



วิทยานิพนธ์

การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแตงกวา
(*Cucumis sativus* L.) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์
ทางพันธุกรรม

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE
MARKERS IN CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.) AND A COMPARISON OF
COST-EFFECTIVENESS ANALYSIS FOR GENETIC PURITY TESTING

นางสาวนุชจรี วัชรพงษ์ไพบุลย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

Development and Characterization of Microsatellite Markers in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and A Comparison of Cost-Effectiveness Analysis for Genetic Purity Testing

นามผู้วิจัย นางสาวนุชจรี วัชรพงษ์ไพบุลย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุลภาค คูนวงศ์, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุเทวี สุขปรากฏ, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ เปรียบพร้อม, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.)
และการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

Development and Characterization of Microsatellite Markers in Cucumber (*Cucumis sativus* L.)
and A Comparison of Cost-Effectiveness Analysis for Genetic Purity Testing

โดย

นางสาวนุชจรี วัชรวงษ์ไพบูลย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

นุชจรี วัชรวงษ์ไพบูลย์ 2550: การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด
Microsatellite ในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการ
ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม วิทยุญาปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์จตุภาค คุ้มวงศ์, Ph.D. 138 หน้า

การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) โดย
ใช้วิธี enriched genomic library พบว่าไพรเมอร์ 57 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณได้ในแตงกวาและไพโร
เมอร์จำนวน 45 คู่ สามารถแยกความแตกต่างในแตงกวา 16 สายพันธุ์ได้ โดยมีจำนวนอัลลีลต่อ
โลคัสเฉลี่ย 3.64 มีค่า PIC สูงสุดเท่ากับ 0.78 และเฉลี่ยเท่ากับ 0.47 นอกจากนี้ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย
ชนิด microsatellite สามารถใช้ในระบบตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์และสามารถใช้
ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์ในพืชวงศ์แตง เช่น แคนตาลูป แตงโม ฟักทองและมะระได้ การ
ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาที่ระยะเวลา 21 หรือในช่วงแรกของการเจริญ
ของต้นพืช พบว่าวิธีการปลูกทดสอบ (GOT) มีต้นทุนต่ำกว่าการใช้เทคนิค SSLP คือ 12.11 บาทต่อ
ต้น และในกรณีใช้เวลาตรวจสอบที่ 33 วัน การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค
SSLP มีต้นทุนต่ำกว่าการใช้วิธีการ GOT คือ 1.70 บาทต่อต้น

Nuchjaree Watcharawongpaiboon 2007: Development and Characterization of Microsatellite Markers in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and A Comparison of Cost-Effectiveness Analysis for Genetic Purity Testing. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Julapark Chunwongse, Ph.D. 138 pages.

The microsatellite markers in cucumber (*Cucumis sativus* L.) were developed using the enrichment procedure. Fifty-seven primer pairs flanking the microsatellite repeats were used to amplify cucumber DNA. For polymorphism information assessment, 16 *Cucumis sativus* L. were assessed with 45 primer pairs. The average number of alleles per locus was 3.64. The maximum polymorphism information content (PIC) value was 0.78 with an average of 0.47. The cucumber microsatellite makers could be useful for seed purity control. We also found that some cucumber markers were transferable to other cucurbit species such as cantaloupe, watermelon, pumpkin, and bitter gourd. When testing the genetic purity at 21 days, The cost of using GOT was lower than the cost of using SSLP at 12.11 baht/plant and testing at 33 days the cost of using SSLP was lower than the cost of using GOT at 1.70 baht/pant

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุลภาค กุ๋นวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทวี สุขปรากฏ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ เปรียบพร้อม กรรมการที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร. จริยา จันทร์ไพแสง ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรที่สนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน (Tropical Vegetable Research Center: TVRC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม และ บริษัทเจียไต๋ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอนุเคราะห์พันธุ์แตงกวาในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำสถานีผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก บริษัทเจียไต๋ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และเกษตรกรทุกท่าน ที่ให้ข้อมูลและอำนวยความสะดวก เอื้อเฟื้อสถานที่ระหว่างการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณฉัฐพร กุ๋นวงศ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและให้ข้อคิดที่ดีระหว่างการศึกษาและดำเนินงานวิจัย

ขอบคุณ คุณพนิดา ฐาตุจิวรังค์กุล คุณกาญจนา จุ้ยเอี่ยม คุณนัฐยา ศรีสวัสดิ์ พี่ใหญ่ พี่น้อง (สุนิตสา) พี่กอบ พี่รัต พี่แก้ว และพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่ได้เป็นกำลังใจและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอขอบคุณ พี่น้องทุกคนในครอบครัว และคุณสุรชัย ชาตินาม ที่ได้ช่วยเหลือ ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ประโยชน์อันใดเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแต่ คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้มาตลอดจนกระทั่งบัดนี้

นุชจรี วัชรวงษ์ไพบุลย์

ตุลาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	27
ผลการทดลอง	45
วิจารณ์	94
สรุป	106
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	107
ภาคผนวก	118

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์ Positive clones จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ด้วยวิธีการสร้าง genomic libraries แบบดั้งเดิม	10
2	การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์	13
3	มากกว่า 8 accessions, มากกว่า 8 สายพันธุ์ และพีชวงค์แดงพันธุ์การค้าจำนวน 4 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษา	28
4	รายละเอียดโคลนที่ได้จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite โดย วิธี enriched genomic library ด้วยโพรบ (CT) ₁₀	46
5	ชนิดของ Microsatellite ดีเอ็นเอ, ลำดับเบสไพรมอร์, Annealing temperature (T _A), ขนาดอัลลีล, จำนวนอัลลีล, ค่า Observ heterozygosity (Ho), ค่า Expected heterozygosity (He), ค่า Polymorphism Information Content (PIC) และค่า Probability of Identity (PI) ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 45 ตำแหน่ง	49
6	ชนิดของ Microsatellite ดีเอ็นเอ, ลำดับเบสไพรมอร์, Annealing temperature (T _A), ขนาดอัลลีล, จำนวนอัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 12 ตำแหน่งที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างมากกว่า 8 accessions และมากกว่า 8 สายพันธุ์ ได้	53
7	การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย Microsatellite 57 ตำแหน่ง ตรวจสอบจีโนไทป์ในแคนตาลูป (<i>Cucumis melo</i> L.), แตงโม (<i>Citrullus vulgaris</i>), ฟักทอง (<i>Cucurbita</i> spp.) และมะระ (<i>Momordica charantia</i> L.)	57
8	การตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อที่ใช้สร้างเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสม 4 พันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 10 ตำแหน่ง (parental polymorphism survey)	60
9	จำนวนอัลลีล, ค่า Polymorphism Information Content (PIC), ค่า Probability of Identity (PI) และค่า PI ร่วมของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 10 ตำแหน่ง	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์แดงกว่า 4 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite	64
11	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในแดงกว่าสายพันธุ์ CUB2, CUB13, CUB16, CUB76 และ CUB85 ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 7 ตำแหน่ง	69
12	ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกว่าลูกผสม 4 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี GOT และเทคนิค SSLP	72
13	ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT โดยการจ้างเกษตรกรดำเนินการปลูก ที่ระยะเวลา 21 วัน ในปีการเพาะปลูก 2548	78
14	ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT โดยการจ้างเกษตรกรดำเนินการปลูก ที่ระยะเวลา 33 วัน ในปีการเพาะปลูก 2548	79
15	ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT ในกรณีที่บริษัทเป็นผู้ดำเนินการปลูกทดสอบแดงกว่าลูกผสมจำนวน 2,400 ต้นในระยะเวลา 21 วันในปีการเพาะปลูก 2548	83
16	ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT ในกรณีที่บริษัทเป็นผู้ดำเนินการปลูกทดสอบแดงกว่าลูกผสมจำนวน 2,400 ต้นในระยะเวลา 33 วันในปีการเพาะปลูก 2548	84
17	ต้นทุนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP กรณีที่ดำเนินการตรวจสอบที่ตัวอย่าง 1,708 ต้นในระยะเวลาการตรวจสอบ 21 วัน	88
18	ต้นทุนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP กรณีที่ดำเนินการตรวจสอบ 2,684 ต้นในระยะเวลาการตรวจสอบ 33 วัน	89
19	การเปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยวิธี GOT ระหว่างกรณีจ้างเกษตรกรและดำเนินการปลูกตรวจสอบเองและใช้เทคนิค SSLP	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
20	ร้อยละของต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT ระหว่างกรณี การจ้างเกษตรกรดำเนินการ การดำเนินการปลูกตรวจสอบเอง และใช้เทคนิค SSLP ที่ระยะเวลา 21 วัน	92
21	ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาด้วยเทคนิค SSLP	93
ตารางผนวกที่		
ก1	ขนาดของอัลลีลและความถี่อัลลีลของแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 45 ตำแหน่ง	122
ก2	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำของ Microsatellite ดีเอ็นเอและความสามารถในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite	125
ข1	ราคาของปัจจัยการผลิตที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT	127
ข2	ค่าจ้างแรงงาน ค่าจ้างรถไถ ค่าซ่อมแซม ค่าเช่าที่ดินและค่าเสื่อมราคา ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT	128
ข3	ราคาสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSLP	129
ข4	ราคาวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSLP	130
ข5	ต้นทุนต่อหน่วยของสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSLP	131

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิธีและขั้นตอนการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ด้วยวิธีการสร้าง genomic library แบบดั้งเดิม	11
2	วิธีและขั้นตอนการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ด้วยวิธีการ Enriched genomic library	12
3	ความแปรปรวนของ Microsatellite ดีเอ็นเอชนิดไดนิวคลีโอไทด์	16
4	แถบดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างระดับจีโนไทป์ในแดงกว่า 8 accessions และแดงกว่า 8 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง ก.) CMCT 720, ข.) CMCT656 ในการตรวจสอบ	54
5	ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง ก.) CMCT 36 ข.) CMCT691 ที่ไม่แสดงความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ในแดงกว่า 8 accessions และแดงกว่า 8 สายพันธุ์	55
6	ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 6 ตำแหน่ง ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อที่ใช้สร้างแดงกว่าลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 4 สายพันธุ์	61
7	ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 4 ตำแหน่ง ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อที่ใช้สร้างแดงกว่าลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 4 สายพันธุ์	62
8	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกว่าลูกผสมพันธุ์ CUA จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT323	65
9	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกว่าลูกผสมพันธุ์ CUB จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT252	66
10	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกว่าลูกผสมพันธุ์ CUC จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT323	67
11	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกว่าลูกผสมพันธุ์ CUD จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT323	68

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในเตงกวาสายพันธุ์ CUB2, CUB13, CUB16, CUB76 และ CUB85 ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 7 ตำแหน่ง	70
13	ก.) ความแตกต่างของขอบใบ ระหว่างต้นแม่, พ่อ และลูกผสม ของเตงกวาสายพันธุ์ CUA ข.) ความแตกต่างทาง sex expression ระหว่างต้นแม่, พ่อ และลูกผสม ของเตงกวาสายพันธุ์ CUB	73

การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด **Microsatellite** ในแตงกวา
(*Cucumis sativus* L.) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์
ทางพันธุกรรม

**Development and Characterization of Microsatellite Markers in Cucumber
(*Cucumis sativus* L.) and A Comparison of Cost-Effectiveness Analysis for
Genetic Purity Testing**

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญแห่งหนึ่งเพราะมีพื้นที่และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตง ซึ่งเป็นพืชที่มีการซื้อขายเมล็ดพันธุ์กันมาก เนื่องจากแตงกวาเป็นพืชผักสำคัญที่คนทั่วโลกนิยมบริโภคทั้งในรูปผลสดและแปรรูป ปัจจุบันการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาล้วนแต่ผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ทั้งสิ้น และการทำธุรกิจเมล็ดพันธุ์นั้น ไม่ว่าจะเป็นการซื้อขายภายในประเทศหรือส่งออกก็ตาม คุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญที่สุดที่จะต้องพิจารณา โดยเฉพาะอย่างยิ่งความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นสิ่งแสดงให้เห็นลักษณะประจำพันธุ์ของพันธุ์นั้นๆ ซึ่งก่อนการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์สู่ตลาดและส่งออก จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้ได้มาตรฐานตามที่กำหนดไว้ เพื่อเป็นการยืนยันคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ว่ามีความตรงต่อสายพันธุ์หรือไม่และเพื่อเป็นการสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้ซื้อและสร้างความน่าเชื่อถือให้กับผู้ขาย

ปัจจุบันบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทยส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีปลูกทดสอบในแปลงปลูกหรือเรียกว่า Grow Out Testing (GOT) ซึ่งวิธีการนี้เป็นการตรวจสอบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏให้เห็นภายนอกทั้งจากเมล็ดและในช่วงต่างๆของการเจริญเติบโตของต้นพืช โดยที่สภาพแวดล้อมมีผลกระทบอย่างมากต่อการแสดงออกและบางครั้งต้องอาศัยระยะเวลาในการตรวจสอบ ดังนั้นวิธีการปลูกทดสอบมีข้อจำกัดหลายประการด้วยกัน เช่น ความถูกต้องแม่นยำ ต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่นาน จำนวนแรงงานที่ใช้มากและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและมีประสบการณ์ในการจำแนกพันธุ์

Isozyme เป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์และตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ เนื่องจาก isozyme ใช้หลักการแสดงออกทางโปรตีนหรือเอ็นไซม์ แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วย isozyme มีข้อจำกัด เนื่องจากโปรตีนเป็นผลจากการแสดงออกของยีนดังนั้นสภาพแวดล้อมและสภาพในเนื้อเยื่อของพืชมีผลต่อการแสดงออก ทำให้ผลการตรวจสอบมีความผิดพลาดได้บ้าง นอกจากนี้ isozyme สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชได้ต่ำเนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของความหลากหลายของโปรตีน (Walter *et al.*, 1989)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการจำแนกและตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดีเนื่องจากดีเอ็นเอไม่ว่าจะอยู่ส่วนไหนของต้นพืชก็ไม่เปลี่ยนแปลง การวิเคราะห์สามารถตรวจสอบได้ทุกเวลาโดยสิ่งแวดลอมภายนอกไม่มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลง ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ในแตงกวาโดย Matsuura *et al.* (1994) และ Dijkhuizen *et al.* (1996) แต่อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ยังมีข้อจำกัดคือต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมาก ใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบและเสียค่าใช้จ่ายในการสร้างตัวตรวจสอบสูง สำหรับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD (random amplified polymorphic DNA) เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) วิธีนี้ถือได้ว่าง่าย ประหยัดและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามข้อด้อยของวิธีการนี้คือความน่าเชื่อถือของผลการตรวจสอบที่อาจไม่แน่นอนเมื่อทำซ้ำคือหากสภาพแวดล้อมของการทดลองเปลี่ยนไป เช่น ปริมาณของเอ็นไซม์ *Taq* polymerase, อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของดีเอ็นเอหรือไพร์เมอร์ มีผลทำให้ผลการตรวจสอบอาจแตกต่างกันได้ (Büscher *et al.*, 1993) ดังนั้นจะต้องระมัดระวังเป็นพิเศษสำหรับการควบคุมสถานะต่างๆในการทดลองให้คงที่ (This *et al.*, 1997) และนอกจากนั้นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์แบบ Homozygous และ Heterozygous ได้ (สุรินทร์, 2545)

Microsatellite หรือ simple sequence repeats (SSRs) เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ (Repetitive DNA) ชนิดหนึ่งที่มีลำดับเบสซ้ำกันอย่างต่อเนื่องเป็นสายสั้นๆ เรียงต่อกัน (tandem repeat) ตั้งแต่ขนาด 1-6 เบส เช่น (C)_n (CT)_n (CTT)_n เมื่อ n คือจำนวนซ้ำ พบว่า SSRs มีความถี่และกระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต (Hamanda *et al.*, 1982) ความแปรปรวนของ SSRs เกิดขึ้นเนื่องจากความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication)

(Tautz *et al.*, 1986; Levinsen and Gutman, 1987) SSRs เป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนสูง ทำให้สามารถตรวจพบความแตกต่างได้ง่ายในแต่ละตำแหน่งของ SSRs โดยอาศัยหลักการของ PCR (Saiki *et al.*, 1985) โดยใช้ไพรเมอร์ข้างข้างบริเวณ SSRs (Litt and Luty, 1989; Weber and May, 1989) และตรวจสอบผลโดยแยกความแตกต่างของขนาดอัลลีลแต่ละตำแหน่งด้วยวิธี electrophoresis ซึ่งหลักการนี้เรียกว่า simple sequence length polymorphism (SSLP)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง Homozygous และ Heterozygous ได้ มีความสามารถในการแยกความแตกต่างได้สูงกว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดอื่น มีความเสถียรสูง (stability) ทำซ้ำได้ (reproducibility) (Powell *et al.*, 1996b) และสามารถให้ข้อมูลเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว จึงมีการนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้มาใช้ศึกษาในทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้ในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต การจำแนกสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต

ถึงแม้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite มีความสำคัญและเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์พืชและตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทยยังคงไม่แน่ใจเกี่ยวกับต้นทุนค่าใช้จ่ายและประสิทธิภาพของเทคนิค SSLP ประกอบกับข้อมูลเกี่ยวกับต้นทุนค่าใช้จ่ายของการใช้วิธีการ SSLP และ GOT ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นส่วนที่สองของการศึกษาเป็นการศึกษาเกี่ยวกับต้นทุนการใช้เทคนิค SSLP และ GOT ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อการตัดสินใจของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ที่จะนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ไปใช้ในระบบตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาและจำแนกลักษณะของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ใน แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) สำหรับใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม
2. เพื่อประเมินค่าความสามารถในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแต่ละตำแหน่ง
3. เพื่อใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตรวจสอบข้ามชนิดและสกุลในพืชวงศ์แตง
4. เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมระหว่างวิธี GOT และเทคนิค SSLP

การตรวจเอกสาร

แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) จัดอยู่ในวงศ์แตง (Family Cucurbitaceae) ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกันกับ แตงแคนตาลูป แตงโม ฟักทอง มะระและบวบต่างๆ แตงกวามีถิ่นกำเนิดมาจากทางตอนใต้ของเทือกเขาหิมาลัย ประเทศอินเดีย แตงกวาอยู่ในกลุ่มไม้เนื้ออ่อน เป็นพืชล้มลุก (annual crop) และเป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติโดยอาศัยลมและแมลง ลำต้นอวบน้ำ มีผิวขรุขระ เป็นเถาเลื้อย มีมือเกาะช่วยพยุงลำต้น มีระบบรากแบบรากแก้ว (tap root system) ขอบใบหยักมีห้าเหลี่ยม ส่วนกลางของใบจะกว้างที่สุด มีขนปกคลุมผิวใบ ลักษณะการออกดอกเป็นแบบ day neutral คือสามารถออกดอกได้ทั้งในสภาพวันสั้นและวันยาว สามารถเจริญเติบโตปรับตัวได้ดีทุกสภาพละติจูด ดอกแตงกวาส่วนใหญ่จะมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันแต่อยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious) เช่น สายพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์จากสหรัฐอเมริกา ส่วนพันธุ์ที่ใช้สำหรับดองดอกตัวเมียส่วนใหญ่จะเจริญเป็นดอกเดี่ยว (gynoecious) มีเกสรตัวผู้ที่ไม่สมบูรณ์ ลักษณะดอกของแตงกวาเป็นดอกขนาดใหญ่สีเหลือง ทรงระฆัง กลีบดอกสีเหลืองมีจำนวนห้ากลีบ ผลเป็นแบบ pepo ลักษณะกลมยาวหรือเป็นเหลี่ยม ขนาด รูปร่าง สี ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยทั่วไปผลเมื่อยังอ่อนจะมีสีเขียวเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือขาว แตงกวาสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินทุกประเภท โดยเฉพาะในสภาพดินร่วนปนทรายที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดิน pH ระหว่าง 5.5-7.2 สภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส แตงกวาต้องการสภาพความชื้นสัมพัทธ์ค่อนข้างต่ำ เพื่อลดปัญหาการเกิดโรค (จานุลักษณ์, 2541) การผสมเกสรอาศัยแมลงเป็นส่วนใหญ่ จัดอยู่ในพวก Highly cross pollinated crop (Briggs and Knowles, 1967) แตงกวาสามารถจำแนกได้ตามการใช้ประโยชน์ได้ 2 ชนิดคือ แตงกวาใช้รับประทานผลสด และแตงกวาสำหรับใช้ดอง (สุเทวี, 2522) สำหรับการศึกษาด้านพันธุกรรม แตงกวามีจำนวนโครโมโซม $2n=14$ มีปริมาณดีเอ็นเอต่อหนึ่งจีโนมเท่ากับ 1.78 pg (Libner, 1989; Kallo, 1993; Kinet, 1997; Ramachandran, 1984)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด **Microsatellite**

Microsatellite หรือ simple sequence repeats (SSRs) เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำซ้อน (Repetitive DNA) ชนิดหนึ่งที่มีลำดับเบสซ้ำกันอย่างต่อเนื่อง (tamdem repeat) เป็นสายสั้นๆเรียงต่อกันตั้งแต่ขนาด 1-6 เบส เช่น (G) $_n$, (GA) $_n$, (GAA) $_n$ เมื่อ n คือจำนวนซ้ำ พบว่า SSRs มีความถี่และกระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนมของพืชมะเขือเทศ (Hamanda *et al.*, 1982) พบได้ทั้งในส่วน coding region และ non-coding region ในสิ่งมีชีวิตพืชมะเขือเทศพบว่ามี SSR loci 10^4 to 10^5 loci กระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนม ความแปรปรวนของ SSRs เกิดขึ้นเนื่องจากความผิดพลาดระหว่างจำลองดีเอ็นเอสายใหม่ ที่เรียกว่า slipped strand mispairing หรือ unequal crossing over (Tautz *et al.*, 1986; Levinsen and Gutman, 1987) SSRs เป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนสูง ทำให้สามารถตรวจพบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ง่าย โดยอาศัยหลักการของ PCR (Saiki *et al.*, 1985) ออกแบบไพรเมอร์ขนาบข้างบริเวณ SSRs (Litt and Luty, 1989; Weber and May, 1989) และตรวจสอบผลโดยแยกความแตกต่างของขนาดอัลลีลแต่ละตำแหน่งด้วยวิธี electrophoresis ซึ่งหลักการนี้เรียกว่า Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite สามารถนำไปใช้เป็นตัวติดตามโดยใช้เทคนิค Hybridization แต่พบว่ามีขั้นตอนที่ยุ่งยาก เสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูง ตลอดจนต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมากและต้องเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (ชลธิชา และ จุลภาค, 2541) แต่สำหรับวิธีการ PCR นั้นมีข้อดีคือใช้เวลาเพียง 1-2 วัน วิเคราะห์ผลได้ง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย จึงนิยมใช้เทคนิค SSLP กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน

Microsatellite เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง Homozygous และ Heterozygous ได้ มีความสามารถในการแยกความแตกต่างได้สูงกว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดอื่น มีความเสถียรสูง (stability) และทำซ้ำได้ (reproducibility) (Powell *et al.*, 1996b) จึงมีการนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้มาใช้ศึกษาในทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้ในการทำแผนที่โครโมโซม (Winter *et al.*, 1999), การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต การจำแนกสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต (Marette *et al.*, 2002; Kisuki and Isagi 2002)

ชนิดของ Microsatellite ดีเอ็นเอ

Microsatellite ดีเอ็นเอประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำแตกต่างกันคือลำดับเบสซ้ำแบบ Dinucleotide repeat ประกอบด้วยเบสซ้ำ 2 เบส เช่น (GA)_n, Trinucleotide repeat ประกอบด้วยเบสซ้ำ 3 เบส เช่น (GAA)_n, Tetranucleotide repeat ประกอบด้วยเบสซ้ำ 4 เบส เช่น (GAAA)_n, และ Pentanucleotide repeat ประกอบด้วยเบสซ้ำ 5 เบส เช่น (GAATA)_n

