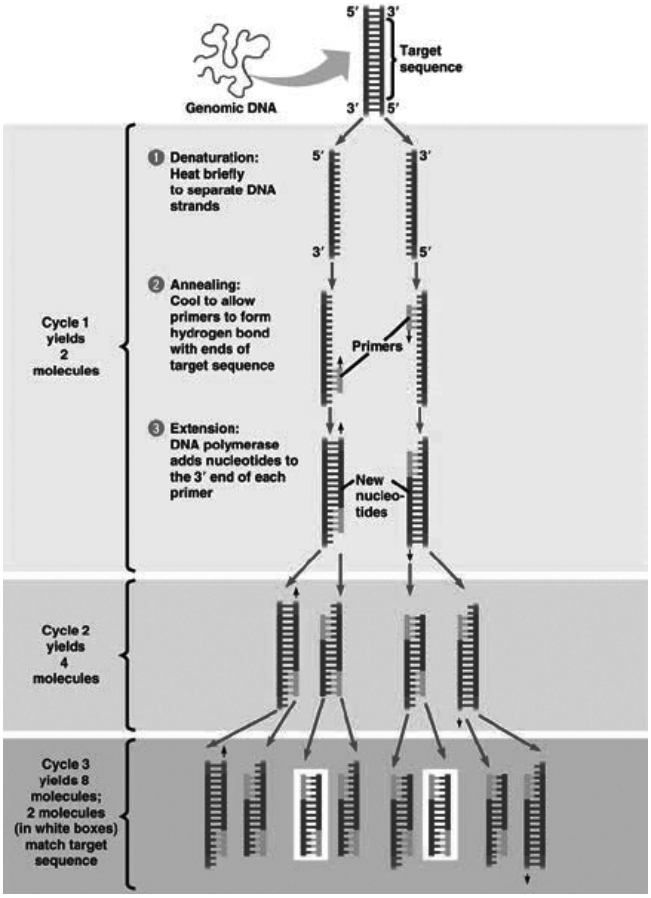
มุ่งปลูกทุเรียนพันธุ์ที่เป็นพันธุ์เพื่อการค้าเป็นหลัก จากเหตุผลข้างต้นอาจเป็นไปได้ว่าทุเรียนสายพันธุ์ท้องถิ่นที่พบในจังหวัดนนทบุรีอาจสูญหายไปในที่สุด (สุรสังกาศ, 2549)

1.2.7 **เครื่องหมายทางโมเลกุล**

การจำแนกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการจำแนกซึ่งตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตนั้นจะทำโดยการศึกษาอนุกรมวิธาน การเปรียบเทียบทางกายวิภาค(anatomy) สัณฐานวิทยา (morphology) การศึกษาเอมบริโอ (embryo) และสรีรวิทยา (physiology) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้มานานและยังคงใช้ได้ดีในปัจจุบัน แต่บางครั้งก็เกิดการผิดพลาดได้ในกรณีที่เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ต้องให้ผู้ที่มีความชำนาญเท่านั้นจึงจะสามารถแยกความแตกต่างได้และยังคงมีอุปสรรคในการตรวจสอบและจำแนก ต่อมามีการนำวิธีการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่มีการแสดงความแตกต่างในระดับโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายโมเลกุลมีความสามารถในการตรวจสอบพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชโดยสามารถตรวจสอบได้ทั้งต้นกล้าและต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่ (สุรินทร์, 2540) รวมไปถึงการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์พืชทำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Weising *et al*., 1995)

เครื่องหมายทางโมเลกุลเป็นอีกเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมทั้งสามารถช่วยในยืนยันการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้อย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) เป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว โดยอาศัยกระบวนการ พีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction) คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนเพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 3) โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบ (DNA template) ซึ่งองค์ประกอบในปฏิกิริยา พีซีอาร์ ได้แก่ดีเอ็นเอต้นแบบ นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดบัฟเฟอร์เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase และใช้ดีเอ็นเอ โพรีเมอเรสซ้ำกันหลายๆรอบเพื่อให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอหรือยีนหนึ่งๆโดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนเพื่อเป็นข้อมูลในการสังเคราะห์ไพรเมอร์แล้วจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อตรวจสอบว่ามียีนนั้นอยู่โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3’ ในทิศทางเข้าหากัน บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลายของไพรเมอร์ชนิดหนึ่งถึงปลายของไพรเมอร์ของอีกชนิดหนึ่ง (สุรินทร์, 2540) ซึ่งในการ

เพิ่มชิ้นส่วนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะตั้งอุณหภูมิเป็นโปรแกรมเอาไว้ 3 ค่าเพื่อวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันคืออุณหภูมิ 90-95^{0}C สำหรับทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่เสียสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว (denaturing) อุณหภูมิ 35-60^{0}C สำหรับให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเข้ามาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (annealing) และอุณหภูมิ 72^{0}C ซึ่งเหมาะกับการทำงานของ enzyme *Taq* DNA polymerase เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ (extension) โดยวิธี พีซีอาร์ มีหลายเทคนิค เช่น อาร์เอพีดี เป็นต้น



ภาพที่ 3 หลักการทำงานของพีซีอาร์ (พีซีอาร์: Polymerase Chain Reaction)

1.2.8 **เทคนิคอาร์เอพีดี**

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: Random amplified polymorphism DNA) คิดค้นโดย William *et al*. (1990) เป็นวิธีสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยไม่ต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์แบบสุ่มชนิดเดียวในการทำ พีซีอาร์ แต่ละครั้งไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอแบบสุ่ม และเพิ่มปริมาณหลังจากนั้นแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโพรีซิสในเจลอะกาโรส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เกิดจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 ตำแหน่งที่อยู่ไม่ไกลกันมากและเกาะกับดีเอ็นเอในสายในแต่ละทิศทางเข้าหากันซึ่งถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันทิศทางเดียวกันหรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกันหรือเกาะห่างกันมากทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ นอกจากนี้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏไม่ขึ้นกับขนาดจีโนมที่ศึกษาโพลีมอร์ฟิสซึมของอาร์เอพีดี เกิดจากไพรเมอร์เกาะในตำแหน่งที่ต่างกันทำให้จำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไปหรือเกิดจากดีเอ็นเอส่วนที่ไพรเมอร์เกาะได้หายไปหรือมีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะจึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอหรือเกิดการเสียหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ 2 ตำแหน่งทำให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มได้มีขนาดเปลี่ยนแปลงไปโดยแสดงผลในลักษณะการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆมากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ส่วนใหญ่มาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส เทคนิคอาร์เอพีดีมีข้อดีคือทำได้ง่ายและรวดเร็วไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสไพรเมอร์ แต่มีข้อเสียคือเมื่อทำการทดลองซ้ำบางครั้งได้ผลที่ต่างไปจากเดิมเนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดี นี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะการทดลองในการทำพีซีอาร์ ซึ่งต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการทำแผนที่ยีนพันธุศาสตร์ประชากรศึกษาพันธุประวัติวิวัฒนาการและการจำแนกสายพันธุ์ (สุรินทร์, 2540)

1.2.9 **การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในทุเรียน**

จากการศึกษาของ Santoso *et al.* (2005) พบว่าการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถนำไปใช้ในจำแนก และใช้หาความสัมพันธ์ของพืชในกลุ่มทุเรียน (*Durio*) 27 ชนิดของประเทศมาเลเซียได้ นอกจากนี้ Tacca *et al.* (2005) พบว่า การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ อาร์เอพีดี (random amplified polymorphism DNA) สามารถนำไปใช้ในการช่วยจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus*) 14 สายพันธุ์ในประเทศฟิลิปปินส์ได้ ในประเทศไทยพบว่าการตรวจสอบในระดับโมเลกุลของทุเรียนยังมีน้อยมาก

โดย Somsri *et al.* (2005) พบว่าการใช้เทคนิค DAF (DNA Amplification Fingerprinting) สามารถช่วยบอกความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogeny) ของพืชสกุลทุเรียนได้ พร้อมทั้งยังช่วยตรวจสอบยืนยันชนิดของทุเรียนจำนวน 56 สายพันธุ์ที่ปลูกในเชิงการค้าได้ และจากการศึกษาของ Nuchuchua *et al.* (2008) โดยเทคนิคอาร์เอพีดีพบว่าสามารถช่วยในการจำแนกทุเรียนพันธุ์พื้นบ้านกับพันธุ์การค้า อย่างไรก็ดีตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเพียงแค่ 3 สายพันธุ์จาก 227 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และยังขาดตัวอย่างของทุเรียนอีกหลายพื้นที่ เช่น จังหวัดนนทบุรี เป็นต้น

1.3 วัตถุประสงค์

1 เพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของทุเรียนบางชนิดที่ปลูกในจังหวัดนนทบุรี โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Dendrogram) และสร้างแผนผังการกระจายตัวและการรวมกลุ่ม (Principal component analysis) ของทุเรียนจากจังหวัดนนทบุรี