รูปแบบของลำดับเบสซ้ำใน microsatellite ดีเอ็นเอสามารถจำแนกได้ 3 ประเภท (Weber, 1990) คือ Perfect repeat, Compound repeat และ Imperfect repeat or Interrupted repeat โดยที่ Perfect repeat เป็น microsatellite ดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำชนิดเดียวเรียงตัวต่อกันเรื่อยๆ ตัวอย่างเช่น GAGAGAGAGAGA ส่วน Compound repeat เป็น microsatellite ดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำหลายชนิดเรียงติดต่อกัน เช่น GAGAGACTCTCTCT และ Imperfect or Interrupted repeat เป็น microsatellite ดีเอ็นเอที่มีเบสอื่นแทรกเข้ามาในลำดับเบสซ้ำใน Perfect repeat ตัวอย่างเช่น GAGAGATGAGAGA

ความแปรปรวนของ Microsatellite ดีเอ็นเอ

Microsatellite ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง โดยเกิดขึ้นจากความแตกต่างของจำนวนซ้ำของลำดับเบสซ้ำ ซึ่งความแปรปรวนของ microsatellite ดีเอ็นเอเกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการสอดแทรกของลำดับเบสซ้ำ (insertion) ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการเข้าสู่ผิดตำแหน่งของลำดับเบส (slipped-strand mispairing) ในขณะที่มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA replication) นอกจากนี้ ขบวนการ unequal crossing over ก็เป็นขบวนการหนึ่งที่ทำให้ microsatellite ดีเอ็นเอมีแปรปรวน (Tautz *et al.*, 1986; Levinsen and Gutman, 1987)

Wang *et al.* (1994) พบว่าในพืชมีความแปรปรวนของ microsatellite ดีเอ็นเอที่มีความยาวของจำนวนเบสซ้ำมากกว่า 20 เบส เกิดขึ้นทุกๆ 33 กิโลเบสและในสัตว์จะเกิดขึ้นทุกๆ 6 กิโลเบส สำหรับ Langencrantz *et al.* (1993) ได้ศึกษาโดยการคัดเลือกรากฐานข้อมูล (data base screening) พบว่าในมนุษย์มี microsatellite ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ (CA/GT)_n กระจายตัวอยู่ทั่วไปและในพืชพบลำดับเบสซ้ำแบบ (AT/TA)_n และ (CT/GA)_n มีความถี่ในการกระจายตัวมาก ขณะที่ในสัตว์

พบ Microsatellite ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ (CT/GA)_n (Primmer *et al.*, 1997) ในกรณีของการศึกษาจาก genomic libraries ในพืชหลายชนิด พบว่า dinucleotide repeats แบบ (CT/GA)_n และ (CA/GT)_n มีความถี่ของการกระจายตัวมากกว่าลำดับเบสซ้ำแบบ (AT/TA)_n และ (GC/CG)_n (Langencrantz *et al.*, 1993; Bell and Ecker, 1994)

การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite

การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite โดยทั่วไป (Powell *et al.*, 1996a; Zane *et al.*, 2002) ประกอบด้วย

1. การสืบค้นข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่มีอยู่
2. การสร้าง Genomic libraries แบบดั้งเดิม
3. การสร้าง Enriched genomic libraries

การสืบค้นข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่มีอยู่ เป็นวิธีการที่สามารถพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายได้อย่างรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย ซึ่งส่วนใหญ่มักจะพัฒนาในพืชที่มีการศึกษาทางข้อมูลทางพันธุกรรมมากแล้ว เช่น ในข้าวโพด มะเขือเทศ ข้าว และ Arabidopsis เป็นต้น ซึ่งวิธีการนี้สามารถเข้าสืบค้นหาลำดับเบสที่เป็น microsatellite จากฐานข้อมูล EMBL และ GenBank จากนั้นออกแบบไพรเมอร์และทดสอบไพรเมอร์ที่พัฒนาได้

การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ด้วยวิธีการสร้าง genomic libraries แบบดั้งเดิมโดยทั่วไปประกอบด้วย การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำใน libraries โดยวิธีการ hybridization กับตัวตรวจสอบชนิดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสซ้ำ จากนั้นทำการหาลำดับเบส ออกแบบคู่ไพรเมอร์และทดสอบไพรเมอร์ แต่พบว่าวิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในพืชได้ต่ำคือประมาณ 0.059-5.8 % หรือโดยเฉลี่ย 2.3% (Zane *et al.*, 2002) (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1)

ในขณะที่การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ด้วยวิธีการที่เรียกว่า enriched genomic libraries เป็นวิธีการที่ใช้หลักการคัดเลือกชิ้นส่วน microsatellite ดีเอ็นเอด้วยการใช้โพรบ

ที่ติดฉลากด้วย Biotin ก่อนการสร้าง libraries และใช้โพรบตรวจสอบด้วยการ hybridization อีกครั้งหลังจากการสร้าง libraries (ภาพที่ 2) ซึ่งมีวิธีประกอบด้วย การตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแล้วเชื่อมต่อกับ adapter ด้วยเอ็นไซม์ T4 ligase หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR (Mullis, 1990) และแยกสายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว จับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำด้วย โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆซึ่งติดฉลากด้วย Biotin จากนั้นใช้ streptavidin bead หรืออนุภาคเหล็กที่ถูกเคลือบด้วย streptavidin เพื่อใช้เป็นตัวยึดเกาะจำเพาะเจาะจงกับ biotin และใช้แท่งแม่เหล็กดึงอนุภาคเหล็กที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ล้างส่วนประกอบอื่นๆออก นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะมีลำดับเบสซ้ำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์แล้วถ่ายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นเพิ่มปริมาณเซลล์และสกัดพลาสมิด ทำการคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำด้วยวิธี Hybridization จากนั้นทำการหาลำดับเบส ออกแบบไพรเมอร์ และทดสอบไพรเมอร์โดยวิธี PCR และตรวจสอบผลบนเจล electrophoresis ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ด้วยวิธีการนี้มีประสิทธิภาพสูงอยู่ระหว่าง 50%-90% (Butcher *et al.*, 2000)

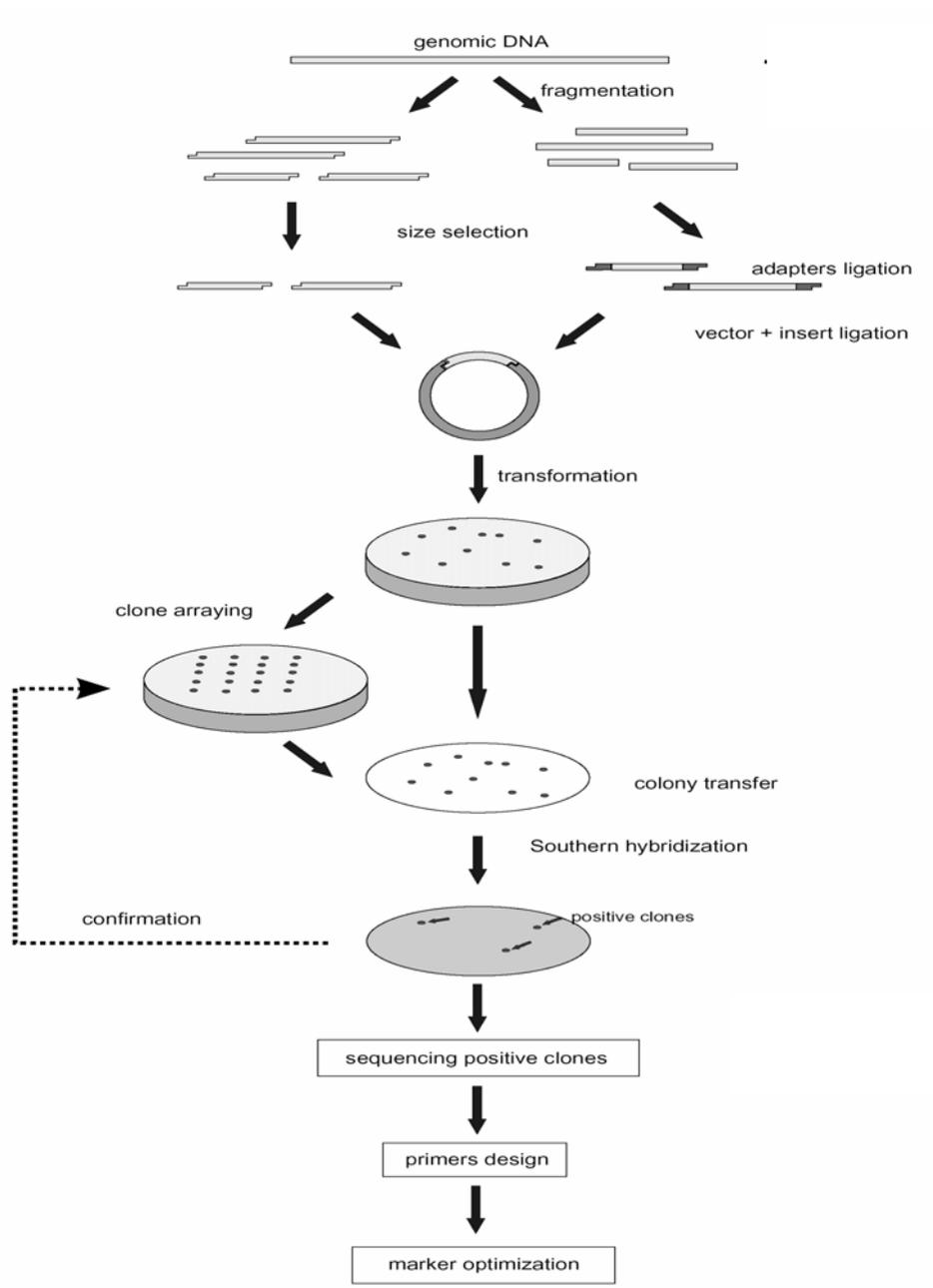
นอกจากนั้นการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite สามารถใช้วิธีการคัดเลือก ลำดับเบสจากฐานข้อมูล ESTs (express sequence tag) หรือจากการสร้าง cDNA library โดยเรียก ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ที่พัฒนาได้จากวิธีการนี้ว่า Genic microsatellite (EST-SSRs) และพบว่ามีการแปรปรวนเกิดขึ้นในบริเวณดีเอ็นเอชนิดนี้น้อยมาก เนื่องจากลำดับเบสบริเวณนี้เป็นบริเวณ coding region ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้ (conserve sequence) แต่ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้มีประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้ในการตรวจสอบจีโนมไทป์ในพืชที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (marker transferability) การศึกษาเปรียบเทียบแผนที่ทางพันธุกรรม (comparative mapping) และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Rajeev *et al.*, 2005)

Zan *et al.* (2002) ได้คำนวณสัดส่วนของจำนวนโคลนที่มี microsatellite ดีเอ็นเอต่อจำนวนโคลนทั้งหมดจากงานศึกษาการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ด้วยวิธีการสร้าง genomic libraries ในพืชและสัตว์จำนวน 170 ผลงานจาก 267 ผลงานที่ตีพิมพ์ระหว่างปี 1999 ถึง 2001 พบว่า เปอร์เซ็นต์การพบลำดับเบสซ้ำในพืชโดยเฉลี่ย 2.3 % (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ Positive clones จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ด้วยวิธี
การสร้าง genomic libraries แบบดั้งเดิม

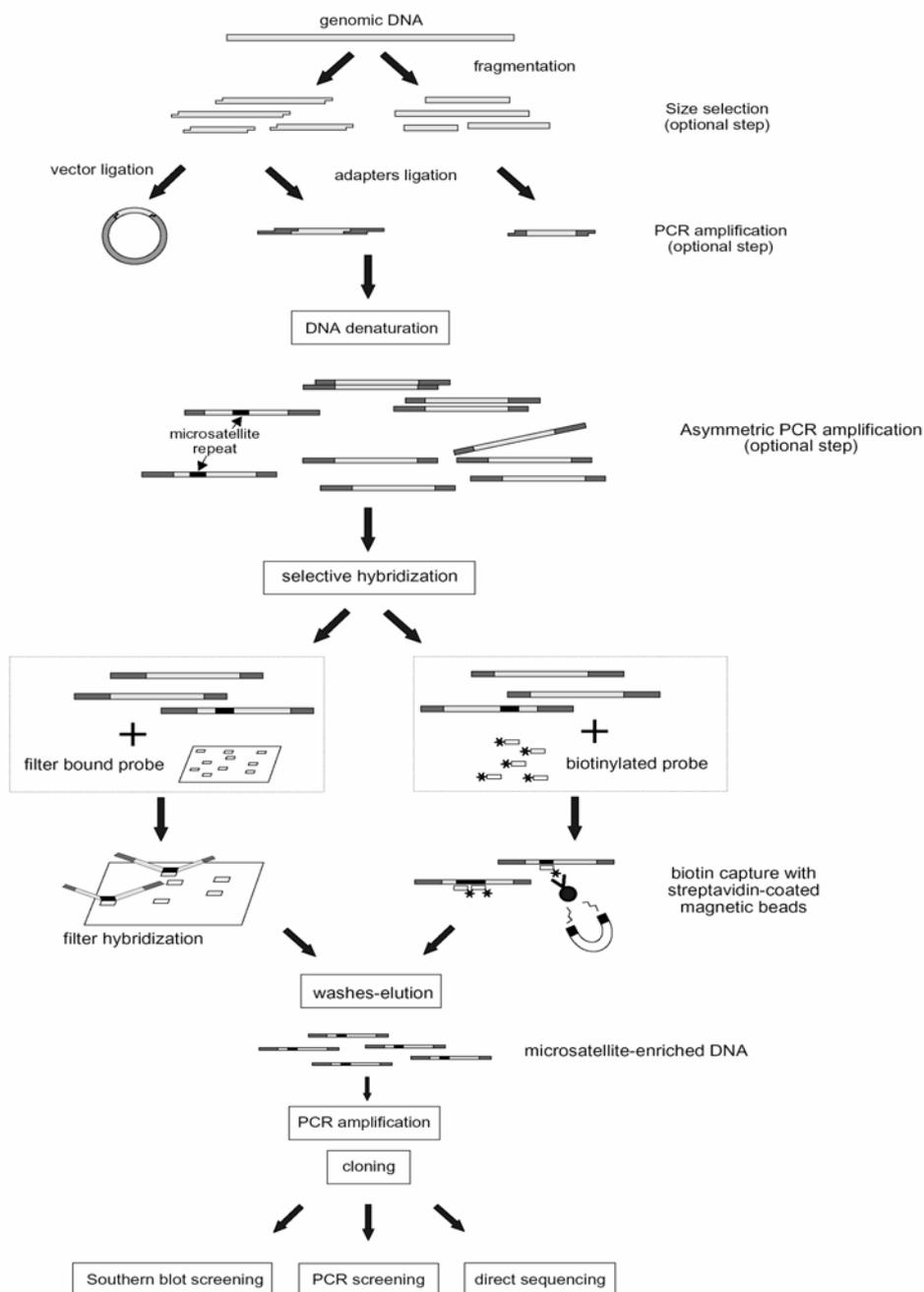
กลุ่มสิ่งมีชีวิต	จำนวนสิ่งมีชีวิต	เปอร์เซ็นต์ positive clones	
		เฉลี่ย	ต่ำสุด-สูงสุด
Amphibians	1	0.4	-
Arthropods	21	2	0.04–12
Crustaceans	3	2.4	0.24–6
Mammals	27	1.67	0.13–4.5
Mollusks	16	1.96	0.1–6.4
Birds	9	0.46	0.025–1.7
Fishes	16	3.1	0.066–8.92
Reptiles	5	1.4	0.2–4
Plants	16	2.3	0.059–5.8

ที่มา: Molecular Ecology primer notes 1999-March 2001



ภาพที่ 1 วิธีและขั้นตอนการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ด้วยวิธีการสร้าง genomic library แบบดั้งเดิม

ที่มา: Zane *et al.* (2002)



ภาพที่ 2 วิธีและขั้นตอนการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ด้วยวิธีการ Enriched genomic library

ที่มา: Zane *et al.* (2002)

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ที่พัฒนาขึ้นจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งสามารถนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมเช่นในวงศ์ (family) หรือ สกุล (genus) เดียวกันได้ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการจะมีลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (conserved sequence) ตามที่มีรายงานไว้ในพืชหลายชนิดดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งประโยชน์ของการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายตรวจสอบข้ามสายพันธุ์จะช่วยให้ดีเอ็นเอเครื่องหมายนั้นมีประสิทธิภาพมากและช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายโดยอาจไม่ต้องพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ขึ้นมาใหม่

ตารางที่ 2 การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์

ชนิดพืช	จำนวนดีเอ็นเอ เครื่องหมาย ที่ใช้ทดสอบ	จำนวนพันธุ์ ที่ใช้ทดสอบ	ความแตกต่าง ทาง Taxonomic	เปอร์เซ็นต์ ความสำเร็จ (%)	ที่มา
<i>Arabidopsis thaliana</i>	30	6	ต่าง genus	66.7	Westman and Kresovich, 1998
<i>Arabidopsis thaliana</i>	30	3	ต่าง. genus	30	van Treuren <i>et al.</i> , 1997
<i>Brassica napus</i>	17	2	Genus เดียวกัน	76.5	Szewc-McFadden <i>et al.</i> , 1996
<i>Cucumis melo</i>	7	8	ต่าง Genus	71.4	Katzir <i>et al.</i> , 1996
<i>Cucumis sativus</i>	10	11	Genus เดียวกัน	40	Danin-Poleg <i>et al.</i> , 2001
<i>Glycine max</i>	31	9	3 Genus เดียวกัน	57	Peakall <i>et al.</i> , 1998
			6 ต่าง. genus	10.3	
<i>Lycopersicum esculentum</i>	44	6	4 Genus เดียวกัน	88.6	Smulder <i>et al.</i> , 1997
			2 ต่าง Genus	28.4	
<i>Oryza sativa</i>	8	4	Genus เดียวกัน	90.6	Wu and tanksley, 1993
<i>Vitis vinifera</i>	16	3	1 Genus เดียวกัน	62.5	Scott <i>et al.</i> , 2000
			2 ต่าง. genus	15.6	
<i>Zea mays</i>	67	1	ต่าง Genus	64.2	Brown <i>et al.</i> , 1996

วิธีการตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยปฏิกิริยา PCR และ Electrophoresis

การวิเคราะห์ความหลากหลายของจำนวนเบสซ้ำของ microsatellite ดีเอ็นเอสามารถใช้เทคนิค PCR (Mullis, 1990) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง microsatellite โดยจะต้องทราบลำดับเบสที่ขนาบข้างส่วนที่เป็น microsatellite (flanking region) ในตำแหน่งนั้นก่อน เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสที่ขนาบข้าง microsatellite ดีเอ็นเอ จากนั้นสามารถตรวจดูความหลากหลายของ microsatellite ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยเทคนิค electrophoresis และ silver staining (Weber and May, 1989) ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism)

หลักการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบควรมีค่า GC content ในไพรเมอร์แต่ละเส้น ทั้ง forward และ reverse primer ไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีเบส G หรือ C ตัวใดตัวหนึ่งเป็นอย่างน้อยที่ปลาย 3'-OH ของไพรเมอร์ และจะต้องไม่มีลำดับเบสที่สามารถเข้าคู่กันเองระหว่างคู่ไพรเมอร์ (primer dimer) ได้ (Saiki *et al.*, 1985) สำหรับความยาวของไพรเมอร์แต่ละเส้นควรมีจำนวนเบสประมาณ 18-22 คู่เบส และควรออกแบบให้สามารถได้ PCR product ขนาดประมาณ 100-300 คู่เบส นอกจากนี้ถ้าเป็นไปได้ตำแหน่งของไพรเมอร์ไม่ควรอยู่ชิดกับลำดับเบสซ้ำ (ส่วนที่เป็น microsatellite ดีเอ็นเอ) มากเพื่อหลีกเลี่ยงโอกาสของการเกิดการ mutation ในบริเวณลำดับเบสซ้ำและไม่ควรอยู่ไกลจากลำดับเบสซ้ำมากเกินไปเนื่องจากจะทำให้ได้ขนาดของ PCR product ที่มีขนาดใหญ่เกินไปซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความแม่นยำในการแยกขนาดด้วย acrylamide นอกจากนี้ควรเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีค่า Tm (Melting temperature) ที่ใกล้เคียงกันเนื่องจากค่า Tm จะถูกนำไปใช้ในการคำนวณหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยา PCR ซึ่งจะมีค่าต่ำกว่าค่า Tm ประมาณ 5 องศาเซลเซียส (Morris *et al.*, 1996; McCouch *et al.*, 1997)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องหมายโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค PCR ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ.1983 หลักการทำงานของเทคนิค PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณสูงขึ้นเป็นทวีคูณ โดยเรียนแบบจากขบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ด้วยการใส่คู่ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณขนาบข้างของบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณร่วมกับบัฟเฟอร์

(PCR buffer) คือออกซิโรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด และแมกนีเซียมคลอไรด์ ในหลอดทดลอง และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ ซึ่งแบ่งระดับการควบคุมอุณหภูมิเป็นรอบๆ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation

เป็นการใช้ความร้อนแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing

เป็นการลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับเบสคู่สมบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับลำดับเบสของไพรเมอร์)

3. Extension

เป็นการเติมเบสสังเคราะห์จากบริเวณ 5' ไป 3' ต่อจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เป็นตัวกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ

การตรวจสอบผลโดยวิธี Electrophoresis

วิธี Electrophoresis เป็นวิธีการแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีนหรือดีเอ็นเอตามขนาดรูปร่างหรือประจุของโมเลกุลที่ต้องการวิเคราะห์ โดยการเคลื่อนที่ผ่านสารละลายและตัวกลางในสนามไฟฟ้า สารตัวกลางที่นิยมใช้ในการแยกขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอคือ อะกาโรสเจล (agarose gel) และโพลีอคริลลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) โดยที่อะกาโรสมีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 100-50,000 คู่เบส ส่วนอะคริลลาไมด์เจลสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 6-1,000 คู่เบส แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเจลที่ใช้ โดยเจลที่มีความเข้มข้นสูงสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้ดี (สุรินทร์, 2545)

repeats) ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบในสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์หรือดิพลอยด์ได้ ภายใต้สมมติฐานว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งต้องมีการกระจายตัวอย่างอิสระ (no linkage)

การจำแนกพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite

Struss and Plieske (1998) แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite สามารถจำแนกความแตกต่างระดับจีโนไทป์ในข้าวบาร์เลย์ได้ดี โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 15 ตำแหน่ง จำแนกข้าวบาร์เลย์ในเยอรมันจำนวน 163 จีโนไทป์ ซึ่งมีค่า PIC ระหว่าง 0.3-0.86 จำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 5-15 อัลลีลต่อตำแหน่ง และ Karakousis *et al.* (2003) ได้ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 130 ตำแหน่ง จำแนกข้าวบาร์เลย์ในออสเตรเลีย 2 ชุด จำนวน 58 จีโนไทป์ ซึ่งสามารถใช้จำแนกได้ดีและพบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 36 ตำแหน่งที่มีค่า PIC สูงสามารถนำไปใช้ในการงานปรับปรุงพันธุ์ ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมได้

Ghislain *et al.* (1999) ได้ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 70 ตำแหน่ง จำแนกพันธุ์มันฝรั่ง (*Solanum spp.*) จำนวน 73 accessions ที่ได้คัดเลือกมาจากศูนย์วิจัยมันฝรั่งนานาชาติ International Potato Center (CIP) พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างระดับจีโนไทป์ได้ ซึ่งการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite สามารถช่วยในการจำแนกพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ลดปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถจำแนกลักษณะทางฟีโนไทป์ได้ ช่วยในระบบการจัดการรวบรวมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ (Seed purity test)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ในขบวนการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ประกอบด้วยการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางลักษณะกายภาพ (Physical purity test) และความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (Genetic purity test)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางกายภาพ (Physical purity test) เป็นการตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ (Working sample) ที่ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นตัวแทนของ seed lot โดยการคัดแยกและจำแนกสิ่งเจือปนออกเป็น pure seed, other seed และ inert matter โดยรายงานผลการทดสอบเป็น

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเมล็ดพันธุ์จะต้องมีเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ตามที่พระราชบัญญัติเมล็ดพันธุ์พืช ปี 2541 ได้กำหนดไว้ คือต้องมีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแตงกวา

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (Genetic purity test) สามารถตรวจสอบโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological character) การใช้เครื่องหมายทางชีวเคมี (Biochemical marker) และดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ในการตรวจสอบ โดยเป็นการตรวจสอบว่าเมล็ดพันธุ์มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบใด เช่น เป็นลูกผสม เป็นต้น off type หรือเป็นต้นผสมตัวเอง (self) ซึ่งการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งเพราะเป็นสิ่งแสดงให้เห็นลักษณะประจำพันธุ์ของพันธุ์นั้นๆ เป็นการยืนยันว่าเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้นั้นมีความตรงต่อสายพันธุ์ ได้มาตรฐานตามที่ตั้งไว้หรือไม่ เป็นการสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้ซื้อว่าจะได้รับพันธุ์ที่ถูกต้องและสร้างความน่าเชื่อถือให้กับผู้ขาย

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

วิธีการโดยทั่วไปที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์คือการประเมินจากลักษณะสัณฐานวิทยาหรือการแสดงออกทางสรีระวิทยาของเมล็ดพันธุ์ ต้นกล้าและต้นพืชที่เจริญเต็มที่ โดยการสำรวจลักษณะของเมล็ดพันธุ์และสำรวจในแปลงปลูกซึ่งบ่อยครั้งจะให้ผลการตรวจสอบที่ไม่ค่อยถูกต้องและแม่นยำเนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการพัฒนาการของต้นพืชมีผลทำให้การแสดงออกของลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาเปลี่ยนแปลงไป และนอกจากนั้นวิธีการนี้ใช้ระยะเวลาในการปลูกและใช้แรงงานจำนวนมากและเหตุผลหนึ่งที่บริษัทเมล็ดพันธุ์ต่างๆยังคงใช้วิธีการนี้เนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนครั้งแรกต่ำ เนื่องจากไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการสร้างห้องปฏิบัติการและการจ้างผู้เชี่ยวชาญในห้องปฏิบัติการ (McDonald, 1995)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางชีวโมเลกุล

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ถูกผสมด้วยการใช้ isozyme เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดพันธุ์และในเนื้อเยื่อพืชซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแสดงออกของยีน isozyme เป็นเครื่องหมายทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่ยกนำมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมและ isozyme ได้ถูกนำมาใช้เป็นมาตรฐานหรือเกณฑ์ในการตรวจสอบ

ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของ International Seed Testing Association (ISTA) และได้บรรยายไว้ในหนังสือ Association of Seed Analysis's Cultiar Purity testing Handbook (1991) (Della Vecchia *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วย isozyme มีข้อจำกัด เนื่องจากโปรตีนเป็นผลจากการแสดงออกของยีนดังนั้นสภาพแวดล้อมและสภาพในเนื้อเยื่อของพืชมีผลต่อการแสดงออก ทำให้ผลการตรวจสอบมีความผิดพลาดได้บ้าง นอกจากนี้ isozyme สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชได้ต่ำเนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของความหลากหลายของโปรตีน (Walter *et al.*, 1989)

ในประเทศบราซิล พบว่าการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ได้ใช้ isozyme ตรวจสอบ แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พืชในบางชนิด โดยเฉพาะในพืชผักและไม้ดอกพบว่ามีความแตกต่างของ isozyme หรือโปรตีนระหว่างพ่อแม่น้อยมาก สำหรับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD นั้นได้รับความนิยมในการนำมาใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเป็นเทคนิคใหม่ที่ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญมากแต่พบว่ายังคงมีต้นทุนค่าใช้จ่ายที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ isozyme (Della Vecchia *et al.*, 1998)

Burg and Van den Berg (1996) พบว่าสามารถใช้ isozyme หรือ วิธีการ Isoelectric focusing (IEF) ตรวจสอบความเป็นลูกผสมในพืชผักที่สำคัญ เช่น เมล่อน มะเขือเทศ พริก แดงโม แดงกวา ผักกวางศกะหล่ำได้ และพบว่าแรงงาน 1 คนสามารถตรวจสอบได้มากถึง 1,536 เมล็ดต่อวัน โดยมีค่าใช้จ่ายประมาณ 4.40 บาท (+0.11US\$) ต่อตัวอย่าง 1 เมล็ด โดยเป็นต้นทุนค่าสารเคมี วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้ในเทคนิค electrophoresis และ Wang *et al.* (2001) สามารถใช้เทคนิค UTIEF (ultra thin layer isoelectric focusing) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในข้าวได้ดี

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการจำแนกและตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากดีเอ็นเอไม่ว่าจะอยู่ส่วนไหนของต้นพืชก็ไม่เปลี่ยนแปลงการวิเคราะห์สามารถตรวจสอบได้ทุกเวลา โดยสิ่งแวดล้อมภายนอกไม่มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลง

Zhang *et al.* (1997) ได้ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของต้นกล้าพันธุ์พิทูเนีย (*Petunia hybrida* Vilm) และเมล็ดพันธุ์ cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) พบว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว

Phillip *et al.* (2000) ได้ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD ในการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในกะหล่ำ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) ลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 241 ต้นโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ สามารถตรวจพบต้นที่ผสมตัวเอง (self-pollination or sib) ผสมอยู่ใน seed sample และเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วย GOT และ isozyme พบว่า RAPD มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์กะหล่ำลูกผสมพันธุ์การค้าได้ดี

Ashok and Parkhi (2005) ได้ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD, ISSR และ SSR ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพ่อแม่พันธุ์ฝ้ายลูกผสมและใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในฝ้ายลูกผสมได้ ซึ่งใช้ระยะเวลาสั้นและน่าเชื่อถือ

Yashitola *et al.* (2002) ได้ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด ISSR และ SSR ตรวจสอบความเป็นลูกผสมและเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยใช้ดีเอ็นเอจากต้นกล้าข้าวอายุ 6 วัน มาทำการตรวจสอบ พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในข้าวลูกผสม

Smith and Register (1998) ได้เขียนบทความเกี่ยวกับวิสัยทัศน์ของบริษัทเมล็ดพันธุ์ที่มีต่อการใช้เทคโนโลยีในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม ซึ่งกล่าวไว้ว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมได้รับความนิยมในสมัยก่อน แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่ยาวนาน โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องทดสอบซ้ำ มีค่าใช้จ่ายสูงและไม่น่าเชื่อถือ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางครั้งไม่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเกี่ยวกับลักษณะที่จำเพาะเช่น ลักษณะด้านคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การต้านทานต่อโรคหรือต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช ส่วนการใช้เครื่องหมายทางชีวเคมี เช่น isozyme สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์พืชหลายชนิดได้ ซึ่งในข้าวโพดได้ใช้ isozyme มานานกว่า 20 ปี สำหรับเทคโนโลยีดีเอ็นเอเครื่องหมาย PCR based เช่น RAPD และ SSLP มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์และมีความรวดเร็วมากกว่า isozyme และการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอเครื่องหมายก็ไม่สามารถนำมาใช้แทน isozyme ได้ในกรณีที่ต้องทดสอบเมล็ดพันธุ์ใน

ปริมาณมาก ๆ เนื่องจากการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายจะมีค่าใช้จ่ายสูง แต่ถ้าหากมีการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายโดยทำให้สามารถตรวจสอบได้ครั้งละจำนวนมาก ๆ และรวดเร็ว เช่น การใช้เครื่อง Automate DNA sequencer, micro-array และ สนิปส์ (Single nucleotide polymorphism: SNP) ก็อาจจะนำมาใช้ทดแทน isozyme ได้ นอกจากนั้น Smith and Register กล่าวว่า ต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพด (*Zea mays* L.) ด้วยเทคนิค IEF ในปี 1998 มีค่าประมาณ 2 บาทต่อตัวอย่าง (0.05US\$) ส่วนเทคนิค RAPD และ SSLP มีความรวดเร็วและมีต้นทุนที่ต่ำกว่า RFLP คือมีต้นทุนประมาณ 0.2 US\$ ขณะที่ RFLP มีต้นทุนประมาณ 1-2 US\$

ดีเอ็นเอเครื่องหมายทางชีวเคมีและดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในพืชวงศ์แตง

มีการสร้างเครื่องหมายทางชีวเคมีและดีเอ็นเอเครื่องหมาย เช่น isozyme, RAPD, และ RFLP ในแตงกวา โดย Dijkhuizen *et al.* (1996) และ Serquen *et al.* (1997) ซึ่งพบว่าเครื่องหมายทางชีวเคมีและดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้มีข้อจำกัดสำหรับการนำไปใช้เป็นเครื่องหมายช่วยการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้น Katzir *et al.* (1996) ได้พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแตงกวา (*cucumis sativus* L.) ในฟักทองและแตงโม (*Cucurbita and Citrullus*) ขึ้น โดยสามารถพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ได้จำนวน 20 ตำแหน่งและดีเอ็นเอเครื่องหมาย 12 ตำแหน่ง (60%) แสดงจำนวนอัลลีล 2-5 อัลลีลต่อตำแหน่ง โดยมีดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ของแตงกวาเพียง 7 ตำแหน่ง ซึ่งไม่เพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมแตงกวา จากนั้น Danin-Poleg *et al.* (2001) ได้พัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแตงกวาและเมลอนด้วยวิธีการโดยทั่วไปแบบดั้งเดิม คือการสร้าง genomic library ในเมลอนและสร้าง cDNA library ในแตงกวาและได้คัดเลือกจากลำดับเบสที่มี microsatellite ดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล ได้จำนวน 61 ตำแหน่ง และใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแตงกวาจำนวน 10 ตำแหน่ง และในเมลอน 30 ตำแหน่ง พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างระดับจีโนไทป์ได้เป็นอย่างดีและยังสามารถใช้ในการตรวจสอบข้ามชนิดระหว่างแตงกวาและเมลอนได้ นอกจากนั้นได้เปรียบเทียบลำดับเบสของ PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งในแตงกวาและเมลอนด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ดีเอ็นเอ 5 ตำแหน่ง พบว่าแตงกวาและเมลอนมีลำดับเบสที่เหมือนกันสูงมาก (highly conserved) ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากการเกิด mutation แบบ insertion ในบริเวณ 5 ตำแหน่งที่ทำการศึกษา

Patricia *et al.* (2004) พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในเมลอนด้วยวิธีการ enrichment genomic library เพื่อใช้ศึกษาพันธุกรรมของเมลอน พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 65 ตำแหน่งแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เมลอนและสามารถใช้ศึกษาพันธุกรรมในเมลอน เช่นศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic distant) ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (identity test) และสามารถใช้อำนาจความแตกต่างระดับจีโนมไทป์ในแตงกวา, แตงโมและฟักทองได้ ซึ่งทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ขึ้นใหม่

แนวความคิดและทฤษฎีทางเศรษฐศาสตร์

ต้นทุนการผลิตระยะสั้น (Short run cost)

ต้นทุนการผลิต หมายถึง ต้นทุนของปัจจัยการผลิตทั้งหมดที่ใช้ในการประกอบธุรกิจหรือการทำฟาร์ม ซึ่งสามารถจำแนกออกเป็นสองชนิด คือ ต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปร

ต้นทุนคงที่ทั้งหมด (Total fixed cost; TFC) คือ ต้นทุนหรือค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการผลิตที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามปริมาณการผลิตระยะสั้น ไม่ว่าผู้ผลิตจะผลิตเป็นปริมาณมากน้อยเท่าใดก็ตามผู้ผลิตจะเสียต้นทุนการผลิตคงที่ ได้แก่ เงินเดือนประจำ ค่าเช่าที่ดิน ค่าเสื่อมราคาของเครื่องมือและอุปกรณ์และค่าเสียโอกาสของเงินลงทุน (Opportunity cost) ซึ่งต้นทุนเหล่านี้จะจ่ายเป็นรายเดือนหรือรายปี ซึ่งมีรายละเอียดเพิ่มเติมดังนี้

ค่าใช้ที่ดินหากเป็นที่ดินของตนเอง คิดจากค่าเช่าเป็นค่าเสียโอกาส (Opportunity cost) ในการใช้ที่ดิน

ค่าเสื่อมราคา (Depreciation cost) หมายถึง ทรัพย์สินหรือเครื่องมืออุปกรณ์ที่มีอายุการใช้งานได้นานหลายปี (Durable goods) เช่น เครื่องซักรีด เครื่อง PCR ฯลฯ ซึ่งมูลค่าและราคาจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพอันเนื่องมาจากการใช้แล้วสึกหรอ ซึ่งส่วนมากเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานและเป็นเครื่องมือถาวร โดยทั่วไปมักจะคิดเป็นค่าเสื่อมราคาเป็นต้นทุนคงที่ต่อหนึ่งหน่วยเวลา สามารถคำนวณได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมโดยทั่วไปคือการคิดค่าเสื่อมราคาโดยวิธีแบบเส้นตรง (Straight-line method)

$$\text{ค่าเสื่อมราคา/หน่วยเวลา} = (\text{ราคาซื้อ} - \text{มูลค่าซาก}) / \text{ระยะเวลาที่คาดว่าจะใช้งาน (หน่วยเวลา)}$$

ต้นทุนผันแปรทั้งหมด (Total variable cost; TVC) คือต้นทุนการผลิตหรือค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการผลิตที่เปลี่ยนแปลงตามปริมาณการผลิต ในทางด้านการเกษตร องค์ประกอบของต้นทุนเหล่านี้ ได้แก่ ค่าเมล็ดพันธุ์หรือต้นพันธุ์ ค่าวัสดุเพาะกล้า ค่ากระบะปลูก ค่าปุ๋ย ค่าสารเคมี ค่าน้ำมัน ค่าแรงงานจ้าง (hired labor) ค่าจ้าง ค่าซ่อมแซมเครื่องมือและอุปกรณ์และค่าเสียโอกาสของปัจจัยการผลิต (opportunity cost of factor) ในทางด้านห้องปฏิบัติการ องค์ประกอบของต้นทุนเหล่านี้ ได้แก่

ค่าวัสดุและอุปกรณ์สิ้นเปลือง ค่าสารเคมีต่างๆ ค่าแรงงาน ค่าจ้าง ค่าซ่อมแซมเครื่องมือและอุปกรณ์ และค่าเสียโอกาสของปัจจัยการผลิต (opportunity cost of factor)

ค่าเสียโอกาสของเงินที่ใช้ในการซื้อปัจจัยการผลิต หมายถึง ค่าเสียโอกาสของเงินที่ผู้ผลิตนำไปใช้ซื้อปัจจัยการผลิตที่เจ้าของควรจะได้รับหากนำเงินจำนวนนี้ไปใช้ในการลงทุนอย่างอื่น ๆ เช่น ฝากธนาคาร

นอกจากคำนวณต้นทุนจะแบ่งเป็นต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปรแล้ว ยังสามารถพิจารณาเป็นต้นทุนที่เป็นตัวเงินและต้นทุนที่ไม่เป็นตัวเงิน

ต้นทุนที่เป็นเงินสด (Cash cost) หมายถึง ต้นทุนที่ผู้ผลิตจ่ายออกไปจริงในรูปเป็นเงินสด ได้แก่ ค่าปัจจัยการผลิตต่างๆ เช่น ค่าพันธุ์ ค่าสารเคมี ค่าวัสดุอุปกรณ์ ค่าแรงงานจ้าง และค่าซ่อมแซมวัสดุอุปกรณ์

ต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด (Non-cash cost) หมายถึง ต้นทุนที่ผู้ผลิตไม่ได้จ่ายจริงเป็นเงินสดในการผลิตแต่ถือว่าเป็นส่วนหนึ่งของต้นทุนการผลิต ได้แก่ ค่าแรงงานในครัวเรือน ค่าเสื่อมราคา ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปร

ต้นทุนทั้งหมด (Total cost; TC)

ต้นทุนทั้งหมด ได้จากการรวมต้นทุนคงที่ทั้งหมด (Total fixed cost; TFC) และต้นทุนผันแปรทั้งหมด (Total variable cost; TVC) ทั้งที่เป็นเงินสดและไม่เป็นเงินสดเข้าด้วยกัน ดังแสดงในสมการ

$$TC = TFC + TVC$$

$$TC = \text{ต้นทุนรวมของการผลิตทั้งหมด (บาท/หน่วยการผลิต)}$$

$$TFC = \text{ต้นทุนคงที่ของการผลิตทั้งหมด (บาท/หน่วยการผลิต)}$$

$$TVC = \text{ต้นทุนผันแปรของการผลิตทั้งหมด (บาท/หน่วยการผลิต)}$$

การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิต

การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตเป็นการวิเคราะห์เพื่อประเมินหาหนทางในการลดต้นทุนการผลิตในอนาคต ในกรณีหากมีการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เกิดขึ้นแล้วจะส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตอย่างไร เช่น ราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมีการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงหรือมีวิธีการและขั้นตอนการผลิตที่เปลี่ยนแปลง ปัจจัยเหล่านี้มีผลกระทบต่อต้นทุนที่อาจทำให้เปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางและเป็นข้อมูลสำหรับการตัดสินใจเลือกใช้เทคโนโลยีการผลิตและใช้เป็นแนวทางในการปรับเทคโนโลยีให้เหมาะสม การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการลดต้นทุนการผลิตก็เป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยในการจัดการใช้เทคโนโลยีได้อย่างดี

การศึกษาทางเศรษฐศาสตร์เกี่ยวกับต้นทุนของการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ

Haydn *et al.* (2005) ได้วิเคราะห์ต้นทุนด้านเศรษฐศาสตร์ของการใช้ marker-assisted selection (MAS) หรือดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสาลี โดยทำการออกแบบจำลองสถานการณ์ของการปรับปรุงพันธุ์ด้านประสิทธิภาพทางพันธุกรรมและประสิทธิภาพทางเศรษฐศาสตร์พบว่า MAS ไม่เพียงแต่ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพแต่ยังคงช่วยลดต้นทุนในการปรับปรุงพันธุ์ได้ถึง 40% และข้อมูลทางเศรษฐศาสตร์จะช่วยประกอบการตัดสินใจของนักปรับปรุงพันธุ์ว่าจะเลือกใช้รูปแบบการปรับปรุงพันธุ์แบบใด

Dreher *et al.* (2003) ได้ศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนระหว่างการใช้ marker-assisted selection (MAS) และการใช้การคัดเลือกทางสัญฐานวิทยา (การคัดเลือกแบบดั้งเดิม) ในการคัดเลือกต้นข้าวโพดที่มียีน *opaque2* ในประเทศเม็กซิโก ณ International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) โดยใช้ spreadsheet-based budgeting approach ช่วยในการคำนวณ พบว่า 1.) รายละเอียดงบประมาณมีความจำเป็นที่จะต้องนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต้นทุนของการใช้ MAS และการคัดเลือกแบบดั้งเดิม เพื่อใช้สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ 2.) การเปรียบเทียบต้นทุนต่อหน่วยของทั้งสองวิธีจะช่วยให้เป็นประโยชน์ต่อการตัดสินใจของผู้จัดการงานวิจัยและพบว่ามีปัจจัยอื่นๆ เช่นเวลาที่มีส่วนสำคัญต่อการเลือกวิธีทดสอบ 3.) วิธีการทั้งสองวิธีบางครั้งไม่สามารถทดแทนกันได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับความเป็นจริงของการดำเนินงาน 4.) เมื่อใช้ข้อมูลที่ได้จากการสังเกตจากโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ Spreadsheet-based budgeting approach สามารถช่วยผู้จัดการงานวิจัยที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบและจะช่วยประกอบการตัดสินใจเลือกใช้เทคโนโลยีในอนาคตและ

พบว่าต้นทุนต่อหน่วยของการใช้เซ็นเซอร์เครื่องหมายชนิด microsatellite ในการคัดเลือกต้นข้าวโพด 5,000 ต้นมีค่าประมาณ 76 บาทต่อต้น (1.91US\$: 1US\$=40฿) ขณะที่ใช้การคัดเลือกแบบดั้งเดิมคือ การใช้การคัดเลือกทางฟีโนไทป์ในแปลงปลูกมีค่าประมาณ 190-230 บาทต่อต้น (4.74 US\$-5.74 US\$)

LUFA Augustenberg (เอกสารไม่ได้ตีพิมพ์) แสดงต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในข้าวโพดโดยใช้ isozyme, SSLP และ UTLIEF มีค่าประมาณ 75 บาทต่อตัวอย่าง (1.87 US\$) 20 บาทต่อตัวอย่าง (0.49 US\$) และ 6 บาทต่อตัวอย่าง (0.14 US\$) ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แดงกวา (*Cucumis sativus* L.) จำนวน 8 accessions โดยทำการคัดเลือก จากศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน (Tropical Vegetable Research Center, TVRC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม แดงกวา 6 สายพันธุ์ จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด และแดงกวา 2 สายพันธุ์ จากบริษัทอีสต์เวสต์ซีดี จำกัด (ตารางที่ 4)
2. พืชวงศ์แตงพันธุ์การค้าจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ แคนตาลูป (*Cucumis melo* L.), แดงโม (*Citrullus vulgaris*), ฟักทอง (*Cucurbita spp.*) และมะระ (*Momordica charantia* L.) จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด และบริษัทอีสต์เวสต์ซีดี จำกัด เพื่อใช้ในการตรวจสอบจีโนมไทป์ข้ามสายพันธุ์ (ตารางที่ 4)
3. พ่อและแม่พันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) พันธุ์ CUA, CUB, CUC และ CUD และลูกผสมแตงกวาชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 120 ต้นต่อพันธุ์ จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity testing)

ตารางที่ 3 แสดงว่า 8 accessions, แสดงว่า 8 สายพันธุ์และพีชวงค์แดงพันธุ์การค้าจำนวน 4 ชนิด
ที่ใช้ในการศึกษา

Accession	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา	การศึกษา
CS025	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
CS026	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
CS054	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
CS087	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
CS038	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
CS043	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
CS078	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
CS082	<i>Cucumis sativus</i> L.	TVRC	DNA polymorphism
ทอง 819	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทเจียไต๋	DNA polymorphism
มงกุฎ 002	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทเจียไต๋	DNA polymorphism
มาลัย 759	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทเจียไต๋	DNA polymorphism
อมตะ 1	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทเจียไต๋	DNA polymorphism
อมตะ 2	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทเจียไต๋	DNA polymorphism
นินจา 179	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทเจียไต๋	DNA polymorphism
มินิซี	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทอีสต์เวสต์ซีด	DNA polymorphism
บิกซี	<i>Cucumis sativus</i> L.	บริษัทอีสต์เวสต์ซีด	DNA polymorphism
ปรินเซส 434	<i>Cucumis melo</i> L.	บริษัทเจียไต๋	Cross-amplification
แร็ปเตอร์ 515	<i>Citrullus vulgaris</i>	บริษัทเจียไต๋	Cross-amplification
ศรีเมือง 016	<i>Cucurbita spp.</i>	บริษัทเจียไต๋	Cross-amplification
เขียวหยก 68	<i>Momordica charantia</i> L.	บริษัทอีสต์เวสต์ซีด	Cross-amplification

วิธีการ

การสร้าง Enriched genomic library แดงกวาง

1. การสกัดดีเอ็นเอแดงกวางและพีชวงส์แดง

สกัดดีเอ็นเอจากแดงกวางและพีชวงส์แดงโดยใช้วิธีของ Fulton *et al.* (1995) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1.1 นำใบอ่อนจากส่วนยอดของต้นกล้าแดงกวางอายุประมาณ 7-15 วัน นับจากวันเพาะเมล็ด จำนวน 1-2 ใบ หรือน้ำหนักประมาณ 0.5-1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติริม buffer ซึ่งประกอบด้วย Extraction buffer [0.35M sucrose, 0.1M Tris-base (pH7.5), 5mM EDTA (pH7.5)], Nuclei lysis buffer [0.2M Tris-base, 0.05M EDTA, 2M NaCl, 2% CTAB], 5% Lauryl sarcosine ในอัตราส่วน 2.5:2.5:1 จากนั้นเติม 1% Sodium metabisulfite (NaHSO₄) และ 1% Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) ผสมให้เข้ากัน เติม buffer ปริมาณ 200 μ l บดด้วยสว่านไฟฟ้าจนละเอียด แล้วเติม buffer 550 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 30-60 นาที