1.3.1 ระยะเวลาในการทำวิจัย

เริ่มทำวิจัยตั้งแต่ 1 มกราคม 2553 ถึง 31 ธันวาคม 2553

1.3.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมของทุเรียนบางสายพันธุ์ที่มีปลูกในจังหวัดนนทบุรี เพื่อประโยชน์ และแนวทาง ในการวางแผนการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืนต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุพืช

2.1.1 วัสดุพืชที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์ทุเรียนจำนวน 14 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาจากจังหวัดนนทบุรี ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

รหัส	ชื่อสายพันธุ์	แหล่งที่เก็บ
D1	กบชายน้ำ	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D2	กบสาวน้อย	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D3	กบวัดกล้วย	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D4	กบแม่เฒ่า	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D5	กบตาเต่า	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D6	กบขำ	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D7	ก้านยาว	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D8	ย่ำมะหวาด	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D9	ลวง	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D10	ทองย้อยฉัตร	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D11	ก่ำปั่น	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D12	ฉัตรสีทอง	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D13	หมอนทอง	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี
D14	ชะนี	สวนตาก้าน, บางกร่าง จ. นนทบุรี

2.1.2 วัสดุสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีในเกรดวิเคราะห์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
1 kb DNA ladder	Promega
Agarose	Sigma
Beta-Mercaptoethanol	Promega
Boric acid	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma
Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	Sigma
Chloroform	J.T. Baker
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Fluka
Glycerol	Sigma
HCl	Merck
Isoamyl alcohol	Merck
$MgCl_2$	M&B
Reaction Buffer	Promega
RNase	Sigma
Taq DNA Polymerase	Promega
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma
Phenol	Sigma
Primer	Promega

2.2. อุปกรณ์

1 ตู้แช่ -20 C รุ่น FZ-189 GYN (SANYO)

2 Water bath รุ่น Isotemp 210 (Fisher Scientific)

3 เครื่อง พีซีอาร์ รุ่น Thermo Hybraid PX2

4 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205 (Denver Instrument Company)

5 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis (Syngen)

6 ชุดอิเล็กโทรฟอริซิสแนวตั้ง รุ่น V20-CDC (SCIE-PLAS)

7 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น E833 (SCIE-PLAS)

8 เครื่องฉายแสง UV และถ่ายภาพ (gel documentation) รุ่น TXT-20.M

9 เครื่อง autoclave รุ่น AMA 240S (ASTELL)

10 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น 1010 (Century Scientific)

11 ชุดไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ (Gilson) พร้อมทิปขนาด 10, 200 และ 1000 ul.

12 เครื่อง vortex รุ่น VX100 (LABNET)

13 หลอดใส่สารขนาด 0.5, 1.5, 15 ml และหลอด พีซีอาร์ ขนาด 0.2 ml

14 เครื่องแก้ว (Pyrex)

15 ชุดโกร่งบดตัวอย่าง

2.3 วิธีการ

2.3.1 การจัดจำแนกสายพันธุ์ทุเรียนโดยใชเทคนิคอาร์เอพีดี

การเก็บตัวอย่างพืช โดยเก็บยอดอ่อนของทุเรียนทั้ง 14 สายพันธุ์ บริเวณจังหวัดนนทบุรี โดยการเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกใส่ในถุงพลาสติก แล้วแช่ในกระติกน้ำแข็ง จากนั้นนำไปแช่ในตู้ –20 องศาเซลเซียสเมื่อถึงห้องปฏิบัติการ

2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจะสกัดจากใบของทุเรียนแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธีประยุกต์จาก Vanijajiva *et al.* (2005) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.เตรียมสารละลาย CTAB ใส่หลอดขนาด 1.5 ml ปริมาตร 500 µl เติม Beta-mercaptoethanol 10% เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 65 °C นาน 45-60 นาที

2. บดตัวอย่างใบทุเรียนในโกร่ง

3. ตักตัวอย่างที่บดได้ ใส่ลงในเติมสารละลายสารละลาย CTAB ที่เตรียมไว้ใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดละ 500 µl แล้วบ่มกับตัวอย่างที่ผ่านการบดที่ 65 °C นาน 1 ชั่วโมง

4. ตั้งหลอดไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1) หลอดละ 500 µl กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน

5. ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

6. ดูดสารละลายใสตอนบนใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่หลอดละ 500 µl เติม RNase เข้มข้น 10 mg/ml 2.5 µl ตั้งไว้ที่ 37 °C 30 นาที

7. เติมสารละลาย Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1) หลอดละ 500 µl ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

8. ดูดสารละลายใสตอนบนหลอดละ 300 µl ใส่หลอดใหม่รวมให้ได้หลอดละ 600 µl

9. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol ปริมาตร 180 µl กลับหลอดไปมาเบา ๆ

10. ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาก เกี่ยวดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายงอ แต่ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้น้อย ให้ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

11. ล้างตะกอนด้วย 70% และ 90% Ethanol ตามลำดับ ปล่อยให้ตะกอนแห้ง

12. ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 30 µl และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ –20 °C เพื่อรอใช้งานต่อไป

หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอริซิส โดยใช้ 0.8% agarose gel

2.3.3 การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซีส โดยมีวิธีการดังนี้

1. การเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ใช้ 0.5X TBE buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM Boric acid, 1 mM EDTA) ผสมกับผง เจลอะกาโรสแล้วนำไปละลายในเตาไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่นจึงเทลงพิมพ์

2. การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอ ใช้ dye (bromophenal blue 0.25%, glycerol 30%) ในปริมาตร 5 µl ผสมกับสารละลายดีเอ็นเอ 5 µl แล้วหยอดลงในช่องแผ่นพิมพ์เจลโดยมีดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นคือ 50 และ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความเข้มข้น

2.3.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

นำจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อาร์เอพีดี แต่เนื่องจาก อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะของปฏิกิริยามากจึงต้องกำหนดองค์ประกอบของสารและอุณหภูมิในปฏิกิริยาให้เหมือนกันตลอดการทดลองดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	**ปริมาตร** (µl)
1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 ng/µl)	2
2. 10X Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl)	2.5
3. $MgCl_2$ (5 mM)	4
4. Primer	2
5. dNTP (1 mM/µl)	4
6. *Taq* DNA polymerase (5 unit/µl)	0.5
7. น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ	10
ปริมาตรรวม	25

โดยการทดสอบชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำ อาร์เอพีดีนำไพรเมอร์ที่มีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 9 ชนิด มาใช้ในการทดสอบว่าไพรเมอร์ใดสามารถทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมกับ ดีเอ็นเอของทุเรียน 14 พันธุ์และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีโดยการทำพีซีอาร์ส่วนผสมที่นำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 3 จากนั้นนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเครื่อง Thermo cycling โดยตั้งโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ ดังต่อไปนี้

อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ
อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที } ทำปฏิกิริยา 45 รอบ
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 1 รอบ

2.3.5 การคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้น

ทดสอบการทำอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 9 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 5) กับจีโนมิกดีเอ็นเอของทุเรียน 14 พันธุ์ และใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นคัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดลักษณะพอลิมอร์ฟิซึมกับจีโนมิกดีเอ็นเอของทุเรียนทั้ง 14 พันธุ์ นำผลผลิตดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส ที่มีความเข้มข้น 1.8% ใน 0.5X TBE buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM Boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 90 โวลต์ นาน 150 นาที จากนั้นตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลที่ย้อมด้วยเอทธิ-เดียมโบรไมด์ นาน 30 นาที แล้วล้างน้ำนาน 20 นาที บันทึกผลว่าไพรเมอร์ใดให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มากกว่า หรือเหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอของทุเรียน

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส	% GC
OPAM-03	CTTCCCTGTG	60
OPAM-12	TCTCACCGTC	60
OPAM-18	ACGGGACTCT	60
OPB-01	GTTTCGCTCC	60
OPB-14	TCCGCTCTGG	70
OPC-01	TTCGAGCCAT	60
OPC-05	GATGACCGCC	70
OPK-05	TCTGTCGAGG	60
OPZ-03	CAGCACCGCA	70

การตรวจสอบสายพันธุ์ทุเรียนด้วยไพรเมอร์ที่ทำการคัดเลือกไว้แล้วนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วมาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการใช้ดีเอ็นเอของทุเรียนแต่ละสายพันธุ์เป็นต้นแบบในการทำพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนผสมของปริมาณและชนิดของสารตามตารางที่ 3 แล้วเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย (1 kb ladder) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยการย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้ว

ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต วิเคราะห์ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