1.2 เติม Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาณ 1 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ ประมาณ 5 นาที (หรือ 50-100 ครั้ง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

1.3 ดูดส่วนใสใ้หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนด้วย isopropanol ปริมาณ 1 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ พลิกกลับหลอดเบาๆ จนสังเกตเห็นสายดีเอ็นเอตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

1.4 เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท 70% ethanol ทิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยผึ่งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หรือ อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที

1.5 เติม 1X TE Buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)] ปริมาณ 30 μ l เพื่อละลายดีเอ็นเอ และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนดีเอ็นเอละลายหรือประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ

แยกขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส 0.8% ผ่านสารละลายตัวกลาง 1X TAE buffer จากนั้นตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยการย้อม ethidium bromide โดยเปรียบเทียบขนาดกับโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA 100 ng)

3. การตัดและเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ตัดจีโนมดีเอ็นเอแดงกว่าปริมาณ 500 นาโนกรัม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tru* 9I (Promaga) จำนวน 10 ยูนิต ป่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ 100 pmol *Tru* 9I adapter (5'-GAC GAT GAG TCC TGAG) ด้วย 1 ยูนิต T4 DNA ligase (Promaga, USA) และ 10 mM ATP นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วย dH_2O 10 เท่า เพื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (Enrichment of DNA template)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 50 ng, 1mM dNTP, 1X PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH8.8), 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40], 1.5 mM $MgCl_2$, 10 μ M *Tru* 9I primer และ 1 ยูนิต *Taq* DNA polymerase ในปริมาตรรวม 50 μ l จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งหมด 20 รอบ

5. การดักจับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ

5.1 ดักจับสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำด้วย 0.5 μg biotinylated oligonucleotide [B-(CT)₁₅] โดยเติม B-(CT)₁₅ จำนวน 5.6 μl และ 6X SSC/0.1%SDS จำนวน 44.4 μl ใน PCR product ที่มีปริมาตร 50 μl ปริมาตรรวม 100 μl จากนั้นบ่มในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และค่อยๆลดอุณหภูมิลง 1.5 องศาเซลเซียส ทุก 1 นาที จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงที่ 60 องศาเซลเซียส และบ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.2 เตรียม Dynabeads M-280 Streptavidin ที่เป็นพาราแมกเนติก (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) จำนวน 20 μl โดยล้างด้วย 6X SSC ปริมาตร 200 μl จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นแช่ ด้วย 6X SSC ปริมาตร 200 μl

5.3 เติมดีเอ็นเอที่บ่มไว้ ลงใน Dynabeads M-280 Streptavidin ที่เตรียมไว้ใน ข้อ 5.2 จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าเบาๆทุก 5 นาที) เพื่อให้อนุภาคเหล็กที่ถูกเคลือบด้วย streptavidin เข้ายึดเกาะกับ biotin

5.4 ใช้แท่งแม่เหล็ก [magnetic separation stand (Promega, USA)] ดึงอนุภาคพาราแมกเนติกที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำออกมา

5.5 ล้างส่วนประกอบอื่นๆออกโดยเติม 6X SSC/0.1% SDS ปริมาตร 200 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย 6X SSC/0.1% SDS ปริมาตร 200 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง และล้างด้วย 6X SSC บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง

5.6 เติม 0.1N NaOH ปริมาตร 50 μl และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเติม 1M Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 50 μl จากนั้นดึงเฉพาะส่วนใส นำไปสกัดและทำความสะอาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย Nucleo Spin[®] Extract (Macherey-Nagel) spin column

5.7 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ซึ่งประกอบด้วย, 1mM dNTP, 1X PCR buffer [10mM Tris-HCl (pH8.8), 50mM KCl, 0.08% Nonidet P40], 1.5mM MgCl₂, 10 μM Tru 9I primer และ 1 ยูนิต Taq DNA polymerase ในปริมาตรรวม 50 μl จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย

ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จาก PCR (PCR product) ไปทำความสะอาดโดยใช้ Nucleo Spin[®] Extract (Macherey-Nagel) spin column อีกครั้ง และนำ PCR product ไปใช้สร้าง genomic library

6. การสร้าง Genomic library

เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ชนิดพลาสมิด (pGEM[®]-T Easy Vector System, Promega) ขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ความเข้มข้น 50 µg/µl อัตราส่วน insert:vector คือ 3:1 โดยใน ligation reaction 10 µl ประกอบด้วย p-GEM-T Easy Vector 25 ng, insert 75 ng, 2X Rapid ligation buffer 5 ul และเอนไซม์ T4 ligase 3 ยูนิต/µl จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10B ด้วยวิธี electroporation (Dower *et al.*, 1988) โดยใช้เครื่อง Gene Pulser[™] (BioRad, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้

6.1 นำดีเอ็นเอของพลาสมิดลูกผสม 1 µl และเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH10B 40 µl ใส่ใน cuvette จากนั้นถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยใช้เครื่อง Gene Pulser[™] (BioRad, USA) ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 2.5 KV เป็นเวลาประมาณ 0.5 วินาที

6.2 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สูตร SOC (2% Tryptone, 0.5% Yest extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose) ปริมาตร 1,000 µl และบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.3 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมในอาหารแข็งสูตร LB (Luria-Bertani medium: 1% Tryptone, 0.5% Yest extract, 1% NaCl, 1.5% Agar-agar) ที่ประกอบด้วย 0.1 g/ml ampicillin, 0.2 mM/ml X-Gal และ 0.1 mM/ml IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีด้วยวิธี Blue white colony selection โดยสุ่มเลือกเฉพาะแบคทีเรียโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งจะมีพลาสมิดลูกผสมที่มีดีเอ็นเอของแตงกวาจากนั้นเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 µl

6.4 เพิ่มปริมาณเซลล์โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ บ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

6.5 นำเซลล์ปริมาตร 500 μ l เก็บใน 50% glycerol ปริมาตร 500 μ l ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำเซลล์ที่เหลือปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

7. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอใช้วิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

7.1 นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้จากข้อ 6.5 มาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง สลายผนังเซลล์แบคทีเรียด้วยการเติมสารละลาย Solution I [50 mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM EDTA, 100 ug/ml RnaseA] ปริมาตร 200 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นทำให้ผนังเซลล์แตกด้วยการเติมสารละลาย Solution II [0.2M NaOH, 1% SDS] ปริมาตร 200 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Solution III [1.32M CH_3COOK (pH4.8)] ปริมาตร 200 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาใช้

7.2 เติม Isopropanol ประมาณ 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนใส บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เขย่าให้ให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เท 70%ethanaol ทิ้ง จากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติม TE Buffer pH8 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 μ l และนำพลาสมิดดีเอ็นเอไปคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization

8. การคัดเลือกโคลนที่มี Microsatellite ดีเอ็นเอจาก Enriched genomic library

ทำการคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มี microsatelliteดีเอ็นเอด้วยวิธี Dot Blot hybridization (DIG System, Boehringer Mannheim) โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละโคลนมา

ตรวจสอบโดยวิธี hybridization ด้วยตัวตรวจสอบที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (CT)₁₀ โดยมีขั้นตอนดังนี้

8.1 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละโคลนปริมาณ 1 µl มาหยดลงบนไนลอนเมมเบรน [Hybond-N+ nylon membrane (Amersham, USA)] จากนั้นอบแผ่นไนลอนเมมเบรนให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

8.2 เติมสารละลาย Hybridization solution [20X SSC, 10% Blocking, Lauryl sarcosine, 20% SDS] บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8.3 ต้มสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลาย Hybridization กับ โพรบ (CT)₁₀ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ให้เป็นสายเดี่ยว นำสารละลายแช่ลงในน้ำแข็งเพื่อป้องกันการจับคู่ของสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ จากนั้น Hybridize กับเมมเบรนและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

8.4 ตรวจสอบผลการ hybridize โดยการล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 2X SSC/0.1%SDS โดยเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย 0.5X SSC/0.1%SDS โดยเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง, ล้างด้วย Buffer I และ Malic acid โดยเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 ครั้ง, ล้างด้วย Buffer II โดยเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 ครั้ง, จากนั้นล้างด้วย Buffer II และ anti dig โดยเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 ครั้ง, ล้างด้วย Buffer I และ Tween 20 โดยเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง, ล้างด้วย Buffer I และ Malic acid โดยเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 ครั้ง, ล้างด้วย Buffer III บ่มโดยเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 ครั้ง

8.5 ผสม Buffer III และ BCIP/NBT Phosphates Substrate System (KPL; Kirkegard Perry Laboratories) และเติมลงบนแผ่นเมมเบรน ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจสอบการแสดงผล Dot blot hybridization จากสีที่ปรากฏ

9. การวิเคราะห์ลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอผ่านการคัดเลือกจากวิธีการ Dot Blot Hybridization โดยวิธีการผ่าน column เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับเบส วิธีการสกัดประกอบด้วยขั้นตอนตามข้อ 7.1 และขั้นตอนดังนี้

9.1 เติมสารละลาย Celite [0.44 mM Guanidine HCl, Solution III, 1.5g Celite] ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

9.2 ล้างสารละลายที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอใน Column ด้วยสารละลาย column wash [200mM NaCl, 20mM Tris-HCl(pH7.5), 5mM EDTA (pH7.5), 95% ethanol] ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

9.3 ปั่นเหยียงที่ระดับความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ใช้ส่วนใสที่ไหลผ่าน column จากนั้นเติม TE Buffer pH8 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30 μ l เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9.4 ส่งพลาสมิดดีเอ็นเอไปหาลำดับเบส โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติของบริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

10. การออกแบบไพรเมอร์

นำผลการหาลำดับเบสมาออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ คือ ให้มีขนาดความยาวของไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 20-28 คู่เบส ค่าTm อยู่ระหว่าง 55-65 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ GC content 45-65% โดยใช้การออกแบบจากลำดับเบสที่อยู่บริเวณขนาบข้าง Microsatellite ด้วย การใช้บริการทางเว็บไซต์ของ Gene Fisher <<http://bibiserv.toofak.uni-bielefeld.de/genefisher/>> และ Primer 3 <<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/>> และกรณีโปรแกรมไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ จะใช้การออกแบบด้วยตัวเอง จากนั้นใช้บริการการสังเคราะห์ไพรเมอร์

ที่หน่วยบริการทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ, ประเทศไทย (BIOTEC, Thailand) และบริษัท Bioneer ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

11. การทดสอบไพรเมอร์

11.1 ทำการทดสอบไพรเมอร์ที่พัฒนาได้ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR โดยทดสอบกับดีเอ็นเอแดงกว่า accession CS025 และ CS054 ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอปริมาณ 25 ng, 1mM dNTP, 1X PCR buffer [10mM Tris-HCl (pH8.8), 50mM KCl, 0.08% Nonidet P40], 1.5-3mM MgCl₂, 10 μM forward Primer, 10 μM reverse Primer และ 0.4 ยูนิต *Taq* polymerase ในปริมาตรรวม 20 μl

11.2 สังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (MJ thermocycle PTC100) โดยมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่) เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ

11.3 ตรวจสอบผลด้วยวิธี electrophoresis โดยนำ PCR product มาเติม sequencing dye 10 μl [98% formamide, 0.025% bromphenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 10 mM 0.5 EDTA (pH8.0)] จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Sequi-Gen[®] GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell, BioRad) ใน 4.5% denaturing polyacrylamide gel {4.5% acrylamide gel (acrylamide:bis-acrylamide =19:1), 7.5M urea, 1XTBE buffer [0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA (pH8)]} ผ่านสารละลายตัวกลาง 1X TBE buffer ด้วยกำลังไฟฟ้า 50 วัตต์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 90 นาที แล้วจึงตรวจสอบผลด้วยเทคนิค silver staining โดยนำแผ่นเจลมาแช่และเขย่าเบาๆในสารละลาย 10% acetic acid ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วย dH₂O จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 2 นาที แล้วจึงย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนไตรท์ (0.1% Silver nitrate, 0.05% formaldehyde) ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปผ่าน dH₂O อย่างรวดเร็วและทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอด้วย developer solution (3% sodium carbonate, 0.05% formaldehyde, 0.01% thiosulfate) ที่แช่เย็นจัด จำนวน 2 ลิตร เขย่าแผ่นเจลจนปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาด (dH₂O) ประมาณ 5 นาที ฝั่งให้แห้ง ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (ขนาดอัลลิล) ที่ปรากฏ

11.4 วิเคราะห์ขนาดอัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง โดยเปรียบเทียบกับขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐาน (*PhiX174 /Hinf I* marker) โดยใช้โปรแกรม PhotoCapt version 99.01 (Vilber Lourmat, 1999)

12. การวิเคราะห์ข้อมูล

การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ในแตงกวา

ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ในแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite 57 ตำแหน่ง โดยใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี electrophoresis และ silver staining นั้นแปลงข้อมูลจากภาพ โดยถ้าในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 0 และคำนวณหาขนาดของอัลลีล, จำนวนของอัลลีลและความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง จากนั้นนำข้อมูลมาประเมินค่า Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e) (Nei and Li, 1978), Polymorphism Information Content:(PIC) (Botstein *et al.*, 1980) และค่า Probability of Identity (PI) (Kaul *et al.*, 2001)

13. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายตรวจสอบข้ามชนิดและสกุล (Marker transferability)

ประเมินความสามารถในการตรวจสอบข้ามชนิดและสกุลโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite .ในแตงกวา 57 ตำแหน่ง ทดสอบในพืช 4 ชนิด ได้แก่ แคนตาลูป (*Cucumis melo* L.), แตงโม (*Citrullus vulgaris*), ฟักทอง (*Cucurbita spp.*) และมะระ (*Momordica charantia* L.) ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี electrophoresis และ silver staining

14. การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

14.1 สกัดดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และแตงกวาลูกผสมผสม จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ CUA, CUB, CUC และ CUD จำนวน 120 ต้นต่อสายพันธุ์ โดยใช้วิธีการของ Fulton *et al.* (1995) ตามวิธีการในข้อ 1 หน้าที่ 29

14.2 สุ่มคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 10 ตำแหน่ง เพื่อใช้ในการจำแนกความแตกต่างระดับจีโนไทป์ (parental polymorphism survey) ระหว่างแม่และพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการสร้างเมล็ดพันธุ์เตงกวาแดงกลีบผสม CUA, CUB, CUC และ CUD จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี electrophoresis ตามขั้นตอนข้อ 11 หน้า 36-37

14.3 คัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อ มาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 (F₁) ของลูกผสม ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยทดสอบจำนวน 120 ต้นต่อสายพันธุ์

14.4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของต้นเตงกวาผสมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอปริมาณ 25 นาโนกรัม 1mM dNTP, 1X PCR buffer [10mM Tris-HCl (pH8.8), 50mM KCl, 0.08% Nonidet P40], 1.5 mM MgCl₂, 10 μM forward Primer, 10 μM reverse Primer และ 0.2 ยูนิต *Taq* polymerase ในปริมาตรรวม 10 μl

14.5 จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ และตรวจสอบผลด้วยวิธี electrophoresis ตามวิธีการในหัวข้อ 11.2 ถึง 11.4 หน้า 36-37

15. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่างวิธี SSLP และ GOT

15.1 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยวิธี GOT (Grow Out Testing)

15.1.1 นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์เตงกวาผสม F₁ ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการสุ่มมาจาก seed lot และนำเมล็ดพันธุ์พ่อและแม่ มาเพาะในกระบะเพาะเป็นเวลา 9 วัน หลังจากนั้นคัดเลือกต้นกล้าของแม่และพ่ออย่างละ 2 ต้นต่อสายพันธุ์ และต้นกล้าเตงกวาผสมจำนวน 120 ต้นต่อสายพันธุ์ และให้หมายเลขประจำต้นของเตงกวาผสมทั้ง 120 ต้น จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของใบเลี้ยงขนาดครึ่งของใบเลี้ยง เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP

15.1.2 นำต้นกล้าแตงกวาทั้งหมดย้ายปลูกลงในแปลงปลูกของเกษตรกรและให้เกษตรกรปฏิบัติดูแลรักษาต้นให้เจริญเติบโตตามคำแนะนำของเจ้าหน้าที่ของบริษัท

15.1.3 ทำการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของแตงกวาทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถมองเห็นได้ในช่วง vegetative period และ reproductive period เป็นตัวจำแนก (Phenotype identification) โดยเปรียบเทียบกับต้นแม่พันธุ์และต้นพ่อพันธุ์ ซึ่งเจ้าหน้าที่ของบริษัทได้แก่ผู้เชี่ยวชาญด้านการจำแนกสายพันธุ์แตงกวาและเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เป็นผู้ทำการตรวจสอบ

15.1.4 ผลของการตรวจสอบแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity) จำนวนต้นผสมตัวเองและจำนวนต้น off type รวมถึงระยะเวลาและแรงงานที่ใช้ในการดำเนินการตรวจสอบ

15.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SSLP (Simple sequence length polymorphism)

15.2.1 วิเคราะห์ผลการตรวจสอบที่ได้จากข้อ 14.5 โดยเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการในห้องทดลอง โดยทำการวิเคราะห์จากการเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอ (ขนาดอัลลีล) ที่ปรากฏในแม่, พ่อและลูก โดยลักษณะของต้นลูกผสมที่แท้จริงจะต้องปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดที่เท่ากับแม่และพ่อ ขณะที่ลักษณะของต้น off type จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับต้นแม่และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอื่นที่ไม่เท่ากับพ่อ ส่วนต้นที่มีลักษณะผสมตัวเองจะปรากฏเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับแม่เท่านั้น

15.2.2 ผลของการตรวจสอบแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity) จำนวนต้นผสมตัวเอง และจำนวนต้น off type รวมถึงระยะเวลาและแรงงานที่ใช้ในการดำเนินการตรวจสอบ

15.3 การเปรียบเทียบผลการตรวจสอบ

ใช้การเปรียบเทียบในเรื่องของระยะเวลาและจำนวนแรงงานที่ใช้ในการ
ตรวจสอบ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม

การเปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมระหว่างวิธี GOT และใช้เทคนิค SSLP

การจัดกลุ่มตัวอย่างและการเก็บข้อมูล

ทำการแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มตัวอย่างคือ

กลุ่มตัวอย่างที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างของข้อมูลต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT (grow out testing) โดยทำการศึกษาและเก็บข้อมูลจากสถานีผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกูดผสม ของบริษัทเจียไต๋ จำกัด ซึ่งตั้งอยู่ ณ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ข้อมูลที่ทำการศึกษาประกอบด้วยวิธีการ ขั้นตอนการตรวจสอบและต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยทำการเก็บข้อมูลจากการสัมภาษณ์เจ้าหน้าที่บริษัทและเกษตรกรผู้ดำเนินการตรวจสอบจำนวน 7 ราย

กลุ่มตัวอย่างที่ 2 เป็นกลุ่มตัวอย่างของข้อมูลต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี SSLP โดยทำการศึกษาและเก็บข้อมูลจากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเครื่องหมายของ ดร.จุลภาค คุ้มวงศ์ ซึ่งตั้งอยู่ ณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ข้อมูลที่ทำการศึกษาประกอบด้วยวิธีการ ขั้นตอนการตรวจสอบและต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยทำการเก็บข้อมูลจากการสัมภาษณ์จากเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทดลอง และสอบถามจากบริษัทผู้จำหน่ายสารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการวิเคราะห์ข้อมูลออกเป็น 2 วิธี

1. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา (Descriptive analysis) เป็นการศึกษาถึงลักษณะทั่วไปของการดำเนินงานตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสม โดยวิธี

GOT และเทคนิค SSLP เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการและขั้นตอน ระยะเวลา แรงงานที่ใช้การตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วย GOT และเทคนิค SSLP

2. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) เป็นการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับต้นทุนของการตรวจสอบบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเมล็ดพันธุ์แดงกวางลูกผสมทั้ง 2 วิธี รวมทั้งการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ทำการจำแนกและประมาณค่าต้นทุนต่อหน่วยที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมทั้งสองวิธีด้วยการคำนวณตามหลักการคำนวณต้นทุนระยะสั้นที่ประกอบด้วยต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปร โดยใช้ Spread sheet หน่วยของต้นทุนที่ใช้คือต้นทุนต่อการทดสอบตัวอย่างต้นพืช 1 ต้น ในการจำแนกและประมาณค่าต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยวิธี GOT ส่วนการจำแนกและประมาณค่าต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP ทำการวิเคราะห์โดยไม่คิดต้นทุนค่าก่อสร้างอาคารสถานที่ ค่าซ่อมแซมและค่าการจัดการอื่นๆ โดยสมมุติให้อยู่ภายใต้เงื่อนไขที่มีโครงสร้างของห้องปฏิบัติการพร้อม เพียงแต่เพิ่มเครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับใช้ในการตรวจด้วยวิธี SSLP โดยผู้ศึกษาเป็นผู้จำแนกวิธีการขั้นตอนและประมาณค่าต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบ จากนั้นทำการเปรียบเทียบต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบทั้งสองวิธีออกมาในรูปของต้นทุนต่อหน่วยและร้อยละของต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบ

การวิเคราะห์ต้นทุนต่อหน่วยการผลิตในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกวางลูกผสม โดยวิธี GOT และเทคนิค SSLP มีดังนี้

ต้นทุนทั้งหมด (Total Cost; TC) ได้จากการรวมต้นทุนคงที่ทั้งหมด (Total fixed cost; TFC) และต้นทุนผันแปรทั้งหมด (Total variable cost; TVC) เข้าด้วยกัน ดังแสดงในสมการ

$$TC = TFC + TVC$$

$$TC = \text{ต้นทุนรวมของการตรวจสอบ (บาท/ต้น)}$$

$$TFC = \text{ต้นทุนคงที่ทั้งหมดของการตรวจสอบ (บาท/ต้น)}$$

$$= \text{ค่าเช่าที่ดิน} + \text{ค่าเสื่อมราคาของวัสดุอุปกรณ์การเกษตรหรือห้องปฏิบัติการ}$$

$$\begin{aligned}
& + \text{ค่าจ้างแรงงานประจำ} + \text{ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน} \\
\text{TVC} & = \text{ต้นทุนผันแปรทั้งหมดของการตรวจสอบ (บาท/ตัวอย่าง)} \\
& = \text{ค่าแรงงานรายวัน} + \text{ค่าวัสดุการเกษตรหรือวัสดุในห้องปฏิบัติการ} + \\
& \text{ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าจ้าง ค่าน้ำ ค่าไฟฟ้า ค่าซ่อมแซม ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน)}
\end{aligned}$$

โดยองค์ประกอบของต้นทุนคงที่ทั้งหมดและต้นทุนผันแปรทั้งหมดในการตรวจสอบ
 ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT และเทคนิค SSLP สามารถสรุปได้ดังนี้

ต้นทุนคงที่ทั้งหมด ประกอบด้วย ค่าเช่าที่ดิน ค่าเสื่อมราคาของอุปกรณ์การเกษตรและ
 ห้องปฏิบัติการ ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนในต้นทุนคงที่และค่าเงินเดือนเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานในแปลง
 และห้องปฏิบัติการ

ต้นทุนผันแปรทั้งหมด ประกอบด้วย ส่วนที่ 1 ค่าจ้างแรงงานในการประกอบกิจกรรม
 ต่างๆ ส่วนที่ 2 ค่าวัสดุการเกษตรหรือวัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (ค่าเมล็ดพันธุ์ ค่าวัสดุเพาะกล้า
 ค่ากระบะเพาะกล้า ค่าปุ๋ย ค่าสารเคมี ค่าค้ำ ค่าพลาสติกคลุมแปลง ค่าเชือก ค่าน้ำมัน) ส่วนที่ 3
 ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าจ้างรถไถ ค่าซ่อมแซมวัสดุและอุปกรณ์) และค่าเสียโอกาสเงินลงทุนในต้นทุนผัน
 แปร ซึ่งคิดตามอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 ต่อปี (ตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ยืมธนาคารสำรวจ เดือน
 สิงหาคม ปี พ.ศ. 2548)

นอกจากการแบ่งต้นทุนออกเป็นต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปร สามารถพิจารณา
 ต้นทุนดังกล่าวเป็นต้นทุนที่เป็นตัวเงินและไม่เป็นตัวเงิน ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

ต้นทุนที่เป็นตัวเงิน ได้แก่ ค่าปัจจัยการผลิตทั้งหมด ค่าจ้างแรงงาน ค่าจ้าง ค่าซ่อมแซม
 วัสดุและอุปกรณ์

ต้นทุนที่ไม่เป็นตัวเงิน ได้แก่ ค่าเสื่อมราคาของปัจจัยการผลิต ค่าเสียโอกาสเงิน
 ลงทุนในต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปร

การศึกษาต้นทุนการตรวจสอบโดยวิธี GOT ครั้งนี้ได้แบ่งกรณีศึกษาออกเป็น 2 กรณีคือ
 ต้นทุนการตรวจสอบที่เป็นค่าจ้างเกษตรกรดำเนินการและต้นทุนการตรวจสอบที่เกิดจากบริษัท

ดำเนินการปลูกทดสอบเอง สำหรับการศึกษาด้านทุนการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP ได้แบ่งกรณีการศึกษาเป็น 2 กรณีเช่นกัน คือ การศึกษาด้านทุนที่เกิดจากการจ้างตรวจสอบ (ค่าจ้างตรวจสอบ) และด้านทุนที่เกิดจากการที่บริษัทดำเนินการตรวจสอบเอง

การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตของการตรวจสอบด้วยวิธี SSLP เป็นการวิเคราะห์เพื่อประเมินหาหนทางในการลดต้นทุนการผลิต โดยทำการจำลองปรับเปลี่ยนรูปแบบเทคนิคการตรวจสอบที่แตกต่างกัน เช่น การตัดขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis การเพิ่มจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอในการตรวจสอบในขั้นตอน polyacrylamide gel electrophoresis และการใช้ปัจจัยการผลิตที่มีราคาถูก เช่น การสั่งซื้อเอ็นไซม์ *Taq* polymerase ในปริมาณที่มาก เพื่อลดต้นทุนการตรวจสอบให้น้อยลง

สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (Center for Agricultural Biotechnology: CAB), ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน (Tropical Vegetable Research Center: TVRC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม และสถานีผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกุ่มผสม บริษัทเจียใต้ จำกัด อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

ระยะเวลาในการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลองเริ่มต้นตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2545 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ.2549

ผลการทดลอง

การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแตงกวา

จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแตงกวา accession CS025 ด้วยวิธี enriched genomic library และ capture ด้วย (B-CT₁₅) พบว่าสามารถจัดเก็บ Clone (โคลน) ได้จำนวน 960 โคลน และจากการจำแนกโคลนด้วยวิธีการ hybridization พบว่าสามารถคัดเลือกโคลนที่มี microsatellite ดีเอ็นเอ (positive clones) จำนวน 254 โคลน หรือประมาณ 26.46% (254/960) และเมื่อนำไปหาลำดับเบสพบว่า 170 โคลน หรือคิดเป็น 66.93% (170/254) มี microsatellite ดีเอ็นเอ และเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนโคลนทั้งหมดใน enriched genomic library พบว่ามี microsatellite ดีเอ็นเอเพียง 17.71% (170/960) เท่านั้น เมื่อจำแนกลักษณะของลำดับเบสซ้ำทั้ง 170 ลำดับเบส พบลำดับเบสซ้ำแบบ (GA)_n มีมากที่สุดคือ 89% และ (GT)_n 4%, (GAA)_n 3%, (GAAA)_n และ (CTTTT)_n 1%, (GGA)_n, (GGGA)_n, (CTT)_n, และ (GTTTT)_n 0.6%. ตามลำดับ

จากวิเคราะห์ลำดับเบสซ้ำใน positive clone 170 โคลน พบว่าโคลนจำนวน 50 โคลน หรือประมาณ 29.41% มีตำแหน่งของ microsatellite ดีเอ็นเออยู่บริเวณปลายซึ่งใกล้บริเวณ cloning site ข้างใดข้างหนึ่งของดีเอ็นเอพาหะมากเกินไปทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ ขณะที่โคลนจำนวน 20 โคลนหรือประมาณ 11.76% มีลำดับเบสบริเวณขนานข้าง microsatellite ดีเอ็นเอไม่เหมาะสมสำหรับการออกแบบไพรเมอร์และโคลนจำนวน 14 โคลน (8.24%) มีลักษณะของลำดับเบสซ้ำที่เหมือนกัน (duplicates) สำหรับที่โคลนที่เหลือ 86 โคลน สามารถออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ได้จำนวน 86 คู่ไพรเมอร์หรือคิดเป็นประมาณ 50.59% (86/170) จากจำนวนโคลน 170 โคลน (ตารางที่ 4)

จากการจำแนกลักษณะของ microsatellite ดีเอ็นเอจากจำนวน 86 โคลนที่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ พบว่ามากกว่า 93 % มี microsatellite ดีเอ็นเอแบบ dinucleotide repeats ที่เหลือจำนวน 2 % มีเป็นแบบ tetranucleotide repeats และ trinucleotide repeats 1% ตามลำดับ

ตารางที่ 4 รายละเอียดโคลนที่ได้จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite โดยวิธี enriched genomic library ด้วยโพรบ (CT)₁₀

จำนวนโคลน	960 โคลน	
โคลนที่ให้ผล	706 โคลน	
โคลนที่ให้ผล Positive	254 โคลน	
โคลนที่มี SSRs	170 โคลน	
	ออกแบบไพรเมอร์:	
	ตำแหน่ง SSRs อยู่ใกล้บริเวณปลาย cloning site	50 ลำดับเบส
	ลำดับเบสที่ซ้ำกัน (Duplicated sequences)	14 ลำดับเบส
	ลำดับเบสไม่เหมาะสมสำหรับออกแบบไพร	20 ลำดับเบส
	ลำดับเบสที่ออกแบบไพรเมอร์ได้	86 ลำดับเบส
	การทดสอบไพรเมอร์:	
	ไม่มีผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR	19 คู่
	ผลิตผล PCR ให้ผลให้ขนาดอัลลีลที่ไม่ถูกต้อง	10 คู่
	ผลิตผล PCR ให้ผลชัดเจน	57 คู่

1. การทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแตงกวา

จากการทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 86 ตำแหน่งในแตงกวา accession CS025 และ CS054 พบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถอ่านผลได้ชัดจำนวน 57 ตำแหน่ง (66.30%) ขณะที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 10 ตำแหน่งให้ขนาดอัลลีลที่ไม่ตรงตามขนาดที่คาดไว้ และดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 19 ตำแหน่งไม่เกิด PCR product (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาประเภทของลำดับเบสซ้ำใน Microsatellite ดีเอ็นเอ 57 ตำแหน่ง พบว่ามี Microsatellite ดีเอ็นเอประเภท perfect repeats จำนวน 30 ตำแหน่ง (52%) ประเภท imperfect repeats จำนวน 21 ตำแหน่ง (37%) และประเภท compound repeats จำนวน 6 ตำแหน่ง (11%) และมีจำนวนซ้ำอยู่ระหว่าง 5-33 ซ้ำ (ตารางที่ 5)

2. การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์

จากการตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ในแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 57 ตำแหน่ง พบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ที่อ่านผลได้ชัดเจนและสามารถบอกความแตกต่าง (polymorphic) ระหว่างจีโนไทป์ได้จำนวน 45 ตำแหน่ง (78.95%) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 4) ขณะที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 12 ตำแหน่ง (21.05%) ไม่พบสามารถแยกความแตกต่าง (monomorphic) ระหว่างจีโนไทป์แตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ได้ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 5) ซึ่งรูปแบบของ microsatellite ดีเอ็นเอ, ลำดับเบสของคู่ไพร์เมอร์ (Primer sequence), อุณหภูมิของการ annealing (T_A), ขนาดของอัลลีล, จำนวนอัลลีล, ค่า Observed heterozygosity (H_o), ค่า Expected heterozygosity (H_e), ค่า Polymorphism Information Content (PIC) และค่า Probability of Identity (PI) ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite 45 ตำแหน่ง แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 5 และรูปแบบของ microsatellite ดีเอ็นเอ, ลำดับเบสของคู่ไพร์เมอร์ (Primer sequence), อุณหภูมิของการ annealing (T_A), ขนาดของอัลลีล, จำนวนอัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite 12 ตำแหน่ง แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 6

จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 45 ตำแหน่งที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ได้ พบว่ามีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งโดยเฉลี่ย 3.64 อัลลีล โดยดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT933 มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งสูงสุดคือ 7 อัลลีล และดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT42, CMCT97, CMCT191, CMCT254, CMCT290N, CMCT435, CMCT565, CMCT602, CMCT661 และ CMCT664 มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งต่ำสุดคือ 2 อัลลีล (ตารางที่ 5)

จากการตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ในแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ สามารถประเมินค่าความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งในได้ในตารางผนวกที่ 1

2.1 การประเมินค่า Observed heterozygosity (H_o) และ Expected heterozygosity (H_e) (Nei and Li, 1978)

การประเมินค่า He ของดีเอ็นเอเครื่องหมาย 45 ตำแหน่ง จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลพบว่า มีค่า He เฉลี่ยประมาณ 0.54 โดยมีค่า He อยู่ระหว่าง 0.12 ถึง 0.81 และค่า Ho เฉลี่ยประมาณ 0.46 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่า He (ตารางที่ 5)

2.2 การประเมินค่า Polymorphism Information Content (PIC) (Botstein *et al.*, 1980)

การประเมินค่า PIC จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง พบว่ามีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.1103-0.7777 โดยมีค่า PIC เฉลี่ยประมาณ 0.4739 (ตารางที่ 5)

2.3 การประเมินค่า Probability of Identity (PI) (Kaul *et al.*, 2001)

การประเมินค่า PI จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 45 ตำแหน่ง พบว่าค่า PI มีค่าสูงเท่ากับ 0.2951 ที่ตำแหน่ง CMCT254 และต่ำสุดเท่ากับ 0.0656 ที่ตำแหน่ง CMCT933 นั้นแสดงว่ามีโอกาสที่จะพบแดงกวามีจีโนไทป์เหมือนกันที่ตำแหน่ง CMCT933 เป็น 1 ใน 15 และตำแหน่งใน CMCT254 เป็น 1 ใน 2 เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายเพิ่มมากขึ้นเป็น 45 ตำแหน่ง พบว่าจะมีโอกาสพบแดงกวามีจีโนไทป์เหมือนกันเท่า 1 ใน 1.63×10^{26} (ตารางที่ 5)

การประเมินค่า PI ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 10 ตำแหน่งที่ถูกนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์แดงกวาลูกผสม พบว่าค่า PI มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.1156 ที่ตำแหน่ง CMCT662 และสูงสุดเท่ากับ 0.2978 ที่ตำแหน่ง CMCT641 นั้นแสดงว่ามีโอกาสที่จะพบแดงกวามีจีโนไทป์เหมือนกันที่ตำแหน่ง CMCT662 เป็น 1 ใน 9 และตำแหน่งใน CMCT641 เป็น 1 ใน 3 เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่าง โดยใช้จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายเพิ่มมากขึ้นเป็น 10 ตำแหน่ง พบว่าจะมีโอกาสพบแดงกวามีจีโนไทป์เหมือนกันเท่ากับ 1 ใน 2×10^7 (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 5 ชนิดของ Microsatellite ดีเอ็นเอ, ลำดับเบสไพรมอร์, Annealing temperature (T_A), ขนาดอัลลีล, จำนวนอัลลีล, ค่า Observed heterozygosity (H_o), ค่า Expected heterozygosity (H_e), ค่า Polymorphism Information Content (PIC) และ ค่า Probability of Identity (PI) ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 45 ตำแหน่ง

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย ตำแหน่ง	ชนิด Microsatellite ดีเอ็นเอ	ลำดับเบสไพรมอร์ (5'-3')	T_A (°C)	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	จำนวนอัล ลีล	ค่า H_o	ค่า H_e	ค่า PIC	ค่า PI	1 ใน... โคลน
CMCT10N	Imperfect (GA) ₅ GG(GA) ₁₄	F: AACTCTCATGGGAAACAGAG R: ATTCTTCTCAACCTCTTCCT	50	180-208	4	0.60	0.69	0.6274	0.1591	6
CMCT14	Perfect (GA) ₂₇	F: TTCCACGTTACATTGGACGA R: AGAATTCATGGCCTGCAGAT	55	168-202	4	0.25	0.64	0.5728	0.1953	5
CMCT22	Imperfect (GA) ₉ TA(GA) ₄ GG(GA) ₁₆	F: CCGTTCTGGCGCGGATAGA R: CGTGGATAACGCGCAACTAACC	50	158-170	3	1.00	0.60	0.5123	0.2476	4
CMCT35	Perfect (GAAA) ₇	F: TCCGCAGTTCACAACCTTGAC R: GGGCTTCTGTTTCATTTCG	55	117-135	4	1.00	0.74	0.6891	0.1174	9
CMCT42	Perfect (CT) ₁₃	F: GAGAGCCCCACCACCAGTCT R: GGATCCATGGCGCCTATAAATACC	50	148-150	2	0.25	0.46	0.3514	0.4005	2
CMCT71	Perfect (GA) ₁₈	F: AATTCATGGACATCCAGCCGAAG R: CAGTGAAAGGCACTAAAGCGGAAG	50	260-296	3	0.38	0.50	0.4160	0.3340	3
CMCT77	Imperfect (GA) ₈ GC(GA) ₁₃	F: TCAGAGTGAATGAGCTCATGGAAG R: TGACGTCCGCAAGGACACAG	50	122-144	3	0.50	0.50	0.4080	0.3420	3
CMCT97	Perfect (GA) ₉	F: TGGAGAGATGTTGAAGAGAGGAAG R: CATCAATTGAGGAAGAGGAGTTGG	55	126-140	2	0.00	0.12	0.1103	0.7862	1
CMCT108	Imperfect (GA) ₉ TA(GA) ₅ GG(GA) ₁₁ GG(GA) ₄	F: GCCCGTTCTGGCGCGGATAGA R: GTGGATAACGCGCTCAACTAACCT	50	160-192	3	0.69	0.52	0.4202	0.3303	3
CMCT117N	Perfect (CT) ₂₂	F: TCCTACATCACTTGGTCTGGTATG R: GCTTCACCAACTAAGAGAACACAG	55	196-200	3	1.00	0.58	0.4864	0.2694	4
CMCT134N	Compound imperfect (CT) ₅ TA(CT) ₂ (CT) ₉	F: CTGCTTGAAGAGCCGAGAATGAG R: TCAAAAAGGCTTTGGAGGGAG	50	232-236	3	1.00	0.55	0.4555	0.2975	3

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย ตำแหน่ง	ชนิด Microsatellite ดีเอ็นเอ	ลำดับเบสไพรมอร์ (5'-3')	T _A (°C)	ขนาดอัล ลีล (คู่เบส)	จำนวนอัล ลีล	ค่า Ho	ค่า He	ค่า PIC	ค่า PI	1 ใน... โคลน
CMCT156	Imperfect (CT) ₄ CC(CT) ₇ CC(CT) ₃ CC(CT) ₅ AT(CT) ₈	F: TCGTGGATAACGCGCTCAAC R: GCGATAGAAAAAGAGAGCG	50	138-156	4	1.00	0.67	0.6077	0.1709	6
CMCT191	Perfect (GA) ₃₃	F: ACAATGGCAGGTCAATTAGC R: CCTTGGGTTGTATCGAAGAC	50	194-204	2	0.53	0.50	0.3707	0.3794	3
CMCT216	Perfect (GAA) ₁₅	F: CAGTAGGAGGAAGTGGGTTC R: CTTACTCCAACCAACCCAAC	50	312-326	3	0.20	0.51	0.4264	0.3238	3
CMCT252	Perfect (GA) ₂₃	F: GATGGTGGAGATGGAATTGGGACT R: TTAGAGCTGGAACCTCCGCAAC	50	290-332	6	0.40	0.68	0.6288	0.1521	7
CMCT254	Imperfect (GA) ₁₀ GT(GA) ₄	F: GCCAACTATAGCCATTGATTTG R: TCAACACCTCCTCAACT	50	208-210	2	0.13	0.38	0.2951	0.4745	2
CMCT266N	Perfect (GA) ₂₂	F: CTGTGGTTGGGTTGGAAATCTC R: GGGAGGCAGTAGACACATCC	50	255-264	4	0.40	0.56	0.5109	0.2424	4
CMCT290N	Imperfect (GA) ₁₀ AATT(GA) ₄ TA(GA) ₅	F: AACACCTCGAGCAAGAGCAG R: GGGTTTGAATCTCCCAGTCC	50	160-172	2	1.00	0.56	0.4603	0.2931	3
CMCT315	Perfect (CT) ₂₄	F: CCACGAAATACAGATCAGCAAC R: CACGTTACATTGGACGAGAGAT	50	198-224	4	0.50	0.66	0.5972	0.1783	6
CMCT323	Perfect (GA) ₁₈	F: TCGATCTGTAGAAAGCAAGGA R: CAAGCAAATCCCATTCC	50	204-224	5	0.47	0.66	0.6126	0.1634	6
CMCT358	Imperfect (GA) ₆ GG(GA) ₁₂	F: GGGTGAACAACCAAGAGAGAA R: TGAGGGAGCGTTGATTAGAG	50	256-284	3	0.40	0.69	0.5880	0.1882	5
CMCT390	Imperfect (GA) ₆ AA(GA) ₁₇	F: GAATTTAGGCATAGAGAGAAAGTGG R: CCCTAAACAGAAGACTTTGCTAC	50	230-254	5	0.44	0.61	0.5381	0.2246	4
CMCT435	Perfect (GA) ₉	F: TCAACTGGTAGTTGGGAAACCT R: CTGTCAATCAATGCTTCAGCTC	50	400-435	2	0.00	0.12	0.1103	0.7862	1

ตารางที่ 5 (ต่อ)

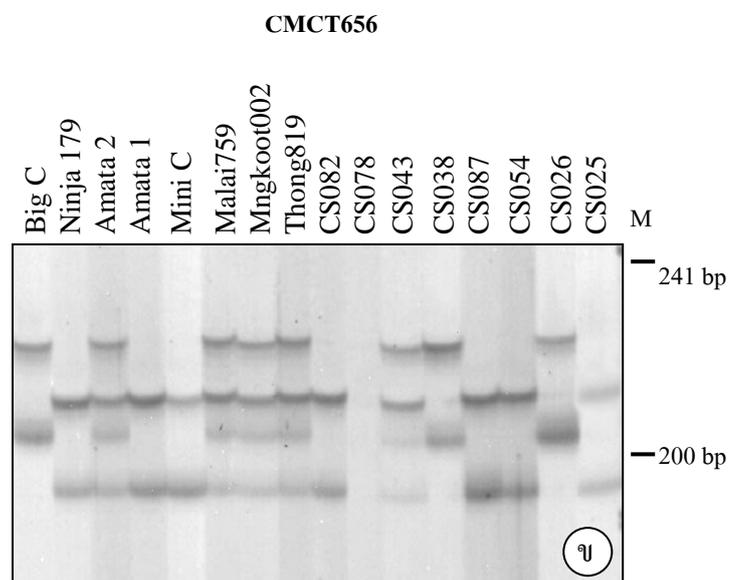
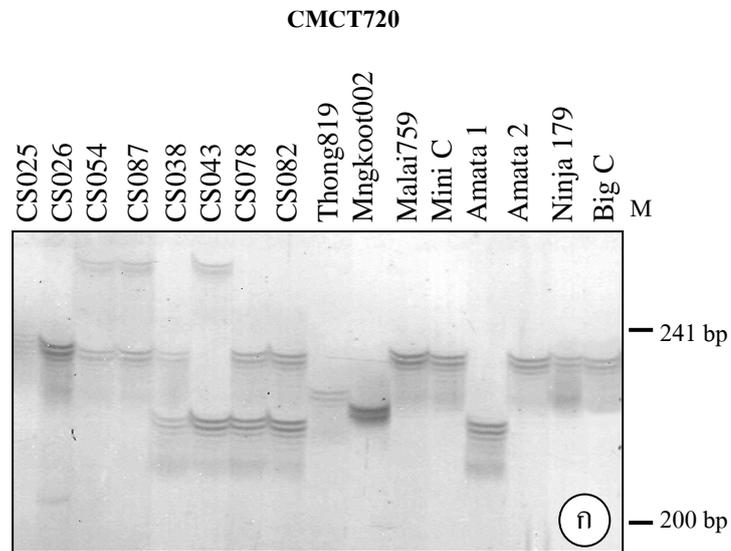
ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย ตำแหน่ง	ชนิด Microsatellite ดีเอ็นเอ	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-3')	T _A (°C)	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	จำนวนอัล ลีล	ค่า Ho	ค่า He	ค่า PIC	ค่า PI	1 ใน... โคลน
CMCT565	Imperfect (GA) ₈ TA(GA) ₃	F: GAAAGAGCGGGAGAAATGGAAACTC R: AAGCGGTGGGAATTGAATTGGTTC	50	256-266	2	0.00	0.12	0.1103	0.7862	1
CMCT598	Imperfect (CTT) ₃ C (CTT) ₂ T (CTT) ₃ (CT) ₆	F: TCCCAAACATAGAATGCGATAATA R: CTGCTGTTTTTCGATCTTGTAGA	50	286-314	3	0.47	0.64	0.5669	0.2029	5
CMCT602	Perfect (GA) ₉	F: GAGCTGAGCCAAGTTATCGTTTTG R: CAATTGAGGAAGAGGAGTTGGTTC	55	158-160	2	0.00	0.12	0.1103	0.7862	1
CMCT619	Imperfect (GA) ₂ G (GA) ₁₈	F: AACAAAGAACTAAGCAATTCAGG R: CTTAGGAGAAGCCAAGACTAGG	50	238-264	3	0.53	0.50	0.4278	0.3232	3
CMCT632	Perfect (GA) ₈	F: GCCCATATGAGATTTTAGAGAGAGA R: CCTCATTCAGAACCCAAATTCT	50	128-138	4	0.48	0.38	0.4270	0.3234	3
CMCT641	Perfect (GA) ₁₁	F: GAACAACCCTCCAATTTTGCTC R: GCCACTTCCATGTCCAATTC	50	232-246	4	0.51	0.25	0.4523	0.2978	3
CMCT651	Imperfect (GA) ₈ TA(GA) ₃	F: AGAGCGGGAGAAATGGAAAC R: CGGTGGGAATTGAATTGGTT	50	252-264	4	0.56	1.00	0.4603	0.2931	4
CMCT656	Perfect (CT) ₆	F: TCCTACAAC TCAAAGGGCCAAC R: GAAGTGGAGTGGAGTGGAGTGA	50	210-224	3	0.59	0.53	0.5105	0.2475	4
CMCT661	Imperfect (CT) ₄ TT(CT) ₄ CGCTCG(CT) ₁₀	F: GGGTCATACCCAAAAGGGGAGA R: TCTTGCTTTAGCCGACAAC TCA	50	140-152	2	0.46	0.38	0.3557	0.3957	3
CMCT662	Perfect (GA) ₃₀	F: ACGTCGTAAAACCATCGGAGTC R: GCTTCCAAGCGTCAAAGGTATC	50	186-234	6	0.73	0.50	0.6853	0.1156	9
CMCT664	Compound (CTT) ₄ (CCT) ₇	F: AAGTGGGCTCGATTGGAAGA R: CCGTCGCCTTTC TCAAGTTC	55	208-238	2	0.00	0.12	0.1103	0.7862	1
CMCT674	Perfect (GA) ₂₃	F: TAGAAAGGAAGGGATGTGATTAGG R: ACAGGTGGTTAGAGGTTAGAGCTG	50	246-288	4	0.51	0.20	0.4730	0.2771	4
CMCT720	Perfect (GA) ₃₀	F: CCAACGGAGGTCTGAACG R: CAGCGGAGAAAAGGCTCAG	50	220-278	5	0.63	0.38	0.5813	0.1851	5