2.3.6 การวิเคราะห์ผลของเทคนิคอาร์เอพีดี

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทุเรียน ทำโดยการนำข้อมูลที่ได้จากการให้คะแนนจากขนาดและจำนวนแถบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแทนด้วย “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏที่ตำแหน่งเดียวกันแทนด้วย “0” แล้วนำค่าความแตกต่างทั้งขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละสายพันธุ์ทั้ง 14 สายพันธุ์ ไปเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชั่น18 เพื่อคำนวณความสัมพันธ์และสร้างสายสัมพันธ์ที่เหมาะสมบ่งบอกความใกล้ชิดและความแตกต่างทางพันธุกรรมทุเรียนทุกสายพันธุ์

การวิเคราะห์ผลของอาร์เอพีดี โดยวิเคราะห์ข้อมูลหาความสัมพันธ์ จากค่า Similarity coefficientแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอเป็นข้อมูลแบบ binary โดยให้ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะมีค่าเท่ากับ 0 คำนวณหาค่าความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอในรูป Similarity coefficient (Nei and Li, 1979) จากสมการ

Similarity coefficient, $F = 2X_{1,2} / X_1 + X_2$

โดยที่ $X_{1,2}$ คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันระหว่างชนิดที่ 1และชนิดที่ 2

X_1 คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดในชนิดที่ 1

X_2 คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดในชนิดที่ 2

2.3.7 วิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster analysis)

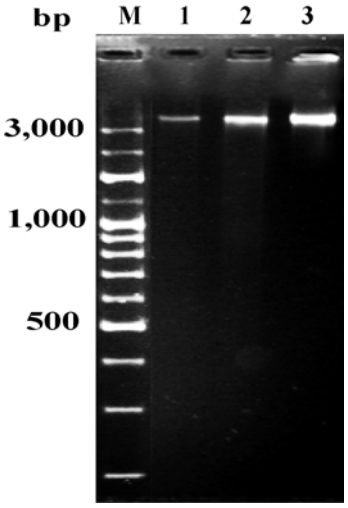
1. นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Dendrogram) โดยวิธีUPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic average) (Sneath and Sokal, 1973) จากโปรแกรม SPSS version 18

2. นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนผังการกระจายตัวและการรวมกลุ่ม โดยใช้วิธี PCA (Principal Component Analysis)

3. ผลและวิจารณ์การทดลอง

3.1 การสกัดดีเอ็นเอทุเรียน

จากการสกัดดีเอ็นเอของทุเรียนด้วยการใช้สารสกัด (extraction buffer) ที่ประกอบด้วยสารละลาย CTAB พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่กว่า 3,000 คู่เบส (bp) และเมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจล พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนเพียงพอและคุณภาพดีเหมาะสำหรับทำพีซีอาร์ (ภาพที่ 4) โดยแต่ละครั้งสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ 2.5-5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 100 มิลลิกรัมน้ำหนักสด ซึ่งสอดคล้องกับการสกัดแบบ CTAB ในพืชหลายชนิด เช่น กระชาย เป็นต้น (Vanijajiva *et al*., 2005) โดยพบว่าใบทุเรียนที่ยังอ่อนอยู่เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอจะให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าใบที่มีความแก่กว่าซึ่งมักจะให้ดีเอ็นเอที่มีสีน้ำตาลไม่เหมาะนำมาทำพีซีอาร์ต่อ ซึ่งมีสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และฟีโนลิคคอมพาวด์ (phenolic compound) ปนมากับดีเอ็นเอ



ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการสกัดด้วย CTAB โดยใช้ใบอ่อนทุเรียน (M) แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (1) 50 มิลลิกรัม, (2) 100 มิลลิกรัม, (3) 150 มิลลิกรัมของน้ำหนักสด

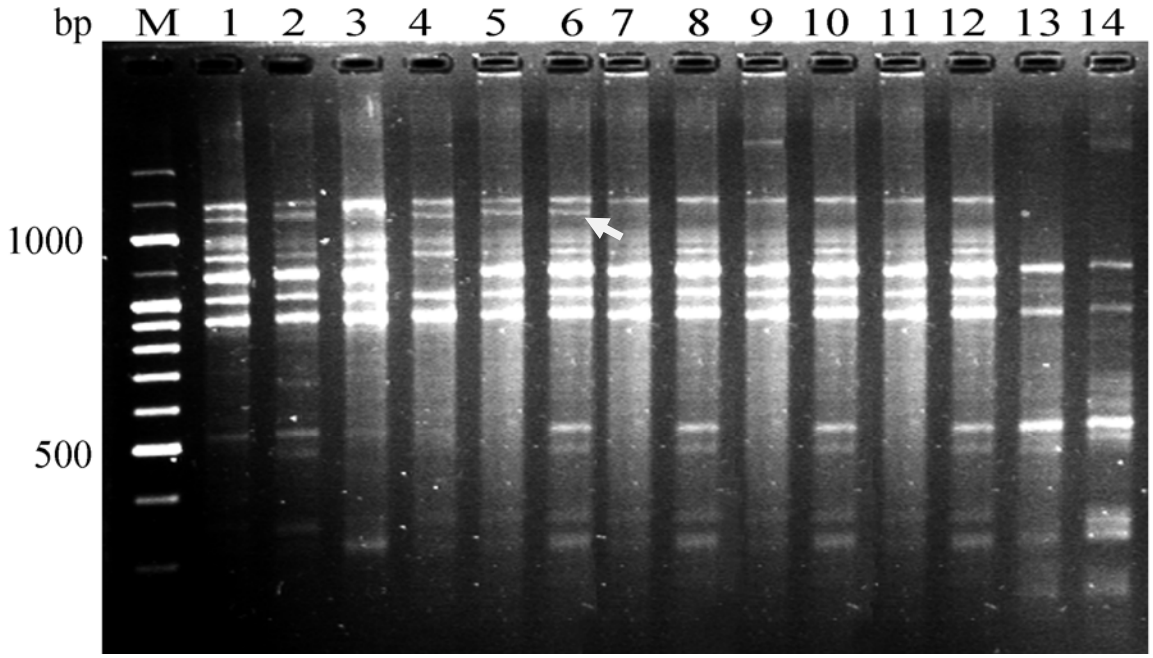
3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทุเรียน 14 สายพันธุ์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีทั้ง 10 ชนิดที่มีปริมาณ G+C ตั้งแต่ 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จากบริษัท operon เพื่อใช้ในการคัดเลือก

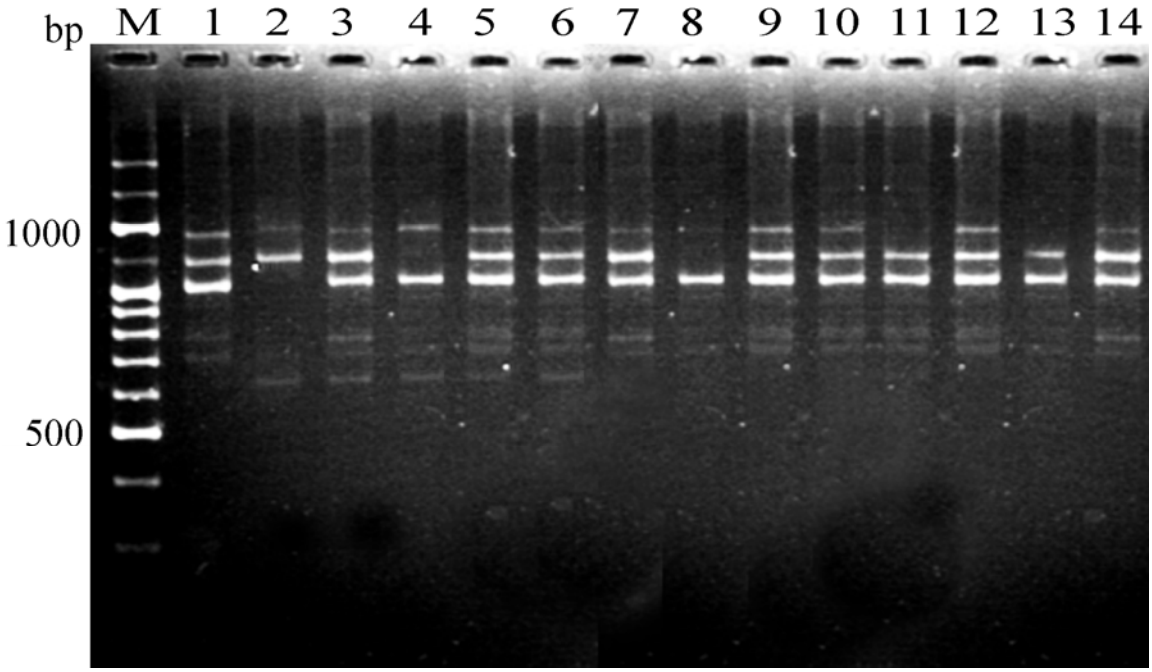
ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทุเรียนทั้ง 14 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่าดีเอ็นเอที่เกิดจากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ มาแยกขนาดของดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจลเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส แล้วย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต ซึ่งสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้หลายแถบและปรากฏแถบชัดเจน (major band) เนื่องจากมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำนวนมาก และแถบดีเอ็นเอที่จาง (minor band) ที่เกิดจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย ไพรเมอร์แต่ละชนิดสามารถให้ลักษณะของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหลายแบบ การเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากน้อยขึ้นอยู่กับดีเอ็นเอของทุเรียนแต่ละสายพันธุ์ด้วย ไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทุเรียนครั้งนี้มี 9 ชนิดได้แก่ OPAM 03, OPAM12, OPAM 18, OPB 01, OPB 14, OPC 01, OPC 05, OPK 05, OPZ 03 (ตารางที่ 4)