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย ตำแหน่ง	ชนิด Microsatellite ดีเอ็นเอ	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-3')	T _A (°C)	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	จำนวน อัลลีล	ค่า Ho	ค่า He	ค่า PIC	ค่า PI	1 ใน...โคลน
CMCT726	Imperfect (GA) ₂₂ TA(GA) ₄	F: GAAGAGACGGCTCCTTTCAG R: CCCGATTGTGTCGTCTCTCTC	50	220-236	3	0.44	0.59	0.5105	0.2475	4
CMCT746	Perfect (GA) ₂₃	F: GCTGGTTGACCAAAGTGGACTTC R: GGTCAAAGACTCAAACCCACCC	50	248-322	6	0.19	0.70	0.6598	0.1294	8
CMCT775	Perfect (GA) ₂₃	F: TAGGCCTAGAATTTAGGCATAGAGAGA R: TTGGGTCATTTGGTGGATATCTAACAC	50	180-198	3	0.33	0.52	0.4244	0.3258	3
CMCT781	Perfect (GA) ₂₃	F: AAAGAAGATAGGCCTAGAATTTAG R: GCCCACATATGTCTAAATTTGTCAG	50	356-372	3	0.06	0.38	0.3399	0.4243	2
CMCT799	Perfect (GA) ₁₉	F: TCGTCTGTTTTTCGATCTTGTAGA R: TCCCAAACATAGAATGCGATAATA	55	282-318	5	0.53	0.72	0.6780	0.1197	8
CMCT904	Perfect (GA) ₂₀	F: GATAGGCCTAGAATTTAGGCATAGAGA R: ATATCACACGCTAACTTTGGGTCA	50	200-222	6	0.44	0.68	0.6417	0.1422	7
CMCT933	Imperfect (GA) ₁₉ CA(GA) ₁₁	F: GATGACATGGACATGTCTGCTTTGC R: AAGATCTCTCCCATCTACCAACTTACC	50	135-185	7	0.50	0.81	0.7777	0.0656	15
CMCT944	Imperfect (GA) ₆ AA(GA) ₁₇	F: GGCCTAGAATTTAGGCATAGAGA R: GCTGTCTTTATGTTTCTGCAAC	50	271-305	6	0.38	0.62	0.5693	0.1949	5
CMCT950	Perfect (GA) ₂₁	F: GGGAGATCAAGGGAAGGATAATAG R: TTTGACCATCAAACACTCTCTCTC	50	104-126	4	0.93	0.71	0.6588	0.1358	7
ค่าเฉลี่ย					3.64	0.46	0.54	0.4739	0.3080	4.4
ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน					1.35	0.30	0.18	0.17	0.19	2.67
ผลคูณรวม								6.13 x 10⁻²⁷	1.63 x 10²⁶	

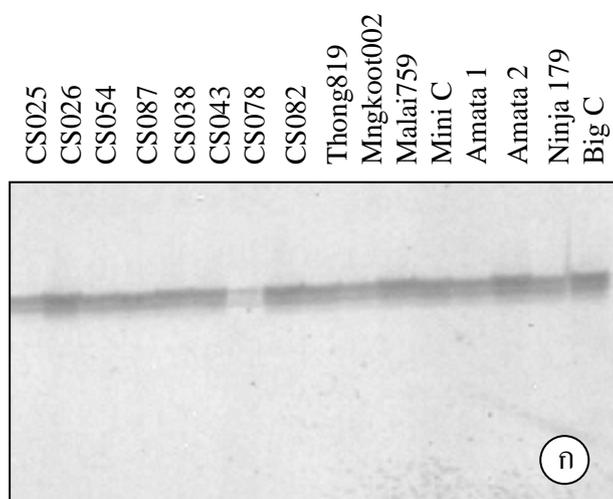
ตารางที่ 6 ชนิดของ Microsatellite ดีเอ็นเอ, ลำดับเบสไพรมอร์, Annealing temperature (T_A), ขนาดอัลลีล, จำนวนอัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 12 ตำแหน่ง ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถว 8 accessions และแถว 8 สายพันธุ์ ได้

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง	ชนิด Microsatellite ดีเอ็นเอ	ลำดับเบสไพรมอร์ (5'-3')	T_A (°C)	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	จำนวนอัลลีล
CMCT12 ^b	Imperfect (GA) ₆ AA (GA) ₁₀	F: GGTTTCTGTAGAGATGTCAGAGAC R: GGTTATTACTAGAGCCCTCTGAGT	50	296	1
CMCT36 ^b	Perfect GA ₈	F: TGAGCTGAGCCAAGTTATCG R: GCTTGCGTTTCAAATTTTAC	55	192	1
CMCT57 ^b	Compound imperfect (GA) ₅ (GAA) ₄ A (GAA) ₁ G (GAA) ₃	F: GGGAAATTGTGGTGCTGAGG R: TCACTCCCAAACATAGAATGCGA	50	192-196	2
CMCT62 ^b	Imperfect (GA) ₄ AA (GA) ₂	F: AACATCAGATCTCCGACACCCATC R: CGTTTACACCCACCCAAGTAAGTC	50	272-276	2
CMCT79 ^b	Compound imperfect (GA) ₄ (GAA) ₄ A (GAA) ₄	F: TGATGGAGAAATTGTGGTGCTGAG R: CACATCGGCTACGCCAAACTG	50	234-236	2
CMCT194N ^b	Perfect (GA) ₈	F: TGAGCTGAGCCAAGTTATCG R: GAGGAAGAGGAGTTGGTTCAA	50	156	1
CMCT309 ^b	Imperfect (GA) ₅ AAGG (GA) ₄	F: AACATCAGATCTCCGACACCCATC R: CGTTTACACCCACCCAAGTAAGTC	50	277	1
CMCT609 ^b	Perfect (GA) ₇	F: TATCCTAAACACGGCGGAAA R: TGGGCTTTTCTTCTCTAACTCC	50	236-238	2
CMCT663 ^b	Perfect (GA) ₆	F: CGGTGGACAAGAGCCATTAG R: CATTATCATCACCGCCTTC	50	182	1
CMCT691 ^b	Compound (CT) ₂ (CCT) ₂ (CTT) ₂	F: GTAAGGCAGAGAAATTGAACCCTA R: TTGGTGAGATTGCTCTGGTATTTA	50	204-206	2
CMCT742 ^b	Imperfect (CT) ₂₂ TT (CT) ₄	F: GTCTTTATGTTTCTGCAACTCCACTCA R: GGGCATTATTGTAATCATGCACTCACA	50	306-308	1
CMCT776 ^b	Compound (GAA) ₂ (GAG) ₂ (GA) ₃	F: TTTGGTGAGATTGCTCTGGTATTTAGC R: TACTAACCACAGCTTCCGATCCA	50	240	1

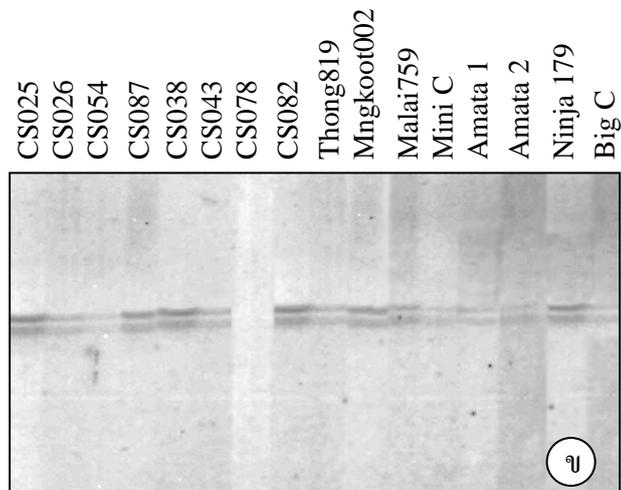


ภาพที่ 4 แอปติเอ็นเอแสดงความแตกต่างระดับจีโนไทป์ในแดงทวา 8 accessions และแดงทวา 8 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง ก.) CMCT 720 ข.) CMCT656 ในการตรวจสอบ

CMCT36



CMCT691



ภาพที่ 5 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง ก.) CMCT 36 ข.) CMCT691 ที่ไม่แสดงความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ในแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์

3. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด *Microsatellite* ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์ (Marker transferability)

3.1 การตรวจสอบจีโนไทป์ในแคนตาลูป

จากการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด *microsatellite* ในแตงกวาจำนวน 57 ตำแหน่ง ตรวจสอบจีโนไทป์ในแคนตาลูป พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 38 ตำแหน่ง (66.67%) สามารถใช้ตรวจสอบระดับจีโนไทป์ได้และดีเอ็นเอเครื่องหมาย 2 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ (multiple band) ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมาย 17 ตำแหน่งไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ตารางที่ 7)

3.2 การตรวจสอบจีโนไทป์ในแตงโม

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด *microsatellite* ในแตงกวาจำนวน 23 ตำแหน่ง (40.35%) สามารถใช้ตรวจสอบระดับจีโนไทป์ได้ และดีเอ็นเอเครื่องหมาย 13 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมาย 21 ตำแหน่งไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ตารางที่ 7)

3.3 การตรวจสอบจีโนไทป์ในฟักทอง

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด *microsatellite* ในแตงกวาจำนวน 16 ตำแหน่ง (28.07%) สามารถใช้ตรวจสอบระดับจีโนไทป์ได้ และดีเอ็นเอเครื่องหมาย 2 ตำแหน่ง ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมาย 39 ตำแหน่งไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ตารางที่ 7)

3.4 การตรวจสอบจีโนไทป์ในมะระ

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด *microsatellite* ในแตงกวาจำนวน 25 ตำแหน่ง (43.86%) สามารถใช้ตรวจสอบระดับจีโนไทป์ได้ และดีเอ็นเอเครื่องหมาย 3 ตำแหน่งให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมาย 29 ตำแหน่งไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ตารางที่ 7)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด *microsatellite* ในแตงกวาจำนวน 8 ตำแหน่งที่สามารถใช้ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์ในพืชทั้ง 4 ชนิดได้ คือ CMCT 254, CMCT290N, CMCT 390, CMCT435, CMCT 641, CMCT662, CMCT662 และ CMCT664

ตารางที่ 7 การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 57 ตำแหน่ง ตรวจสอบจีโนไทป์ใน
แคนตาลูป (*Cucumis melo* L.), แดงโม (*Citrullus vulgaris*), ฟักทอง (*Cucurbita* spp.)
และมะระ (*Momordica charantia* L.)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	แตงกวา 8 accessions และ 8 สายพันธุ์	แคนตาลูป (<i>C. melo</i> L.)	แดงโม (<i>Citrullus vulgaris</i>)	ฟักทอง (<i>Cucurbita</i> spp.)	มะระ (<i>Momordica charantia</i> L.)
CMCT10N	P	++	0	0	0
CMCT14	P	+	+	0	0
CMCT22	P	0	0	0	0
CMCT35	P	0	0	0	0
CMCT42	P	++	mb	+	0
CMCT71	P	++	mb	mb	+
CMCT77	P	++	0	0	+
CMCT97	P	0	mb	+	mb
CMCT108	P	++	0	0	+
CMCT117N	P	++	0	0	0
CMCT134N	P	0	0	0	mb
CMCT156	P	0	0	0	0
CMCT191	P	0	+	0	0
CMCT216	P	mb	mb	mb	+
CMCT252	P	++	+	0	+
CMCT254	P	++	+	+	+
CMCT266N	P	0	0	0	0
CMCT290N	P	++	+	+	+
CMCT315	P	++	0	+	+
CMCT323	P	0	mb	0	0
CMCT358	P	++	mb	+	+
CMCT390	P	++	++	+	+
CMCT435	P	++	++	++	+
CMCT565	P	+	mb	0	0
CMCT598	P	0	0	0	0

หมายเหตุ P คือ Polymorphic; M คือ Monomorphic; ++ คือ ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน; + คือ ให้
แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน; mb คือ ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ; 0 คือ ไม่ให้แถบดีเอ็นเอ

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	แตงกวา 8 accessions และ 8 สายพันธุ์	แคนตาลูป (<i>C. melo</i>)	แตงโม (<i>Citrullus vulgaris</i>)	ฟักทอง (<i>Cucurbita spp.</i>)	มะระ (<i>Momordica charantia L.</i>)
CMCT602	P	0	0	0	0
CMCT619	P	+	++	+	0
CMCT632	P	++	0	0	0
CMCT641	P	++	++	+	+
CMCT651	P	++	0	0	+
CMCT656	P	++	0	+	+
CMCT661	P	++	+	+	+
CMCT662	P	++	++	+	+
CMCT664	P	++	++	+	+
CMCT674	P	++	++	0	0
CMCT720	P	mb	+	+	+
CMCT726	P	++	++	0	+
CMCT746	P	++	mb	0	0
CMCT775	P	++	+	0	+
CMCT781	P	++	++	0	0
CMCT799	P	0	0	0	0
CMCT904	P	++	++	0	+
CMCT933	P	++	+	0	0
CMCT944	P	++	++	0	+
CMCT950	P	0	0	0	0
CMCT12	M	++	++	+	+
CMCT36	M	0	0	0	0
CMCT57	M	++	++	0	0
CMCT62	M	++	++	0	+
CMCT79	M	++	mb	0	+
CMCT194	M	0	0	0	0
CMCT309	M	++	0	0	mb

หมายเหตุ P คือ Polymorphic; M คือ Monomorphic; ++ คือ ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน; + คือ ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน; mb คือ ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ; 0 คือ ไม่ให้แถบดีเอ็นเอ

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	แตงกวา 8 accessions และ 8 สายพันธุ์	แคนตาลูป (<i>C. melo</i>)	แตงโม (<i>Citrullus vulgaris</i>)	ฟักทอง (<i>Cucurbita spp.</i>)	มะระ (<i>Momordica charantia L.</i>)
CMCT609	M	0	mb	0	0
CMCT663	M	++	mb	0	0
CMCT691	M	0	mb	0	0
CMCT742	M	0	0	0	0
CMCT776	M	++	mb	0	0

หมายเหตุ P คือ Polymorphic; M คือ Monomorphic; ++ คือ ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน; + คือ ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน; mb คือ ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ; 0 คือ ไม่ให้แถบดีเอ็นเอ

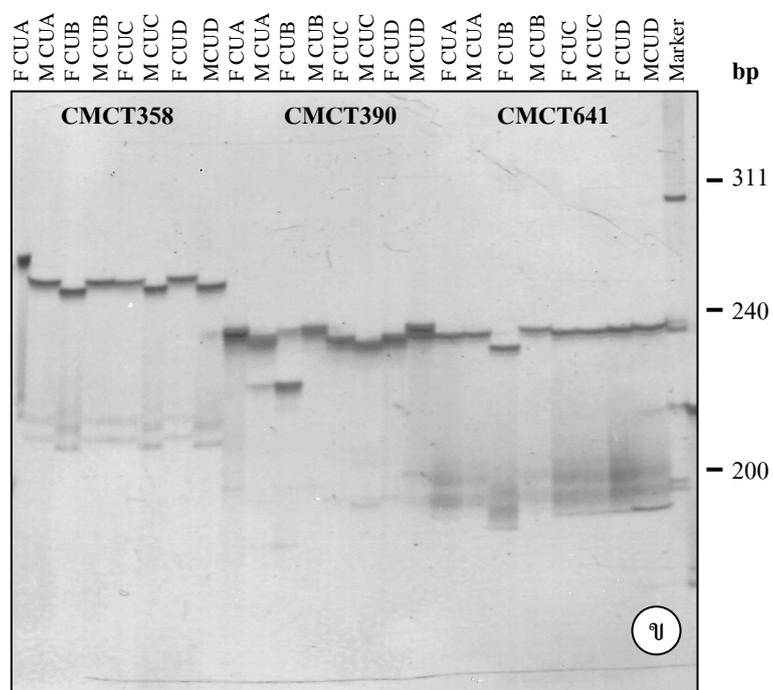
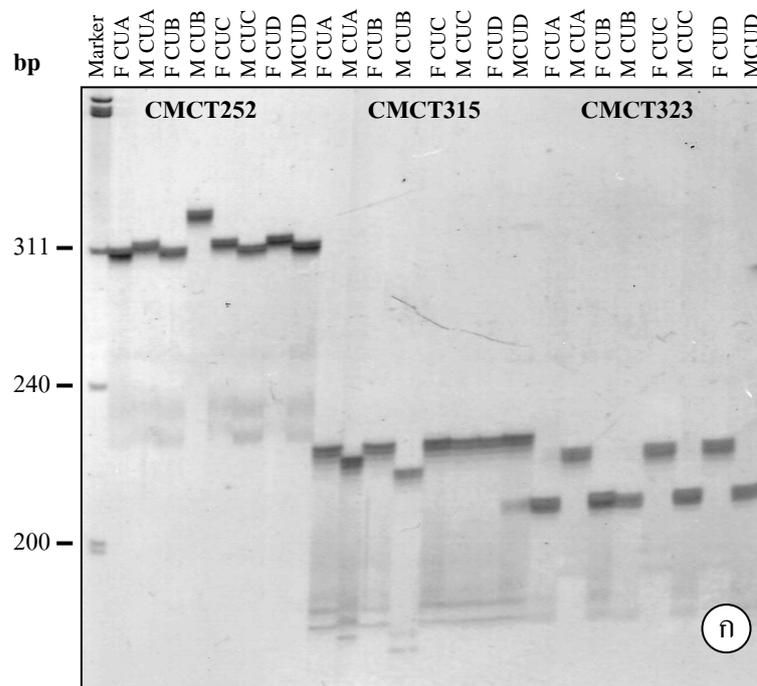
4. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (Genetic purity testing)

4.1 การตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อ (parental polymorphism survey)

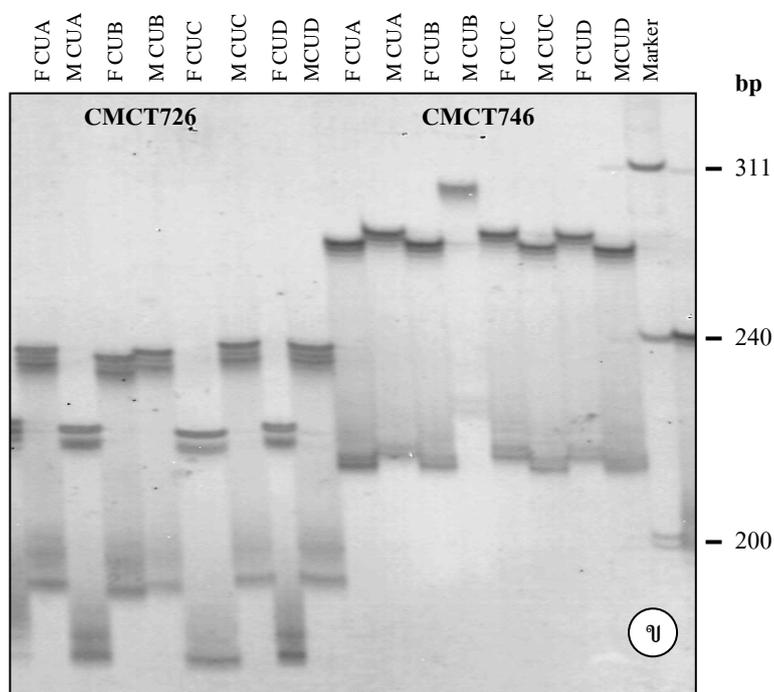
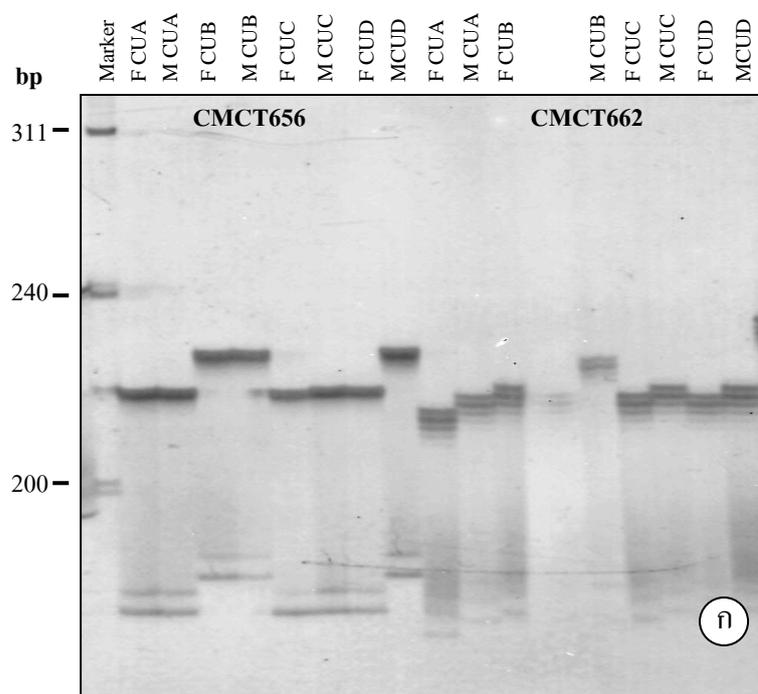
จากการตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อของแตงกวาลูกผสม แต่ละสายพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite 10 ตำแหน่ง พบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 6 ตำแหน่ง คือ CMCT252, CMCT358, CMCT390, CMCT662, CMCT726 และ CMCT746 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมทั้ง 4 พันธุ์ได้ ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT323 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อของแตงกวาลูกผสม 3 พันธุ์ คือ CUA, CUC และ CUD และดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT315 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อของแตงกวาลูกผสมพันธุ์ CUA และ CUB ขณะที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT641 และ CMCT 656 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อของแตงกวาลูกผสมพันธุ์ CUB และ CUD ตามลำดับ (ตารางที่ 8 ภาพที่ 6 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 8 การตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อที่ใช้สร้างเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสม 4 พันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 10 ตำแหน่ง (parental polymorphism survey)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ขนาดอัลลีลของแม่และพ่อที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมทั้ง 4 พันธุ์ (คู่เบส)							
	ลูกผสม CUA		ลูกผสม CUB		ลูกผสม CUC		ลูกผสม CUD	
	แม่	พ่อ	แม่	พ่อ	แม่	พ่อ	แม่	พ่อ
CMCT252	308	314	308	334	316	312	318	312
CMCT315	220	216	220	214	220	220	220	220
CMCT323	208	218	208	208	218	208	218	208
CMCT358	272	262	258	262	262	258	262	258
CMCT390	238	235	222	238	234	232	234	240
CMCT641	238	238	233	240	238	238	238	238
CMCT656	214	214	222	222	214	214	214	222
CMCT662	212	214	216	220	214	216	214	216
CMCT726	232, 236	214,216	230, 234	232, 236	214,216	232, 236	214,216	232, 236
CMCT746	276	280	276	300	280	276	280	276
ระดับ Polymorphism	80%		80%		70%		80%	



ภาพที่ 6 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 6 ตำแหน่ง ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อที่ใช้สร้างแดงกวางลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 4 สายพันธุ์



ภาพที่ 7 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 4 ตำแหน่ง ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อที่ใช้สร้างแดงกวางลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 4 สายพันธุ์

ตารางที่ 9 จำนวนอัลลีล, ค่า Polymorphism Information Content (PIC), ค่า Probability of Identity (PI) และค่า PI รวมของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 10 ตำแหน่ง

จำนวนดีเอ็นเอ เครื่องหมาย (ตำแหน่ง)	ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	จำนวนอัล ลีล	ค่า PIC	ค่า PI	ค่า PI รวม	1 ใน ... (โคลน)
1	CMCT662	6	0.6853	0.1156	0.1156	9
2	CMCT746	6	0.6598	0.1294	0.01443844	69
3	CMCT252	6	0.6288	0.1521	0.002196087	455
4	CMCT323	5	0.6126	0.1634	0.000358841	2,787
5	CMCT315	4	0.5972	0.1783	6.39813×10^{-5}	15,630
6	CMCT358	4	0.5880	0.1882	1.20413×10^{-5}	83,048
7	CMCT390	5	0.5381	0.2246	2.70447×10^{-6}	369,758
8	CMCT656	3	0.5105	0.2475	6.69356×10^{-7}	1,493,972
9	CMCT726	3	0.5105	0.2475	1.65666×10^{-7}	6,036,252
10	CMCT641	4	0.4523	0.2978	4.93353×10^{-8}	20,269,482
ค่าเฉลี่ย		4.6	0.58	0.19		
ผลคูณรวม					4.9×10^{-8}	2.0×10^7