3.3 การตรวจสอบสายพันธุ์ทุเรียนโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

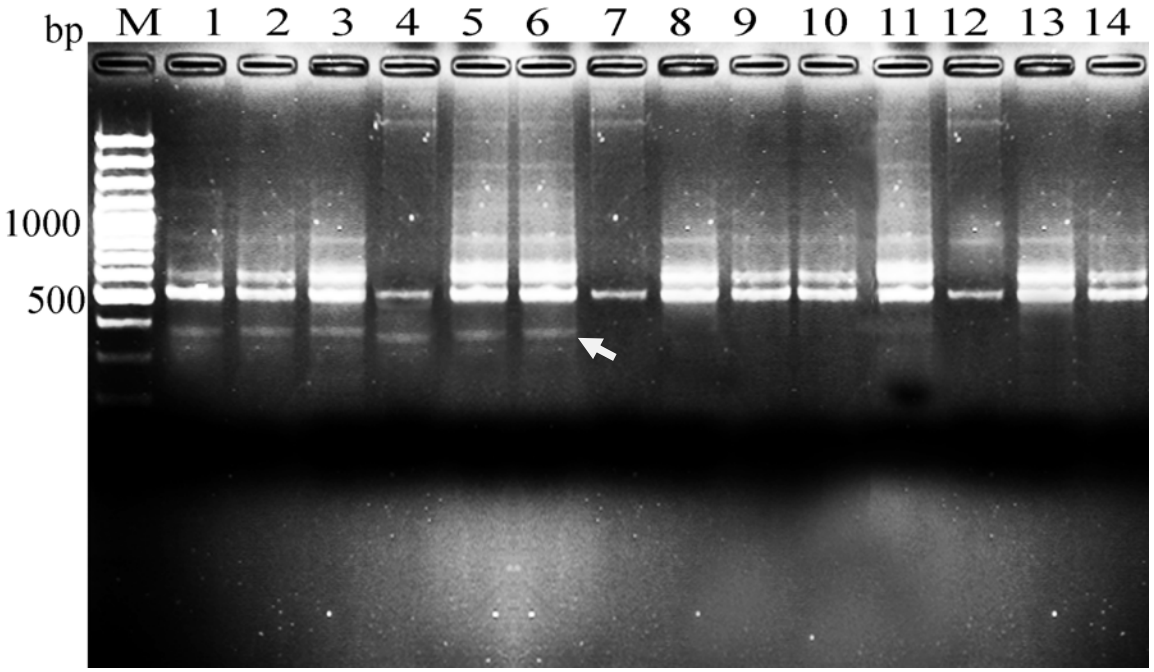
การปรับปริมาณสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์พบว่า ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng พบว่ามีแถบดีเอ็นเอ ที่มีความคมชัดสูง มีความเหมาะสมที่สุดที่จะใช้ทำปฏิกิริยาในการศึกษาครั้งนี้ และพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 5 mM ให้แถบดีเอ็นเอ ที่มีความชัดเจนสูงสุด จากนั้นนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างทุเรียน จำนวนทั้งหมด 14 ตัวอย่าง พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 145 แถบ เฉลี่ย 16 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จำนวน 30 แถบ (20.68%) เมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่าแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 50-3000 คู่เบส ดังภาพที่ 5-13 โดยพบว่าไพรเมอร์ OPAM 03 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1200 bp สามารถใช้แยกทุเรียนสายพันธุ์กบออกจากทุเรียนกลุ่มอื่นๆ (ภาพที่ 5) เช่นเดียวกับ ไพรเมอร์ OPAM 18 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp สามารถใช้แยกทุเรียนสายพันธุ์กบออกจากทุเรียนกลุ่มอื่นๆ ได้เช่นกัน (ภาพที่ 7) และไพรเมอร์ OPB 01 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 375 bp สามารถนำมาใช้จำแนกกลุ่มของทองย้อยฉัตรและฉัตรสีทองได้ (ภาพที่ 8) และพบว่าไพรเมอร์ OPC 05 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 100 bp สามารถใช้แยกทุเรียนสายพันธุ์อื่นๆออกจากสายพันธุ์กบ (ภาพที่ 11) เช่นเดียวกับไพรเมอร์ OPK 15 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,200 bp สามารถใช้แยกทุเรียนสายพันธุ์กบออกจากทุเรียนกลุ่มอื่นๆ ได้เช่นกัน (ภาพที่ 12) และไพรเมอร์ OPZ 03 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 295 bp สามารถใช้แยกทุเรียนสายพันธุ์ลวงออกจากสายพันธุ์อื่นๆได้เป็นต้น (ภาพที่ 13)



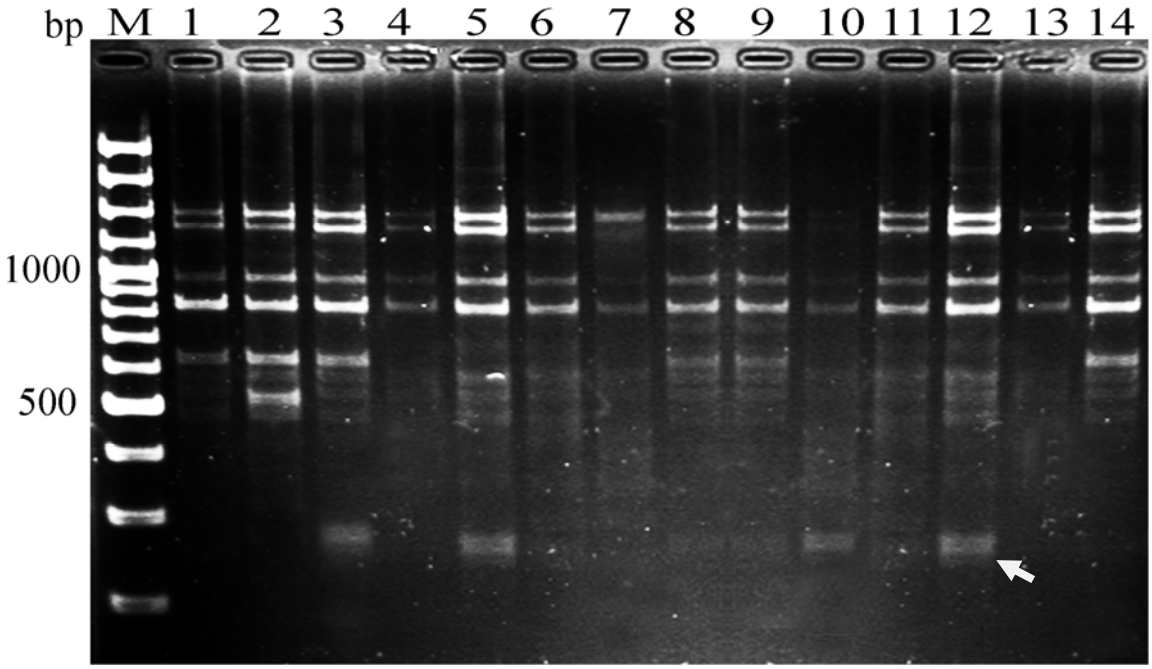
ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-03 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า,(6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



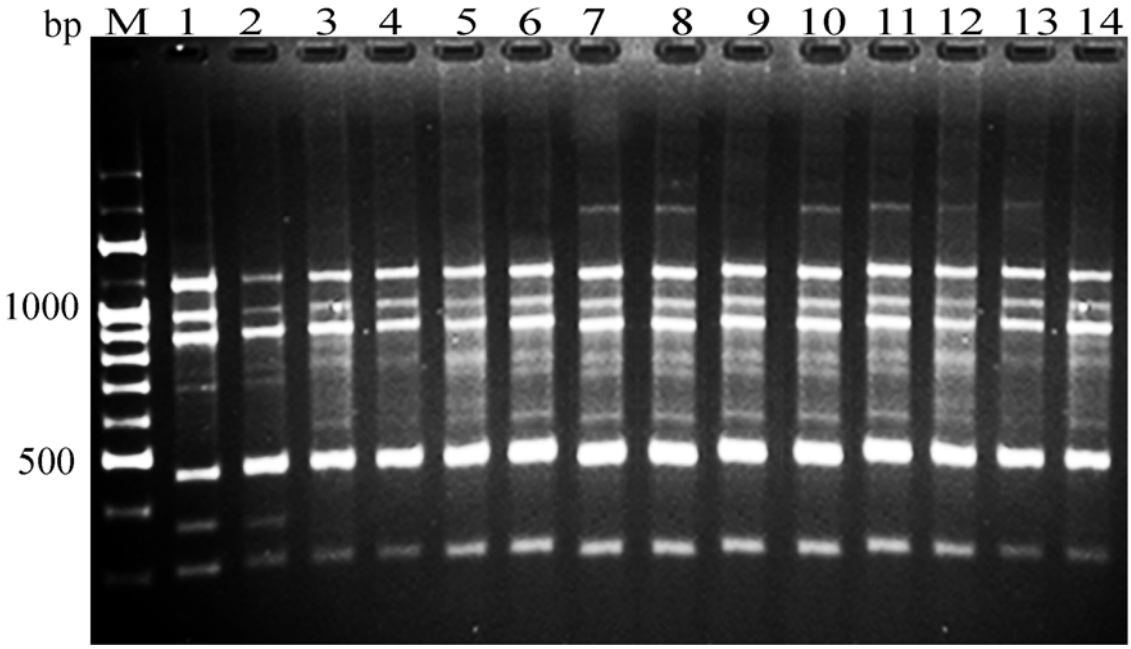
ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-12 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า,(6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



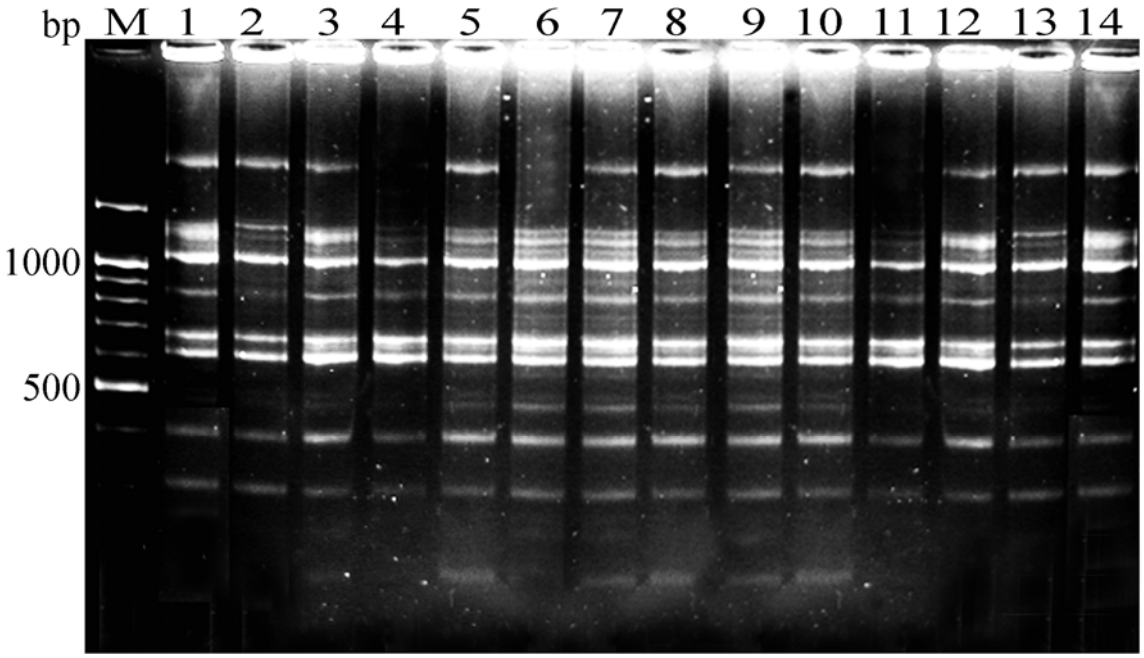
ภาพที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM-18 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า,(6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



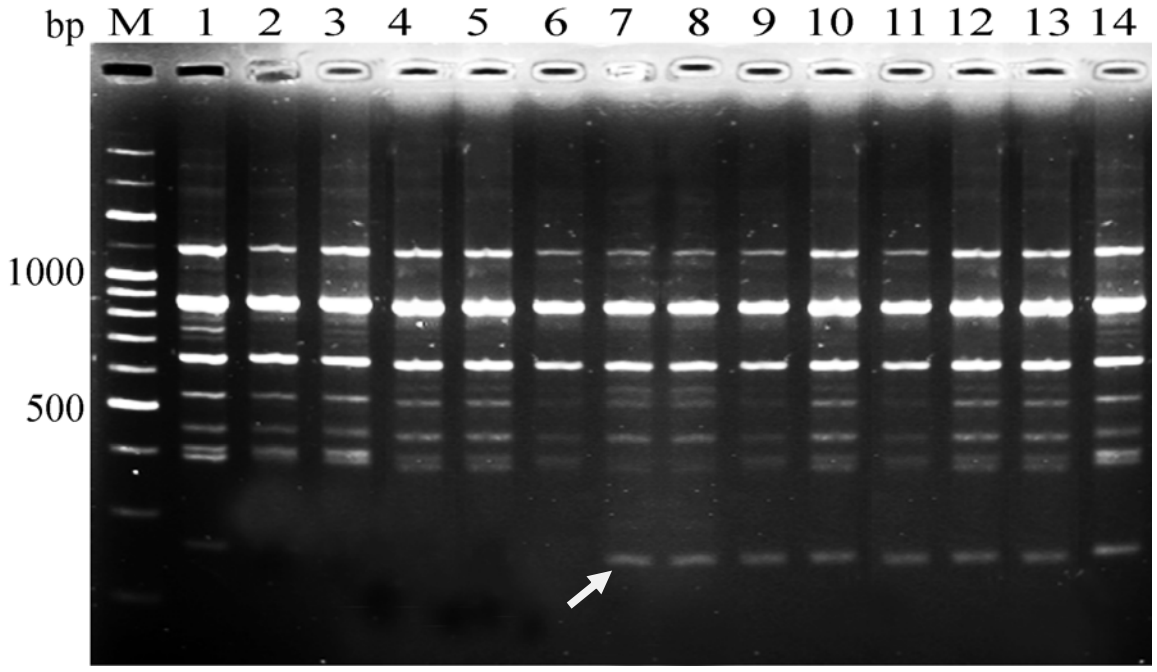
ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-01 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า, (6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



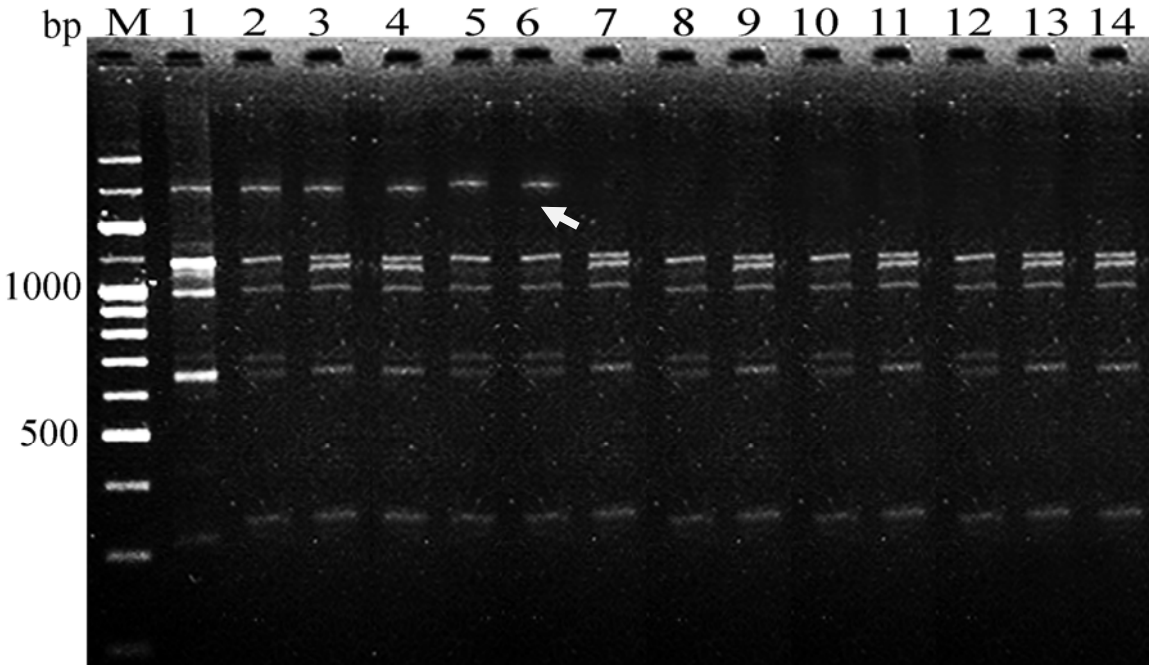
ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า,(6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