4.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (Genetic purity testing)

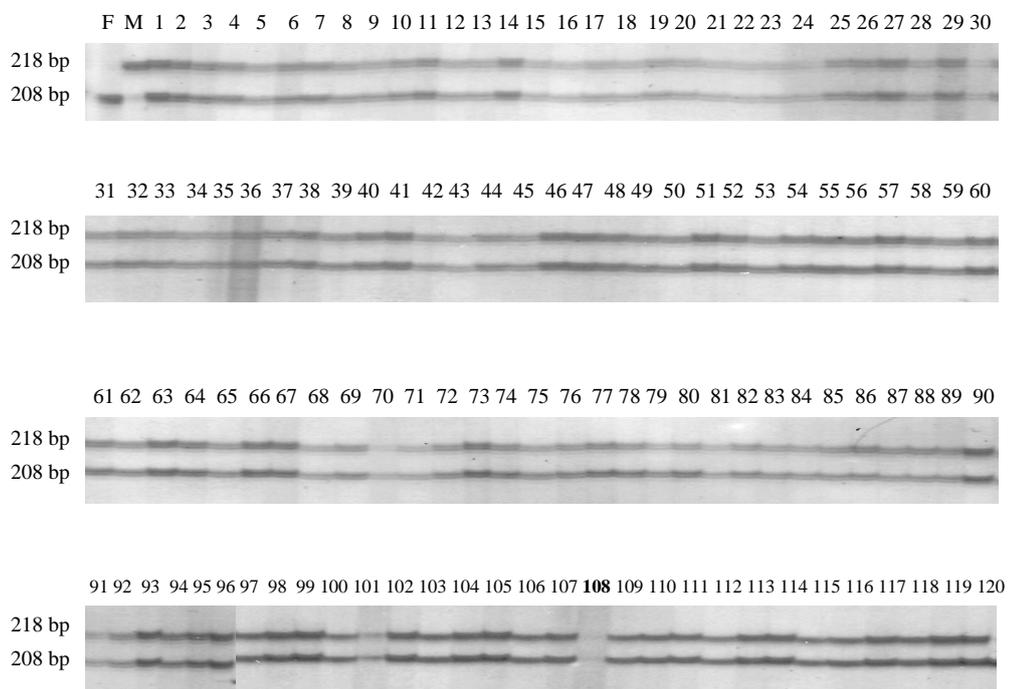
การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์แดงกลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 3 พันธุ์ (CUA, CUC และ CUD) โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ตำแหน่ง CMCT323 พบว่าแดงกลูกผสมพันธุ์ CUA และ CUC มีความบริสุทธิ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และแดงกลูกผสมพันธุ์ CUD มีความบริสุทธิ์เป็น 99.15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 8, 10 และ 11) ขณะที่ผลการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ตำแหน่ง CMCT252 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์แดงกลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ CUB มีความบริสุทธิ์เป็น 95.45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 9)

กรณีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในพันธุ์ CUB ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT252 พบว่าแดงกลูกจำนวน 5 ต้น ได้แก่ต้น CUB2, CUB13, CUB16, CUB76 และ CUB85 เป็นต้นที่ไม่ใช่ลูกผสมแต่เป็นต้น off type (ภาพที่ 9) แต่เมื่อนำตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ตำแหน่งอื่นๆ อีก 7 ตำแหน่ง พบว่าผลการตรวจสอบไม่สอดคล้องกันคือการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอ เครื่องหมายตำแหน่ง CMCT315 และ CMCT746 ให้ผลเหมือนกับการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอ เครื่องหมายตำแหน่ง CMCT252 คือต้นเตงกวาทั้ง 5 ต้นเป็นต้น off type ส่วนการตรวจด้วยดีเอ็นเอ เครื่องหมายตำแหน่ง CMCT358, CMCT641, CMCT662 และ CMCT726 พบว่าเป็นต้นผสมตัวเอง (self) ในขณะที่การตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT 390 พบว่าเตงกวาทั้ง 5 ต้น เป็นลูกผสม (ตารางที่ 11 และภาพที่ 12)

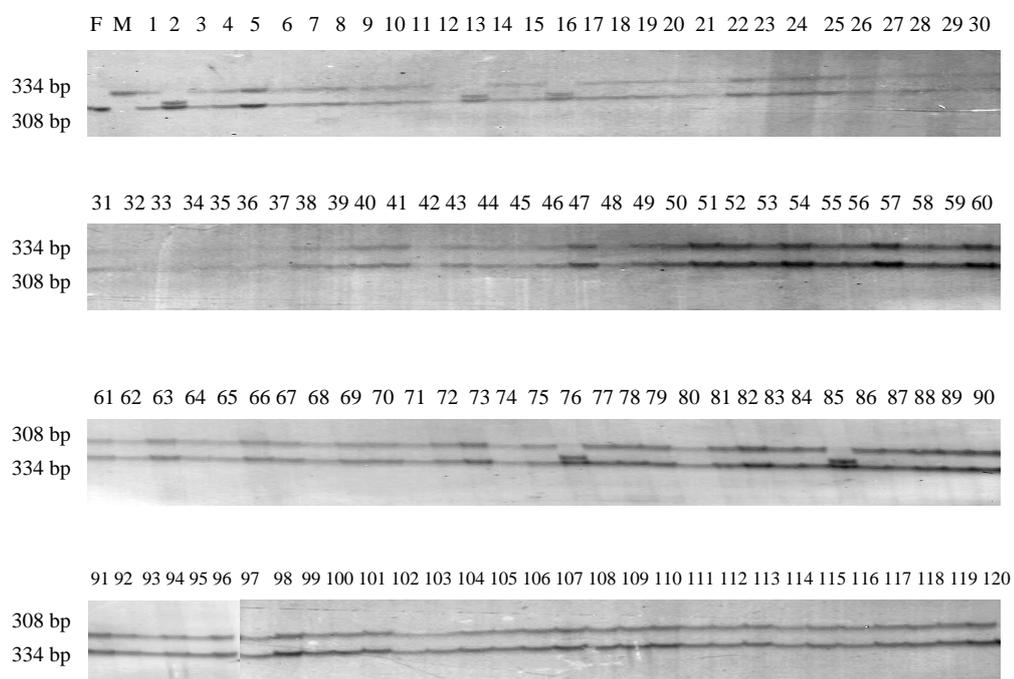
ตารางที่ 10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์เตงกวา 4 สายพันธุ์โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite

พันธุ์ เตงกวา ลูกผสม	ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	จำนวน ต้น	Missing data	จำนวน ต้น	การผสมตัวเอง (เปอร์เซ็นต์)	ลักษณะ Off type (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ ทางพันธุกรรม (เปอร์เซ็นต์)
CUA	CMCT323	120	1	119	0	0	100
CUB	CMCT252	120	10	110	0	4.55	95.45
CUC	CMCT323	120	1	119	0	0	100
CUD	CMCT323	120	3	117	0.85	0	99.15

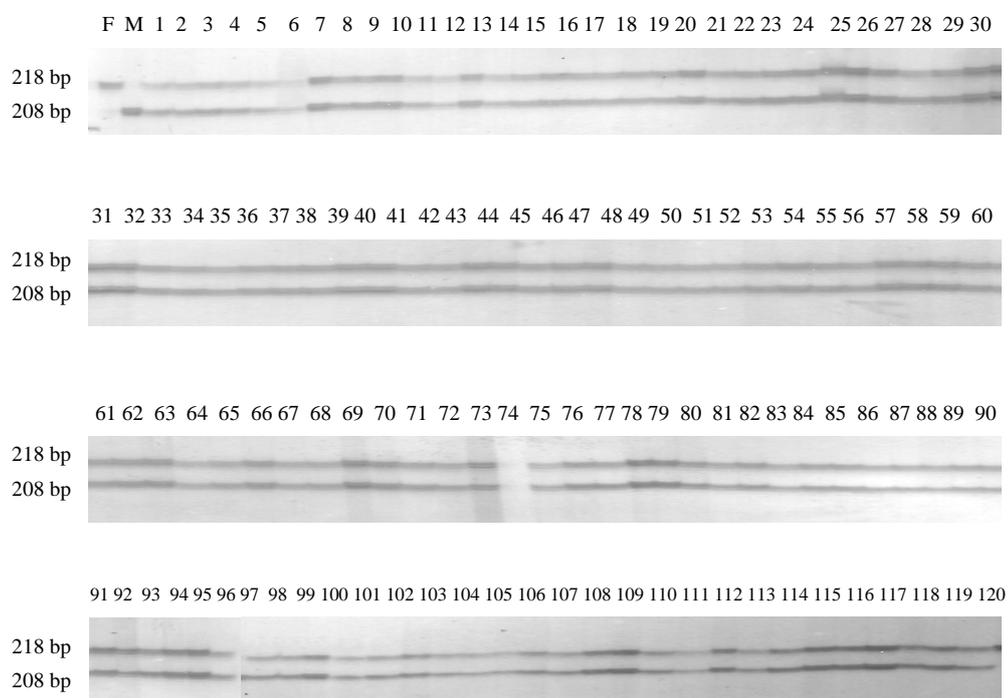


ภาพที่ 8 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมพันธุ์ CUA จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT323 (F=ต้นแม่, M=ต้นพ่อ, Lane1-120 = แตงกวาลูกผสมต้นที่ 1-120)

หมายเหตุ ต้นที่ CUA18 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ (missing data)

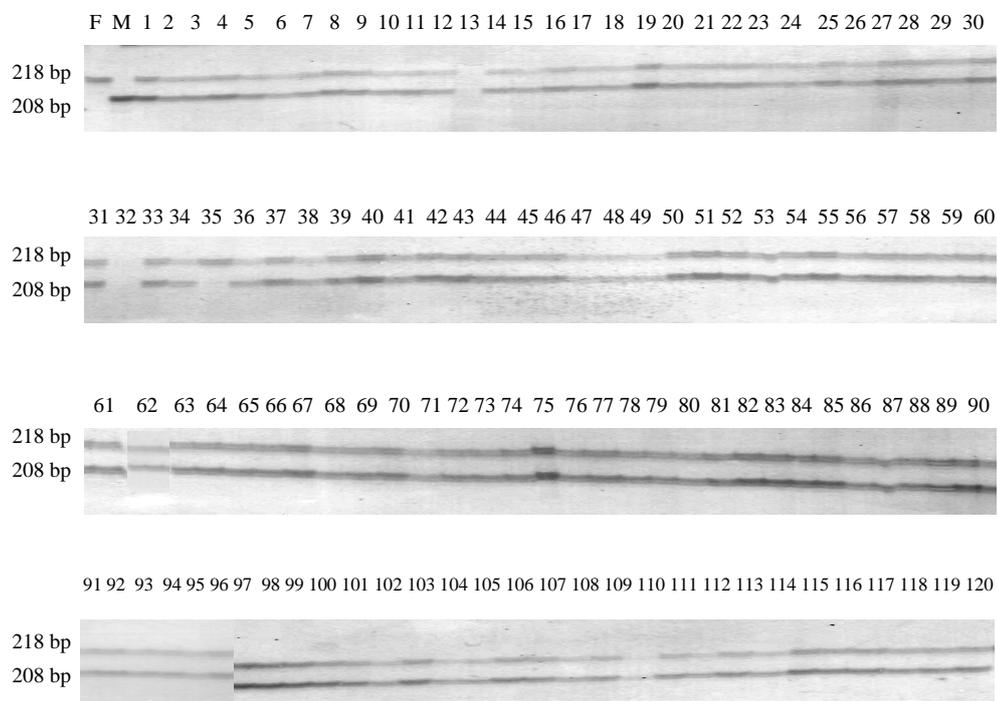


ภาพที่ 9 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกวางลูกผสมพันธุ์ CUB จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT252 (F=ต้นแม่, M=ต้นพ่อ, Lane1-120 = แแดงกวางลูกผสมต้นที่ 1-120)



ภาพที่ 10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมพันธุ์ CUC จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT323 (F=ต้นแม่, M=ต้นพ่อ, Lane1-120 = แตงกวาลูกผสมต้นที่ 1-120)

หมายเหตุ ต้นที่ CUC74 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ (missing data)

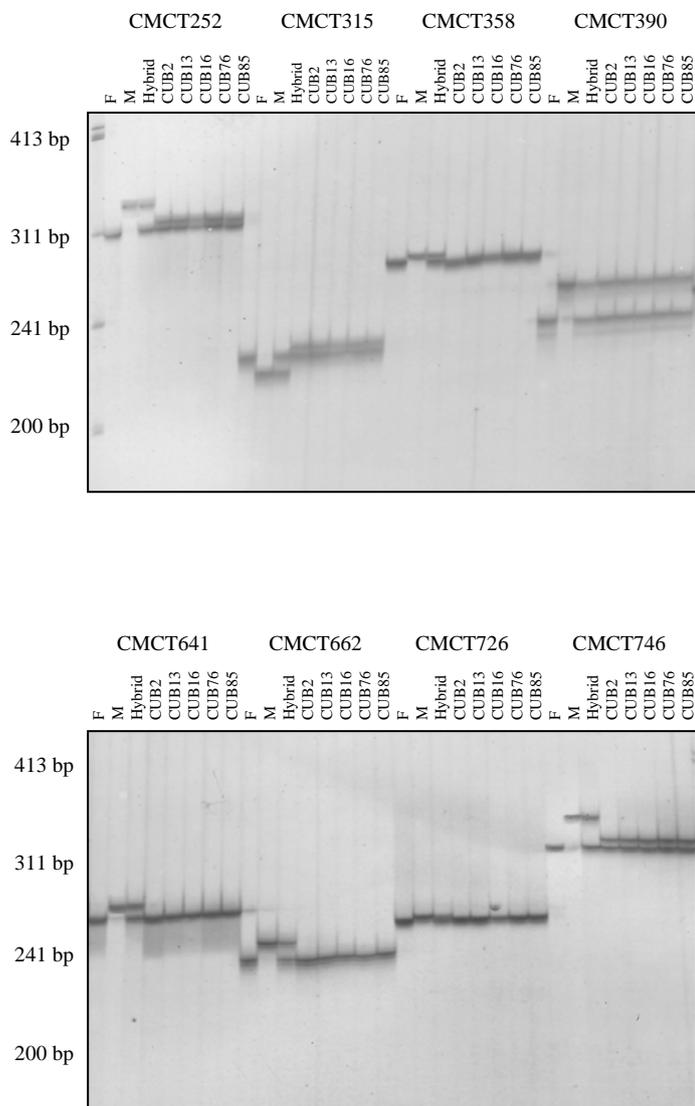


ภาพที่ 11 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกวางลูกผสมพันธุ์ CUD จำนวน 120 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ตำแหน่ง CMCT323 (F=ต้นแม่, M=ต้นพ่อ, Lane1-120 = แแดงกวางลูกผสมต้นที่ 1-120)

หมายเหตุ ต้นที่ CUD13, 32 และ 110 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ (missing data)

ตารางที่ 11 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในแดงกวาสายพันธุ์ CUB2, CUB13, CUB16, CUB76 และ CUB85 ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 7 ตำแหน่ง

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	ต้น CUB2	ต้น CUB13	ต้น CUB16	ต้น CUB76	ต้น CUB85
CMCT252	Off type	Off type	Off type	Off type	Off type
CMCT315	Off type	Off type	Off type	Off type	Off type
CMCT358	Self	Self	Self	Self	Self
CMCT390	Hybrid	Hybrid	Hybrid	Hybrid	Hybrid
CMCT641	Self	Self	Self	Self	Self
CMCT662	Self	Self	Self	Self	Self
CMCT726	Self	Self	Self	Self	Self
CMCT746	Off type	Off type	Off type	Off type	Off type



ภาพที่ 12 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในแดงกวางสายพันธุ์ CUB2, CUB13, CUB16, CUB76 และ CUB85 ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite จำนวน 7 ตำแหน่ง (F คือ ตันแม่ M คือ ตันพ่อ)

5. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

5.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี GOT (Grow Out Testing)

เริ่มทำการเพาะตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แดงกวาลูกผสมในวันที่ 3 สิงหาคม 2548 และย้ายปลูกลงแปลงปลูกเมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2548 หลังจากต้นพืชเจริญเติบโตและแสดงผลทางฟีโนไทป์ที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ เจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพเมล็ดพันธุ์และผู้เชี่ยวชาญด้านการจำแนกสายพันธุ์ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม พบว่า

หลังจากย้ายปลูกประมาณ 21 วันสามารถทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกวาลูกผสมพันธุ์ CUA ได้ในช่วง vegetative period โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของความหยักของขอบใบเป็นเป็นลักษณะบ่งชี้เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่าง แม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม โดยต้นแม่มีลักษณะของขอบใบเรียบขณะที่ต้นพ่อมีลักษณะขอบใบหยักมาก และลูกผสมที่ได้จะมีลักษณะของขอบใบหยักเล็กน้อย ซึ่งผลของการตรวจสอบพบว่า ต้นแดงกวาลูกผสมจำนวน 119 ต้นเป็นลูกผสมที่แท้จริง ขณะที่ต้นแดงกวาลูกผสมหมายเลข CUA21 ไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากเกิดเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ดังนั้นเมล็ดพันธุ์แดงกวาลูกผสมชุดนี้มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12 และภาพที่ 13)

หลังจากย้ายปลูกประมาณ 30 วันสามารถทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแดงกวาลูกผสมพันธุ์ CUB ได้ในช่วงระยะเจริญพันธุ์ (reproductive period) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการแสดงออกทางเพศดอกแดงกวาลูกผสม (sex expression) เป็นลักษณะบ่งชี้เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่าง แม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม โดยต้นแม่มีลักษณะการแสดงออกทางเพศดอกแบบ gynoeious ขณะที่ต้นพ่อมีลักษณะเพศดอกแบบ monoecious และลูกผสมมีลักษณะของการแสดงออกทางเพศดอกแบบ monoecious ซึ่งผลของการตรวจสอบพบว่า เมล็ดพันธุ์แดงกวาลูกผสมชุดนี้มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ คือต้นแดงกวาลูกผสมทั้ง 120 ต้น มีลักษณะของการแสดงออกทางเพศดอกแบบ monoecious (ตารางที่ 12 และภาพที่ 13)

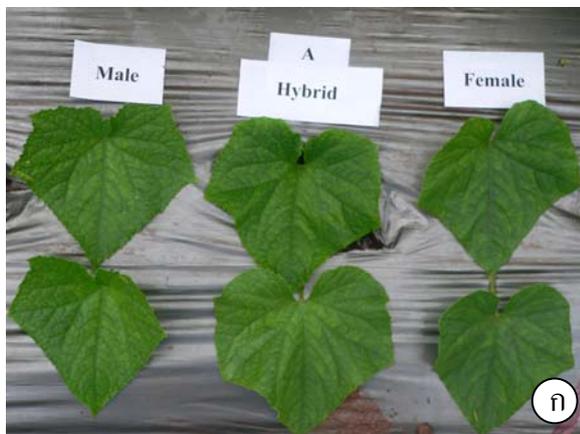
หลังจากย้ายปลูกประมาณ 33 วันสามารถทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแดงกวาลูกผสมพันธุ์ CUC ได้ในช่วงระยะเจริญพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของขนาดผลสีผิวและสีของหนามแดงกวาลูกผสมเป็นลักษณะบ่งชี้เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่าง แม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม โดยพบว่าต้นแม่มีลักษณะขนาดผลยาวสีเขียวอ่อนและหนามสีขาว ขณะที่ต้นพ่อมี

ลักษณะขนาดผลสั้นสีเขียวเข้มและหนามสีขาว ดังนั้นลูกผสมที่ได้จะมีลักษณะของผลแบบ ขนาดผลยาวสีเขียวและหนามสีขาว ซึ่งผลของการตรวจสอบพบว่า เมล็ดพันธุ์แดงกลูกผสมชุดนี้มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

หลังจากย้ายปลูกประมาณ 33 วันสามารถทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแดงกลูกผสมพันธุ์ CUD ในช่วง ระยะเจริญพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของขนาดผล สีผิวผลและสีของหนามแดงกลูก เป็นลักษณะบ่งชี้เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างแม่พันธุ์ พ่อพันธุ์ และลูกผสม โดยต้นแม่มีลักษณะขนาดผลยาวสีเขียวอ่อนและหนามสีขาว ขณะที่ต้นพ่อมีลักษณะขนาดผลสั้นสีเขียวเข้มและหนามสีขาว ดังนั้นลูกผสมที่ได้จะมีลักษณะของผลแบบ ขนาดผลยาวสีเขียวและหนามสีขาว ซึ่งผลของการตรวจสอบพบว่า ต้นแดงกลูกจำนวน 119 ต้นเป็นลูกผสมที่แท้จริง ขณะที่ต้นแดงกลูกหมายเลข CUD35ไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ดังนั้นเมล็ดพันธุ์แดงกลูกผสมชุดนี้มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแดงกลูกผสม 4 สายพันธุ์โดยใช้วิธี GOT และเทคนิค SSLP

พันธุ์แดงกลูกผสม	GOT			SSLP		
	ระยะเวลาที่ใช้ตรวจสอบ (วัน)	จำนวนแรงงานที่ใช้ตรวจสอบ (คน)	ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลาที่ใช้ตรวจสอบ (วัน)	จำนวนแรงงานที่ใช้ตรวจสอบ (คน)	ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (เปอร์เซ็นต์)
CUA	21	4	100	3	2	100
CUB	30	4	100	3	2	95.45
CUC	35	4	100	3	2	100
CUD	35	4	100	3	2	99.15



ภาพที่ 13 ก.) ความแตกต่างของขอบใบ ระหว่างต้นแม่ พ่อ และลูกผสม ของแตงกวาสายพันธุ์ CUA
 ข.) ความแตกต่างทาง sex expression ระหว่างต้นแม่ พ่อ และลูกผสม ของแตงกวาสายพันธุ์ CUB

5.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SSLP

คัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายจากผลการทดลอง ข้อ 4.1 หน้า 58 เพื่อใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม นำตัวอย่างใบแดงลูกผสมกว่าจำนวน 4 พันธุ์ (480 ต้น) ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในวันที่ 9 สิงหาคม 2548 มาสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลด้วยเจล electrophoresis และ silver staining โดยใช้ระยะเวลาตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมเป็นเวลา 3 วัน และผลการตรวจสอบพบว่าแดงกว่าสายพันธุ์ CUA และ CUC มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่แดงกว่าสายพันธุ์ CUD และ CUB มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเป็น 99.15 เปอร์เซ็นต์ และ 95.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

5.3 การเปรียบเทียบผลการตรวจสอบ

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในชุดแดงกว่าลูกผสม 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค SSLP และวิธี GOT พบว่า การตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP ใช้แรงงานเพียง 2 คนต่อ การตรวจสอบตัวอย่าง 120 ตัวอย่างโดยใช้ระยะเวลาเพียง 3 วัน ขณะที่ GOT ใช้แรงงานอย่างน้อย 4 คน โดยใช้ระยะเวลา 21-33 วัน

การวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

ข้อมูลทั่วไปของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสม

การดำเนินการตรวจสอบด้วยวิธี GOT

จากการสัมภาษณ์ผู้ประกอบการแบบสอบถามสามารถอธิบายถึงสภาพการดำเนินการจ้างเกษตรกรปลูกทดสอบของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ ณ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ปีการเพาะปลูก 2548 พบว่าบริษัทได้ดำเนินการจ้างเกษตรกรทั้งหมด 7 รายทำการปลูกทดสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวา ภายใต้ข้อตกลงระหว่างบริษัทและเกษตรกร โดยที่เกษตรกรผู้รับจ้างปลูกดูแลรักษาจะได้รับค่าจ้างเป็นจำนวนเงินประมาณ 3 บาทต่อต้น แต่เกษตรกรจะต้องเป็นผู้ซื้อต้นกล้าจากบริษัทเป็นเงินประมาณ 0.45 บาทต่อต้น และเสียค่าใช้จ่ายในการใช้ปัจจัยการผลิตทั้งหมด (บริษัทจะมีต้นทุนค่าจ้างปลูกทดสอบคือประมาณ 2.55 บาทต่อต้น) และหลังจากการตรวจสอบเสร็จสิ้นเกษตรกรสามารถนำผลผลิตไปจำหน่ายได้ โดยที่รายได้จากการจำหน่ายผลผลิตเกษตรกรเป็นผู้ได้รับทั้งหมด สำหรับขั้นตอนการดำเนินการจ้างปลูกทดสอบประกอบด้วย บริษัทจะเป็นผู้ผลิตต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทนของชุดเมล็ดพันธุ์ (seed lot) จำนวน 120 ต้นต่อชุดเมล็ดพันธุ์ จากนั้นจำหน่ายต้นกล้าจำนวน 2,400 ต้นให้เกษตรกรดำเนินการปลูกและดูแลรักษาในแปลงปลูกขนาด 1 งาน ซึ่งเกษตรกรใช้แรงงานประมาณ 2-4 คนดำเนินการปลูกภายใต้คำแนะนำของบริษัทและเมื่อครบกำหนดตามระยะเวลาที่สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ (ระยะเวลาขึ้นอยู่กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืชที่สามารถใช้ในการตรวจสอบได้) เจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพเมล็ดพันธุ์และผู้เชี่ยวชาญหรือนักปรับปรุงพันธุ์จะเป็นผู้ดำเนินการตรวจสอบต้นพืช