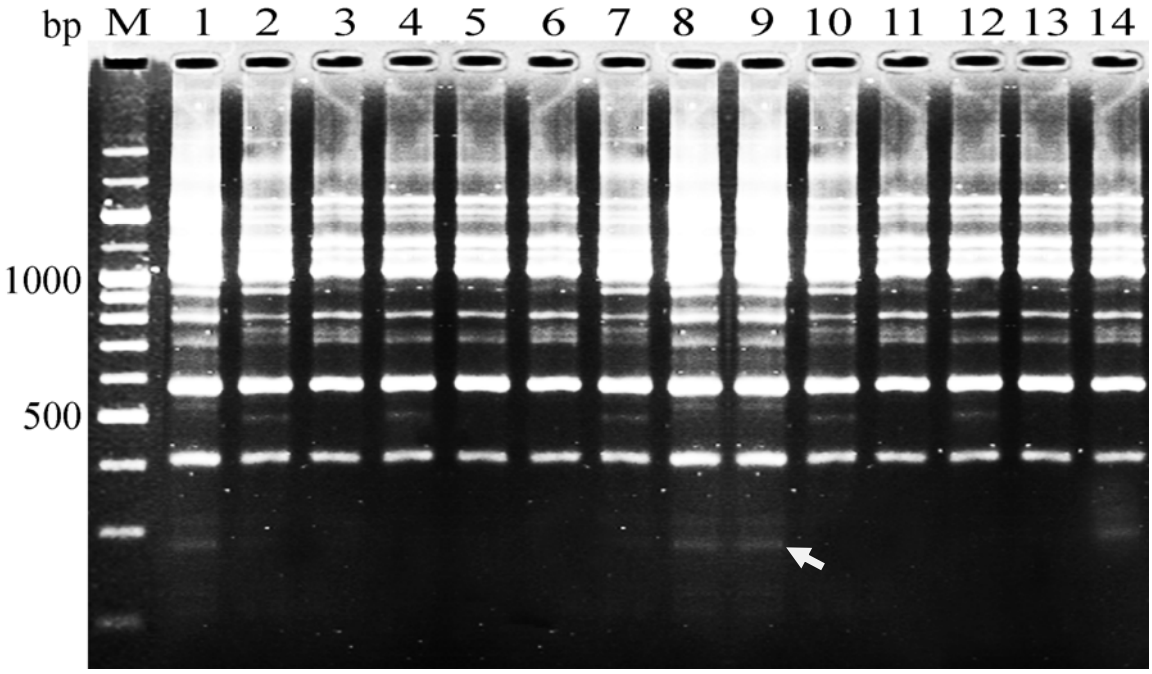
ภาพที่ 10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-01 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า, (6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-05 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า, (6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPK-05 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า, (6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี



ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OPZ-03 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp) (1) กบชายน้ำ, (2) กบสาวน้อย, (3) กบวัดกล้วย, (4) กบแม่เฒ่า, (5) กบตาเต่า, (6) กบตาขำ (7) ก้านยาว, (8) ย่ำมะหวาด, (9) ลวง (10) ทองย้อยฉัตร, (11) กำปั่น (12) ฉัตรสีทอง, (13) หมอนทอง (14) ชะนี

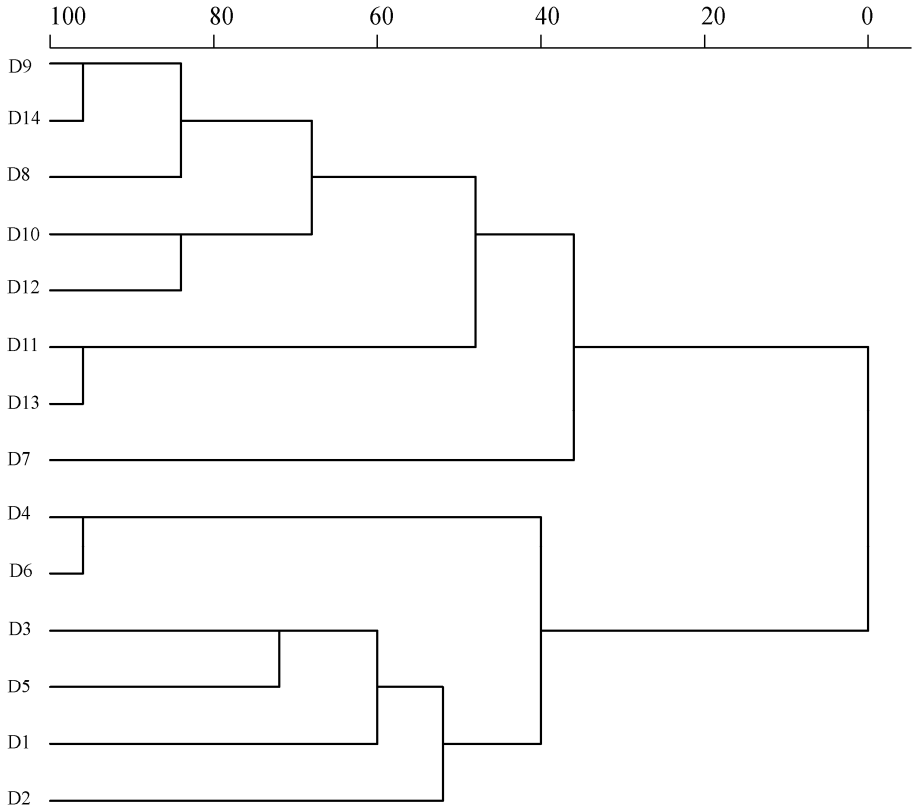
3.4 การจำแนกความสัมพันธ์ของทุเรียน

จากข้อมูลที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อนำข้อมูลของขนาดและจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 9 ชนิดซึ่งมีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 30 แถบที่แสดงความแตกต่างในสายพันธุ์ทุเรียนที่เป็นเชื้อพันธุกรรมทุเรียน ทั้ง 14 สายพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของการปรากฏของดีเอ็นเอโดยใช้สัญลักษณ์ “1” และเมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันโดยให้สัญลักษณ์ “0” นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 18 เพื่อคำนวณค่าความเหมือนและความแตกต่างของทุเรียนทีละคู่สลับกัน จนครบทั้ง 14 สายพันธุ์ แล้วนำมาสร้างเป็นตารางดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram) ที่เหมาะสมเพื่อแสดงความสัมพันธ์ของทุเรียนทั้ง 14 สายพันธุ์นั้น โดยแสดงใน ภาพที่ 14 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.235-0.929 (ตารางที่ 6)

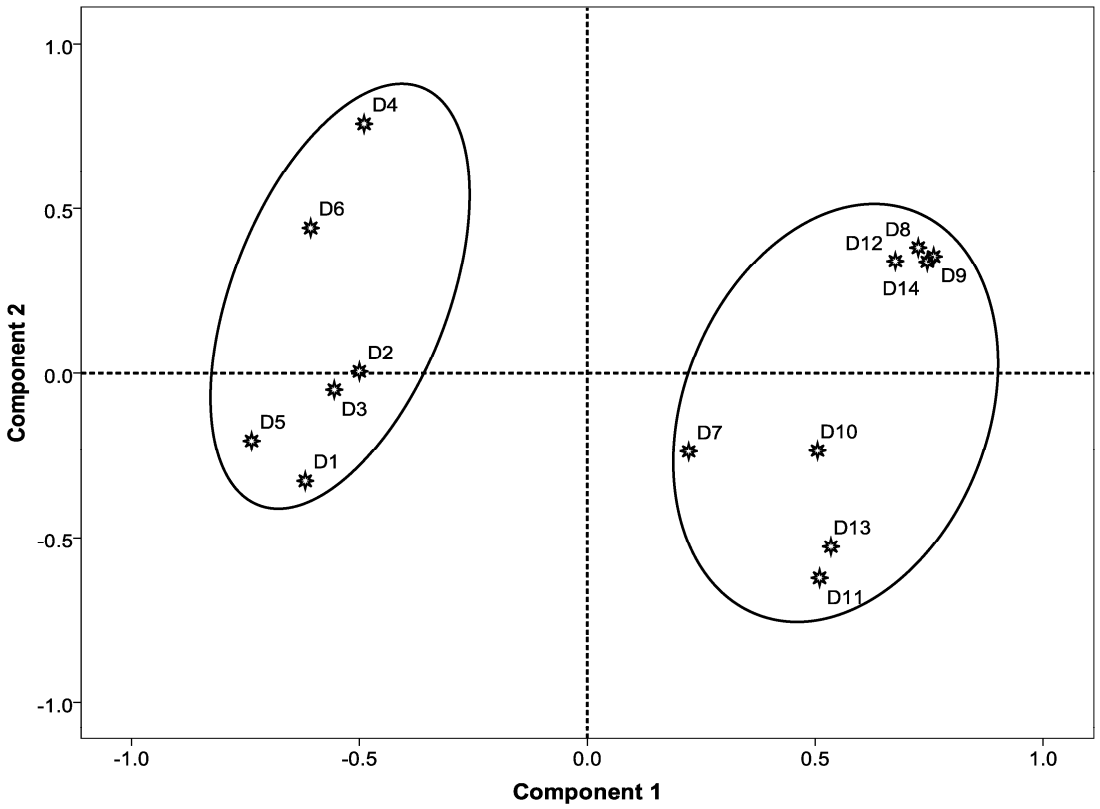
ตารางที่ 5 แสดงค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของทุเรียน 14 สายพันธุ์