ฤดูการปลูกทดสอบโดยทั่วไปจะดำเนินการในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ โดยจะเริ่มเพาะต้นกล้าในช่วงเดือนสิงหาคมและเริ่มตรวจสอบในช่วงเดือนกันยายนเป็นต้นไป

การดำเนินการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP

สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP พบว่ามีขั้นตอนของการตรวจสอบอยู่ 3 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรกเป็นการสกัดดีเอ็นเอโดยการนำใบเลี้ยงของต้นกล้าอายุประมาณ 6-9 วัน ขนาดครึ่งใบมาสกัดดีเอ็นเอ (ในขั้นตอนนี้หากมีปริมาณตัวอย่างที่ต้องสกัดดีเอ็นเอมากกว่า 200 ต้น

จำเป็นต้องใช้ผู้ทำการตรวจสอบประมาณ 2 คน และในขั้นตอนนี้จะไม่ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอเนื่องจากผู้ปฏิบัติมีความชำนาญในการสกัดดีเอ็นเอเป็นอย่างดี) ขั้นตอนที่สองเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้แรงงาน 1 คน จากนั้นขั้นตอนที่สามทำการตรวจสอบผล PCR product ด้วยวิธี electrophoresis และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ในขั้นตอนนี้ใช้แรงงาน 1 คน โดยการตรวจสอบด้วยวิธีการนี้ใช้แรงงานประมาณ 2 คน ช่วงเวลาการตรวจสอบสามารถทำการตรวจสอบได้ตลอดเวลา

ผลการวิเคราะห์ทางเศรษฐศาสตร์

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบต้นทุนทางเศรษฐศาสตร์ของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมในกรณีการทดสอบด้วยวิธี GOT และเทคนิค SSLP ในปี 2548 โดยผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนของการตรวจสอบ ส่วนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตของการตรวจสอบด้วยวิธี SSLP

ในการศึกษาครั้งนี้ได้จำแนกต้นทุนในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสม ออกเป็น 2 รายการ คือต้นทุนจากการใช้วิธี GOT และ ต้นทุนจากการใช้เทคนิค SSLP

ต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยวิธี GOT ในกรณีบริษัทจ้างเกษตรกรปลูกทดสอบ

ดำเนินการเก็บข้อมูลต้นทุนในช่วงวันที่ 3 สิงหาคมถึงวันที่ 15 ตุลาคม 2548 โดยต้นทุนของการตรวจสอบจะพิจารณาด้านทุนที่เป็นเงินสดและด้านทุนที่ไม่เป็นเงินสด และพิจารณาเป็นต้นทุนผันแปร (variable cost) ที่ประกอบด้วย ค่าจ้างแรงงานปลูกดูแลรักษา และค่าเสียโอกาสการลงทุน ต้นทุนคงที่ (fixed cost) ประกอบด้วย ค่าจ้างเจ้าหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพและผู้เชี่ยวชาญ และ ค่าเสียโอกาสการลงทุน โดยคำนวณต้นทุนตามระยะเวลาการตรวจสอบที่ระยะเวลา 21 และ 33 วัน โดยคิดต้นทุนต่อการตรวจสอบต้นแตงกวาลูกผสมจำนวน 20 ชุดเมล็ดพันธุ์ หรือ 2,400 ต้น ภายในพื้นที่ที่ตรวจสอบ 100 ตารางวาหรือ 1 งาน และหน่วยสุดท้ายของต้นทุนคิดในรูปต้นทุนต่อการตรวจสอบ 1 ตัวอย่างหรือต้นพืช โดยมีผลดังนี้

การคิดค่าแรงงานที่ใช้ในตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแดงกวางลูกผสม แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ค่าจ้างแรงงานรายวันดำเนินการปลูกและดูแลรักษา คิดตามอัตราค่าจ้างบริษัทตั้งไว้ โดยคิดเป็นค่าจ้างปลูกต่อต้น ประเภทที่สองคือค่าจ้างแรงงานประจำ (เงินเดือนประจำ) คิดตามอัตราค่าจ้างแรงงานตามวุฒิการศึกษาและประสบการณ์ทำงาน (เป็นการประเมินโดยผู้ทำการศึกษา) และคิดค่าจ้างแรงงานภายใต้เงื่อนไขในกรณีที่ใช้แรงงานเต็มที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนต้นทุนผันแปร คิดจากต้นทุนผันแปรที่เป็นเงินสดทั้งหมดคูณกับอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 (ตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจ เดือนสิงหาคม ปี 2548) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน

ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนต้นทุนคงที่ คิดจากต้นทุนคงที่ที่เป็นเงินสดทั้งหมดคูณกับอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 (ตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจเดือนสิงหาคม ปี 2548) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน

จากตารางที่ 13 พบว่าต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT โดยการจ้างเกษตรกรของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ ณ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ที่ระยะเวลา 21 วัน มีต้นทุนรวมทั้งหมดเท่ากับ 18.04 บาทต่อต้น โดยประกอบด้วยต้นทุนผันแปรคือ 2.56 บาทต่อต้นและต้นทุนคงที่ 15.48 บาทต่อต้น เมื่อคิดต้นทุนออกมาเป็นร้อยละ ต้นทุนส่วนใหญ่คือต้นทุนคงที่ โดยคิดเป็นร้อยละ 85.81 ของต้นทุนทั้งหมด ขณะที่ต้นทุนผันแปรเท่ากับร้อยละ 14.19 ของต้นทุนทั้งหมด ต้นทุนคงที่ประกอบด้วยจ้างค่าแรงงานในการจัดการและการตรวจสอบ ซึ่งเป็นต้นทุนส่วนใหญ่โดยคิดเป็นร้อยละ 85.50 ของต้นทุนทั้งหมด รองลงมาได้แก่ ค่าจ้างแรงงานเกษตรกรปลูกคิดเป็นร้อยละ 14.14 ของต้นทุนทั้งหมด

จากตารางที่ 14 พบว่า ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT โดยการจ้างเกษตรกรของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ ณ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ที่ระยะเวลา 33 วัน มีต้นทุนรวมทั้งหมดเท่ากับ 33.56 บาทต่อต้น โดยประกอบด้วยต้นทุนผันแปรคือ 2.56 บาทต่อต้นและต้นทุนคงที่ 31.00 บาทต่อต้น เมื่อคิดต้นทุนออกมาเป็นร้อยละ ต้นทุนส่วนใหญ่คือต้นทุนคงที่ โดยคิดเป็นร้อยละ 92.36 ของต้นทุนทั้งหมด ขณะที่ต้นทุนผันแปรเท่ากับร้อยละ 7.64 ของต้นทุนทั้งหมด ต้นทุนคงที่ประกอบด้วยจ้างค่าแรงงานในการจัดการและการตรวจสอบ ซึ่งเป็นต้นทุนส่วนใหญ่

ใหญ่โดยคิดเป็นร้อยละ 91.85 ของต้นทุนทั้งหมด รองลงมาได้แก่ ค่าจ้างแรงงานเกษตรกรปลูกคิดเป็นร้อยละ 7.60 ของต้นทุนทั้งหมด

ตารางที่ 13 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT โดยการจ้างเกษตรกร ดำเนินการปลูก ที่ระยะเวลา 21 วัน ในปีการเพาะปลูก 2548

รายการ	ต้นทุนต่อต้น (บาท)	ต้นทุนต่อ 120 ต้น (บาท)	ต้นทุนต่อ 2,400 ต้น (บาท)	ร้อยละ
ต้นทุนผันแปร				
ค่าจ้างปลูก	2.55	306	6,120.00	14.14
ค่าเสียโอกาส*	0.01	1.10	22.01	0.05
ต้นทุนผันแปรทั้งหมด	2.56	307.10	6,142.01	14.19
ต้นทุนคงที่				
แรงงานประจำ	15.42	1,850.00	37,000.00	85.50
เจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ	5.00	600.00	12,000.00	27.73
ผู้เชี่ยวชาญ	10.42	1,250.00	25,000.00	57.77
ค่าเสียโอกาส*	0.06	6.65	133.05	0.31
ต้นทุนคงที่ทั้งหมด	15.48	1,856.65	37,285.10	85.81
ต้นทุนรวมทั้งหมด	18.04	2,163.75	43,275.05	100

ที่มา: จากการสำรวจ

ตารางที่ 14 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT โดยการจ้างเกษตรกร
ดำเนินการปลูก ที่ระยะเวลา 33 วัน ในปีการเพาะปลูก 2548

รายการ	ต้นทุนต่อต้น (บาท)	ต้นทุนต่อ 120 ต้น (บาท)	ต้นทุนต่อ 2,400 ต้น (บาท)	ร้อยละ
ต้นทุนผันแปร				
ค่าจ้างปลูก	2.55	306	6,120.00	7.60
ค่าเสียโอกาส	0.01	1.73	34.58	0.04
ต้นทุนผันแปรทั้งหมด	2.56	307.73	6,154.58	7.64
ต้นทุนคงที่				
แรงงานประจำ	30.83	3,700.00	74,000.00	91.85
เจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ	10.00	1,200.00	24,000.00	29.79
ผู้เชี่ยวชาญ	20.83	2,500.00	50,000.00	62.06
ค่าเสียโอกาส	0.17	20.91	418.15	0.51
ต้นทุนคงที่ทั้งหมด	31.00	3,720.91	74,418.15	92.36
ต้นทุนรวมทั้งหมด	33.56	4,028.64	80,572.73	100

ที่มา: จากการสำรวจ

ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยวิธี GOT ในกรณีที่บริษัท ดำเนินการปลูกทดสอบเอง

ต้นทุนของการตรวจสอบจะพิจารณาถึงต้นทุนที่เป็นเงินสดและต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด โดยคำนวณในรูปของต้นทุนผันแปรซึ่งประกอบด้วย ส่วนที่ 1 ค่าจ้างแรงงานรายวันในการประกอบกิจกรรมต่างๆ (ค่าจ้างเพาะกล้ารายวัน ค่าจ้างปลูกและดูแลรักษารายวัน) ส่วนที่ 2 ค่าวัสดุการเกษตร (ค่าเมล็ดพันธุ์ ค่าวัสดุเพาะกล้า ค่ากระบะเพาะกล้า ค่าปุ๋ย ค่าสารเคมี ค่าค้ำ ค่าพลาสติกคลุมแปลง ค่าเชือก ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง) ส่วนที่ 3 ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าจ้างรถไถ ค่าซ่อมแซมวัสดุและอุปกรณ์) และค่าเสียโอกาสเงินลงทุนในต้นทุนผันแปร ซึ่งคิดจากต้นทุนผันแปรทั้งหมดคูณกับอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 ต่อปี (ตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจ เดือนสิงหาคม ปี 2548) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน ต้นทุนคงที่ประกอบด้วย ค่าเช่าที่ดิน ค่าเสื่อมราคาของเครื่องมืออุปกรณ์การเกษตร ค่าจ้างแรงงานรายเดือนของเจ้าหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพและผู้เชี่ยวชาญตรวจแปลงปลูกและค่าเสียโอกาสการลงทุนต้นทุนคงที่ โดยคำนวณต้นทุนตามระยะเวลาการตรวจสอบที่ระยะเวลา 21 และ 33 วัน โดยเป็นการคิดต้นทุนต่อการตรวจสอบในแตงกวาลูกผสมจำนวน 20 ชุดเมล็ดพันธุ์หรือ 2,400 ต้น ภายในพื้นที่เช่าตรวจสอบ 100 ตารางวา หรือ 1 งาน และหน่วยสุดท้ายของต้นทุนคิดเป็นต้นทุนต่อการตรวจสอบ 1 ต้นพืช

การคิดค่าแรงงานที่ใช้ในตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแตงกวาลูกผสม แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ค่าแรงงานจ้างรายวัน คิดตามอัตราค่าจ้างแรงงานรายวันในท้องที่ที่ทำการศึกษา จากการสำรวจค่าจ้างเพาะกล้าและดูแลรักษาอยู่ในช่วง 100-120 บาท ต่อวันต่อคน ประเภทที่สองคือ ค่าจ้างแรงงานประจำ (เงินเดือนประจำ) คิดตามอัตราค่าจ้างแรงงานตามวุฒิการศึกษาและประสบการณ์ทำงาน (เป็นการประเมินโดยผู้ทำการศึกษา) และคิดค่าจ้างแรงงานภายใต้เงื่อนไขในกรณีที่ใช้แรงงานเต็มที 100 เปอร์เซ็นต์

ค่าวัสดุการเกษตรที่ใช้ ได้แก่ ค่าเมล็ดพันธุ์ ค่ากระบะเพาะกล้า ค่าวัสดุเพาะกล้า ค่าปุ๋ย ค่าสารเคมี ค่าวัสดุคลุมแปลง ค่าเชือก และค่าน้ำมันเชื้อเพลิง ประเมินจากการสอบถามบริษัทเป็นผู้ดำเนินการและเกษตรกรผู้รับจ้างปลูก

ค่าใช้จ่ายอื่นๆ เช่น ค่าจ้างรถไถ ค่าซ่อมแซมวัสดุและอุปกรณ์ ประเมินจากการสอบถามเกษตรกรผู้รับจ้างปลูก

ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน คิดจากต้นทุนผันแปรที่เป็นเงินสดทั้งหมดคูณกับอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 (ตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจ) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน

ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนต้นทุนคงที่ คิดจากต้นทุนคงที่ที่เป็นเงินสดทั้งหมดคูณกับอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 (อ้างอิงตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจ) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน

ค่าใช้จ่ายที่ดิน คิดจากอัตราค่าเช่าที่ดินในท้องถิ่น ซึ่งรวมภาษีที่ดินอยู่ด้วย

ค่าเสื่อมราคาของเครื่องมือและอุปกรณ์การเกษตรเช่น ค่าเครื่องสูบน้ำ ค่าเครื่องพ่นยา ประเมินจากมูลค่าเครื่องมืออุปกรณ์การเกษตรที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยคิดแบบ Straight Line Method โดยได้ข้อมูลจากเกษตรกร

จากตารางที่ 15 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมด้วยวิธี GOT ที่ระยะเวลา 21 วัน พบว่าต้นทุนรวมทั้งหมดเท่ากับ 20.06 บาทต่อต้น คิดเป็นต้นทุนที่เป็นเงินสด 19.91 บาทต่อต้น และต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด 0.15 บาทต่อต้น โดยมีต้นทุนผันแปรเท่ากับ 4.49 บาทต่อต้น ส่วนต้นทุนคงที่ประกอบด้วย ค่าเช่าที่ดิน ค่าเสื่อมอุปกรณ์การเกษตร ค่าแรงงานจ้างรายเดือนและค่าเสียโอกาสเงินลงทุนมีค่าเท่ากับ 15.57 บาทต่อต้น เมื่อคิดต้นทุนออกมาเป็นร้อยละ ต้นทุนส่วนใหญ่คือ ต้นทุนคงที่คิดเป็นร้อยละ 77.62 ของต้นทุนทั้งหมด ซึ่งพบว่าต้นทุนส่วนใหญ่เป็นต้นทุนค่าจ้างแรงงานในการตรวจสอบโดยคิดเป็นร้อยละ 76.86 ขณะที่ต้นทุนผันแปรคิดเป็นร้อยละ 22.38 ของต้นทุนทั้งหมด

จากตารางที่ 16 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมด้วยวิธี GOT ที่ระยะเวลา 33 วัน พบว่าต้นทุนรวมทั้งหมดเท่ากับ 36.99 บาทต่อต้น คิดเป็นต้นทุนที่เป็นเงินสด 36.68 บาทต่อต้น และต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด 0.31 บาทต่อต้น โดยมีต้นทุนผันแปรเท่ากับ 5.82 บาทต่อต้น ส่วนต้นทุนคงที่ประกอบด้วย ค่าเช่าที่ดิน ค่าเสื่อมอุปกรณ์การเกษตร ค่าแรงงานจ้างรายเดือนและค่าเสียโอกาสเงินลงทุน มีค่าเท่ากับ 31.17 บาทต่อต้น เมื่อคิดต้นทุนออกมาเป็นร้อยละ ต้นทุนส่วนใหญ่คือ ต้นทุนคงที่คิดเป็นร้อยละ 84.28 ของต้นทุนทั้งหมด ซึ่งพบว่าต้นทุน

ส่วนใหญ่เป็นต้นทุนค่าจ้างแรงงานในการตรวจสอบโดยคิดเป็นร้อยละ 83.35 ของต้นทุนทั้งหมด ขณะที่ต้นทุนผันแปรคิดเป็นร้อยละ 15.72 ของต้นทุนทั้งหมด

ตารางที่ 15 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT ในกรณีของบริษัทเป็นผู้ดำเนินการปลูกทดสอบแดงกวาลูกผสมจำนวน 2,400 ต้น ในระยะเวลา 21 วัน ในปีการเพาะปลูก 2548

รายการ	ต้นทุนต่อ 2,400 ต้น			ต้นทุนต่อต้น	ร้อยละ
	เป็นเงินสด	ไม่เป็นเงินสด	รวม		
ต้นทุนผันแปร					
1. ค่าแรงงานรายวัน					
เพาะกล้า	120.00	-	120.00	0.05	0.25
ปลูกและดูแลรักษา	5,040.00	-	5,040.00	2.10	10.47
รวมแรงงานทั้งหมด	5,160.00	-	5,160.00	2.15	10.72
2. วัสดุปัจจัย					
เมล็ดพันธุ์	850.00	-	850.00	0.35	1.77
วัสดุเพาะ	465.80	-	465.80	0.19	0.97
กระบะเพาะ	448.12	-	448.12	0.19	0.93
ปุ๋ย	208.29	-	208.29	0.09	0.43
สารเคมี	204.74	-	204.74	0.09	0.43
ค้ำ	1,920.00	-	1,920.00	0.80	3.99
พลาสติกคลุมแปลง	419.80	-	419.80	0.17	0.87
เชือกฟาง	60.00	-	60.00	0.03	0.12
น้ำมัน	626.43	-	626.43	0.26	1.30
ต้นทุนปัจจัยทั้งหมด	5,203.18	-	5,203.18	2.17	10.81
3. อื่นๆ					
ค่าจ้างรถไถ	321.43	-	321.43	0.13	0.67
ค่าซ่อมแซมอุปกรณ์	50.22	-	50.22	0.02	0.10
ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน	-	38.60	38.60	0.02	0.08
ต้นทุนอื่นๆทั้งหมด	371.65	38.60	410.25	0.17	0.85
รวมต้นทุนผันแปรทั้งหมด	10,734.83	38.60	10,773.43	4.49	22.38
ต้นทุนคงที่					
ค่าเช่าที่ดิน	62.50	-	62.50	0.03	0.13
ค่าเสื่อมราคา	-	173.65	173.65	0.07	0.36
ค่าแรงงานเจ้าหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพ	12,000.00	-	12,000.00	5.00	24.93
ค่าแรงงานผู้เชี่ยวชาญ	25,000.00	-	25,000.00	10.42	51.93
ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน	-	133.27	133.27	0.06	0.28
รวมต้นทุนคงที่ทั้งหมด	37,062.50	306.92	37,369.42	15.57	77.62
ต้นทุนทั้งหมด	47,797.33	345.52	48,142.85	20.06	100

ที่มา: จากการสำรวจ

ตารางที่ 16 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT ในกรณีที่บริษัทเป็นผู้ดำเนินการปลูกทดสอบแดงกวางลูกผสมจำนวน 2,400 ต้น ในระยะเวลา 33 วัน ในปีการเพาะปลูก 2548

รายการ	ต้นทุนต่อ 2,400 ต้น			ต้นทุนต่อต้น	ร้อยละ
	เป็นเงินสด	ไม่เป็นเงินสด	รวม		
ต้นทุนผันแปร					
1. ค่าแรงงานรายวัน					
เพาะกล้า	120.00	-	120.00	0.05	0.14
ปลูกและดูแลรักษา	7,920.00	-	7,920.00	3.30	8.92
รวมแรงงานทั้งหมด	8,040.00	-	8,040.00	3.35	9.06
2. วัสดุปัจจัย					
เมล็ดพันธุ์	850.00	-	850.00	0.35	0.96
วัสดุเพาะ	465.80	-	465.80	0.19	0.52
กระบะเพาะ	448.12	-	448.12	0.19	0.50
ปุ๋ย	327.32	-	327.32	0.14	0.37
สารเคมี	321.73	-	321.73	0.13	0.36
ค้ำ	1,920.00	-	1,920.00	0.80	2.16
พลาสติกคลุมแปลง	419.80	-	419.80	0.17	0.47
เชือกฟาง	60.00	-	60.00	0.03	0.07
น้ำมัน	626.43	-	626.43	0.26	0.71
ต้นทุนปัจจัยทั้งหมด	5,439.20	-	5,439.20	2.27	6.13
3. อื่นๆ					
ค่าจ้างรถไถ	321.43	-	321.43	0.13	0.36
ค่าซ่อมแซมอุปกรณ์	78.91	-	78.91	0.03	0.09
ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน	-	78.43	78.43	0.03	0.09
ต้นทุนอื่นๆทั้งหมด	400.34	78.43	478.77	0.20	0.54
รวมต้นทุนผันแปรทั้งหมด	13,879.54	78.43	13,957.97	5.82	15.72
ต้นทุนคงที่					
ค่าเช่าที่ดิน	125.00	-	125.00	0.05	0.14
ค่าเสื่อมราคา	-	272.87	272.87	0.11	0.31
ค่าแรงงานเจ้าหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพ	24,000.00	-	24,000.00	10.00	27.03
ค่าแรงงานผู้เชี่ยวชาญ	50,000.00	-	50,000.00	20.83	56.32
ค่าเสียโอกาสเงินลงทุน	-	418.86	418.86	0.17	0.47
รวมต้นทุนคงที่ทั้งหมด	74,125.00	691.73	74,816.73	31.17	84.28
ต้นทุนทั้งหมด	88,004.54	770.16	88,774.69	36.99	100

ที่มา: จากการสำรวจ

ต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค SSLP

กรณีบริษัทดำเนินการจ้างตรวจสอบ

ต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยใช้เทคนิค SSLP ในกรณีการจ้างหรือการใช้บริการการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของหน่วยบริการทางชีวภาพ (Bioservice Unit; BSU) จะมีค่าจ้างตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมเท่ากับ 75 บาทต่อต้น

กรณีที่บริษัทดำเนินการตรวจสอบเอง

ทำการวิเคราะห์โดยไม่คิดต้นทุนค่าก่อสร้างอาคารสถานที่ ค่าซ่อมแซมและค่าการจัดการอื่นๆ โดยสมมติให้อยู่ภายใต้เงื่อนไขในกรณีที่มีโครงสร้างของห้องปฏิบัติการพร้อม เพียงแต่เพิ่มเครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค SSLP

ต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยใช้เทคนิค SSLP ใช้หลักการคำนวณต้นทุนระยะสั้น โดยพิจารณาถึงต้นทุนที่เป็นเงินสดและต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด โดยคำนวณในรูปของต้นทุนผันแปรซึ่งประกอบด้วย ส่วนที่ 1 ค่าวัสดุอุปกรณ์สิ้นเปลืองและสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ส่วนที่ 2 