Taxa	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
D1	1.000													
D2	.800	1.000												
D3	.846	.696	1.000											
D4	.750	.696	.750	1.000										
D5	.750	.800	.846	.636	1.000									
D6	.750	.800	.636	.929	.750	1.000								
D7	.696	.636	.696	.571	.571	.421	1.000							
D8	.421	.333	.571	.696	.235	.571	.636	1.000						
D9	.500	.571	.333	.636	.333	.636	.696	.889	1.000					
D10	.636	.571	.636	.500	.500	.500	.696	.800	.846	1.000				
D11	.696	.500	.421	.421	.421	.571	.750	.750	.800	.800	1.000			
D12	.421	.636	.571	.571	.421	.421	.750	.846	.889	.889	.636	1.000		
D13	.571	.500	.421	.421	.421	.571	.636	.846	.800	.800	.929	.636	1.000	
D14	.500	.421	.500	.636	.333	.500	.800	.889	.929	.750	.800	.889	.696	1.000

ผลการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis และหาค่า similarity coefficient ของ Dice ในทุเรียนท้องถิ่น จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เก็บจากจังหวัดนนทบุรี พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มทุเรียนกบ (D1-D6) กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่ม (D7) ก้านยาว, (D8) ย่ำมะหวาด, (D9) ลวง (D10) ทองย้อยฉัตร, (D11) กำปั่น (D12) ฉัตรสีทอง, (D13) หมอนทอง (D14) ชะนีตามลำดับ



ภาพที่ 14 สายสัมพันธ์ของทุเรียนสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ UPGMA ในโปรแกรม SPSS version 18 (D1) กบชายน้ำ, (D2) กบสาวน้อย, (D3) กบวัดกล้วย, (D4) กบแม่เฒ่า, (D5) กบตาเต่า,(D6) กบตาขำ (D7) ก้านยาว, (D8) ย่ำมะหวาด, (D9) ลวง (D10) ทองย้อยฉัตร, (D11) กำปั่น (D12) ฉัตรสีทอง, (D13) หมอนทอง (D14) ชะนี



ภาพที่ 15 กลุ่มความสัมพันธ์ของทุเรียนสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ PCAใน โปรแกรม SPSS version 18 (D1) กบชายน้ำ, (D2) กบสาวน้อย, (D3) กบวัดกล้วย, (D4) กบแม่เฒ่า, (D5) กบตาเต่า,(D6) กบตาขำ (D7) ก้านยาว, (D8) ย่ำมะหวาด, (D9) ลวง (D10) ทองย้อยฉัตร, (D11) กำปั่น (D12) ฉัตรสีทอง, (D13) หมอนทอง (D14) ชะนี

3.5 วิจารณ์การทดลอง

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ของทุเรียนสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ในรูปสายสัมพันธ์ (ภาพที่ 14) และกลุ่มความสัมพันธ์ (ภาพที่ 15) พบว่าสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานภายนอกที่หิรัญและคณะ (2542) ได้จำแนกไว้ พบว่าตระกูลกบ 6 สายพันธุ์ ซึ่งลักษณะประจำพันธุ์ ลำต้นมีทรงพุ่มแคบ ลำต้นสูงใหญ่และตั้งคล้ายต้นสน ลักษณะผลค่อนข้างใหญ่หรือเล็กตามพันธุ์ของกบแต่ละชนิด พูลีบไม่ค่อยมีเนื้อ และจากการศึกษาพบว่า กบแม่เฒ่า (D4) มีความใกล้ชิดกับกบตาขำ (D6) มากที่สุด ส่วนกบตาเต่า (D5) ใกล้ชิดกับกบวัดกล้วย (D3) มากกว่ากบชายน้ำ (D1) และกบสาวน้อย (D2) ส่วนทุเรียนสายพันธุ์อื่นๆจะแยกออกมาในกลุ่มที่ 2 โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยดังภาพที่ 14 โดยทุเรียนสายพันธุ์ก้านยาว (D7) จะแยกออกมาจากกลุ่มอื่นๆ ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะโดยทั่วไปที่พบว่าลักษณะของทุเรียนก้านยาว ลำต้นจะสูงชะลูดทิ้งกิ่ง ช่วงกิ่งยาวมากและเกือบตั้งฉากกับลำต้น ผลของทุเรียนก้านยาวจะ มีลักษณะทรงกลม เปลือกของผลค่อนข้างหนา ซึ่งในจังหวัดนนทบุรีนิยมปลูกกันทุกสวนเป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยมมาก แตกต่างจากพันธ์อื่นๆ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าทุเรียนสายพันธุ์ลวง (D9) มีความใกล้ชิดกับชะนี (D14) มากกว่าสายพันธุ์ย่ำมะหวาด (D8) ซึ่งหิรัญและคณะ (2542) จัดทั้งสามสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มลวง โดยลำต้นจะมีลักษณะทรงพุ่มโปรงค่อนข้างกว้าง ไม่สูงมากนัก และมักจะนอนไปกับพื้นดิน กิ่งไม่เป็นระเบียบ ผลของทุเรียนตระกูลนี้ ผลยาว พูไม่สม่ำเสมอ ผลบิดเบี้ยว ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากลุ่มลวงทั้งสามสายพันธุ์ใกล้ชิดกับกลุ่มทองย้อยซึ่งประกอบด้วยทองย้อยฉัตร (D10) กับฉัตรสีทอง (D12) โดยลำต้นของทุเรียนกลุ่มนี้มีลักษณะทรงพุ่มค่อนข้างกลมใหญ่และแข็งแรง ทรงผลอ่อนป้อม กลางผลจะป่องออกบริเวณก้นผลจะย้อยตามชื่อที่เรียกกันและเชื่อกันว่าเป็นกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมของจังหวัดนนทบุรี ในกลุ่มสุดท้ายคือทุเรียนกลุ่มกำปั่นที่ประกอบด้วย สายพันธุ์กำปั่น (D11) และหมอนทอง (D13) ซึ่งมีความใกล้ชิดกันกับกลุ่มลวงและกลุ่มทองย้อย แต่ก็ใกล้กับกลุ่มก้านยาวมากกว่ากลุ่มลวงและกลุ่มทองย้อย โดยลำต้นของทุเรียนกลุ่มนี้พบว่าลักษณะทรงพุ่มค้อนข้างแคบรูปคล้ายกรวยคว่ำ มียอดเรียวแหลม ลำต้นใหญ่แข็งแรง สูงและตั้งตรง แต่ผลของทุเรียนตระกูลนี้จะมีขนาดใหญ่ และเป็นที่นิยมปลูกกันมากในจังหวัดนนทบุรี ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าจากการศึกษาเบื้องต้นจากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกทุเรียนสายพันธุ์ต่างๆในจังหวัดนนทบุรีสามารถนำมาใช้ได้ อย่างไรก็ตามในอนาคตจำเป็นต้องใช้สายพันธุ์ของทุเรียนในจังหวัดนนทบุรีให้มากยิ่งขึ้น รวมทั้งไพรเมอร์ที่ใช้อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลายมากขึ้น และควรมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียด รวมทั้งควรมีการเปรียบเทียบทุเรียนจากพื้นที่หลายๆ

แหล่งร่วมด้วย เช่นจากบริเวณภาคใต้ หรือจังหวัดจันทบุรี เป็นต้น เพื่อศึกษาความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในระหว่างประชากร รวมทั้งความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ซึ่งจะทำให้ผลการศึกษาที่ได้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นชุดตรวจสายพันธุ์ทุเรียนที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วทำให้เกษตรกรสามารถแยกแยะสายพันธุ์ทุเรียนที่ต้องการได้ และสามารถนำไปปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งใช้ในการอนุรักษ์เพื่อก่อให้เกิดความหวงแหนทรัพยากรของประเทศให้มากยิ่งขึ้น

4. สรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุป

1. การสกัดดีเอ็นเอทำโดยใช้ CTAB ซึ่งดัดแปลงวิธีการมาจากวิธีการของ Vanijajiva *et al.* 2005 เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชหลายชนิดรวมทั้งทุเรียน เนื่องจากได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี ใช้เวลาในการสกัดน้อยสามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวัน และควรสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน จะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่ นอกจากนี้ยังสามารถปรับเปลี่ยนปริมาณสารในขั้นต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับพืชชนิดอื่นได้ง่าย และราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับน้ำยาสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ

2. การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลของทุเรียน 14 สายพันธุ์โดยเทคนิค อาร์เอพีดี จากไพรเมอร์ 9 ชนิดจำนวนทั้งหมด 14 ตัวอย่าง พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 145 แถบ เฉลี่ย 16 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จำนวน 30 แถบ (20.68%) เมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่าแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 50-3000 คู่เบส

3. ความสัมพันธ์ของทุเรียนทั้ง 14 สายพันธุ์นั้น พบว่าค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.235-0.929 และสามารถจำแนกทุเรียนทั้ง 14 สายพันธุ์ในครั้งนี้ ได้เป็น 2 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มทุเรียนกบ (D1-D6) กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่ม (D7) ก้านยาว, (D8) ย่ามะหวาด, (D9) ลวง (D10) ทองย้อยฉัตร, (D11) กำปั่น (D12) ฉัตรสีทอง, (D13) หมอนทอง (D14) ชะนีตามลำดับและพบว่าสอดคล้องกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พบว่า กบแม่เฒ่า (D4) จะมีความใกล้ชิดกับกบตาขำ (D6) มากที่สุด รวมทั้งกบตาเต่า (D5) ใกล้ชิดกับกบวัดกล้วย (D3) มากกว่ากบชายน้ำ (D1) และกบสาวน้อย (D2) ส่วนทุเรียนสายพันธุ์ก้านยาว (D7) จะแยกออกมาจากกลุ่มที่สองร่วมกับ ทุเรียนสายพันธุ์ลวง (D9) ซึ่งมีความใกล้ชิดกับชะนี (D14) มากกว่าสายพันธุ์ย่ามะหวาด (D8) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และใกล้ชิดกับทองย้อยฉัตร (D10) กับฉัตรสีทอง (D12) โดยเชื่อว่าเป็นกลุ่มทุเรียนดั้งเดิมแถบนนทบุรี นอกจากนี้ยังมีความใกล้ชิดกับทุเรียนสายพันธุ์กำปั่น (D11) และหมอนทอง (D13) ซึ่งเป็นทุเรียนที่นิยมปลูกในจังหวัดนนทบุรี

4.2 **ข้อเสนอแนะ**

1. การจำแนกทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี สามารถใช้เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถจำแนกสายพันธุ์ทุเรียนท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรีได้

2 . ในอนาคตหากได้ตัวอย่างของทุเรียนมากสายพันธุ์ยิ่งขึ้นจะสามารถทำให้เราทราบถึงข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียนนนท์มากยิ่งขึ้น และยิ่งชัดเจนถ้ามีข้อมูลทางสัณฐานวิทยามาพิจารณาประกอบกัน อันน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการยืนยันผลการศึกษา และการพัฒนาที่ยั่งยืนต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. (2547). การใช้เทคโนโลยีการสำรวจระยะไกล และสารสนเทศภูมิศาสตร์สำรวจและประเมินผลผลิตทุเรียน ปีการผลิต 2546/47. กรุงเทพฯ: สำนักงานสำรวจดินและวางแผนการใช้ที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2543). คู่มือการผลิตทุเรียนที่ดีและเหมาะสม. มนตรี วงศ์รักษ์พานิช;และ วันทนา บังทรัพย์. (2543). กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ทรงพล สมศรี. (2530). การศึกษาการผสมทุเรียนพันธุ์ชะนีและก้านยาวโดยใช้เกสรตัวผู้พันธุ์ต่างๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

รัชฎา เศรษวงศ์สิน. 2533. ความสัมพันธ์ระหว่างอายุเก็บเกี่ยวกับความแข็งแรงของขั้วผลทุเรียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลับเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฐานเกษตรกรรม. (2530). เฉพาะกิจที่ 14 ทุเรียน. กรุงเทพฯ: สหมิตรออฟเซท.

แสวง ภูศิริ. (2527). ทุเรียน. วิทยาลัยเกษตรกรรมตรัง, ตรัง.

สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดนนทบุรี. (2542). ประวัติการปลูกทุเรียนดั้งเดิม การแพร่ขยายตัวของทุเรียนในประเทศไทย.สดุดี เหลืองอรุณ. (2542). นนทบุรี: สำนักงานฯ.

สำนักงานพาณิชย์จังหวัดนนทบุรี. (2549). ข้อมูลการตลาดจังหวัดนนทบุรี ประจำปี 2548.นนทบุรี: สำนักงานฯ.

สำนักงานส่งเสริมเกษตรจังหวัดนนทบุรี. (2549).พื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตของทุเรียนแยกตามอำเภอ กรมส่งเสริมการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สุรสังกาศ วิริยรัตนกุล, 2549 วิเคราะห์หาพื้นที่ที่มีศักยภาพและเหมาะสม ในการปลูกทุเรียน จังหวัดนนทบุรี วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาภูมิศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2540). การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. โครงการตำรา, ปทุมธานี.

หิรัญ หิรัญประดิษฐ์, สุขวัฒน์ จันทรปรณิก และเสริมสุข สลักเพ็ชร. (2542). เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Nei, M. and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of

restriction endonucleases. PNAS. 76: 5269–5273.

Nuchuchua, O., Chaipornpokin, W., Maktrirat, R., Phummiratch, D., Pongsamart, S. and Sukrong, S. (2008) Characterization of *Durio zibethinus* by molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rind. Act. Hort. 786

Santoso PJ, Saleh G.B., Saleh N.M. and Napis S. (2005). Phylogenetic relationships amongst 10 *Durio* species on PCR-RFLP analysis of two chloroplast genes. Ind. J. Agri. Sci. 6:20-27.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). Numerical Taxonomy. Freeman, Sanfrancisco.

Somsri, S. (2007). Thai Durian. Horticulture Research Institute, Department of Agriculture Chatuchak, Bangkok.

Somsri, S. (2008). Durian: Southeast Asia's King of Fruits. Chronica Horticulturae 48,19-21.

Somsri, S., Sakuanrungsirikul, S., Ngam-Ngern, W. and Wongvarat, T. (2005). Identification of *Durio* species, cultivars and clones by DNA Amplification Fingerprinting (DAF). Thai Agri. Res. J., 23, 188-210.

Subhadrabandhu, S. and Ketsa, S. (2001). Durian: King of Tropical Fruit. CABI. Pub.178 p.

Tacca, J.A., Abad, R.G., and Bastian S.T. Jr. (2005). Molecular characterization and relationships of 14 durian cultivars (*Durio zibethinus* Murr.) using RAPD markers Scientific Conference of the Federation of Crop Science Societies of the Philippines, Lapasan, Cagayan de Oro City (Philippines), 30, 20.

Vanijajiva O., Sirirugsa P. and Suvachittanont W. (2005). Confirmation of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD. Biochem. Syst. Ecol, 33, 159-170.

Weising, K., Nybom, H. Wolff, K. and Meyer W. (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press Inc., USA. 322 p.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski J.A. and Tingey, V.S. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic. Acids Res. 18: 6531-6535.

6. ประวัติของผู้วิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)	: ดร. โองการ วณิชาชีวะ
(ภาษาอังกฤษ)	: Dr.rer.nat Ongkarn Vanijajiva
ตำแหน่งปัจจุบัน	: อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก	: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10220
โทรศัพท์	: 02-544-8000 ต่อ 3118 โทรสาร 02-521-0421
E-mail	: vanijajiva@pnru.ac.th, vanijajiva@yahoo.com

ประวัติการศึกษาประวัติการศึกษา	**ปริญญาตรี** สาขาวิชา วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิทยาเขตหาดใหญ่) **ปริญญาโท** สาขาวิชา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิทยาเขตหาดใหญ่) **ปริญญาเอก** สาขาวิชา Doctor of natural science (Biology) Johannes Gutenberg University Mainz, Germany
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ	อนุกรมวิธานพืชดอก, นิเวศวิทยา, ชีวเคมีพืช

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศรีสมร วนกรกุล
(ภาษาอังกฤษ) : Asst. Prof. Srisamorn Vanakornkul
ตำแหน่งปัจจุบัน : รองอธิการบดีฝ่ายบริหารจัดการ
มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10220
โทรศัพท์ : 02-544-8000

ประวัติการศึกษาประวัติการศึกษา **ปริญญาตรี** สาขาวิชา การศึกษาบัณฑิต (ชีววิทยา)
วิทยาลัยวิชาการศึกษา ประสานมิตร
ปริญญาโท สาขาวิชา การศึกษามหาบัณฑิต (ชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พันธุศาสตร์, อนุกรมวิธาน, วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ. 2511-2533	อาจารย์วิทยาลัยครูพระนคร และผู้ชำนาญการสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สส.วท.)
พ.ศ. 2534-2538	หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพระนคร
พ.ศ. 2538-2542	รองคณบดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพระนคร
พ.ศ. 2542-2546	คณบดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ฝ่ายวิชาการ สถาบันราชภัฏพระนคร
พ.ศ. 2546-2548	ผู้อำนวยการสำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
พ.ศ. 2552	รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
พ.ศ. 2553-ปัจจุบัน	รองอธิการบดีฝ่ายบริหารจัดการ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร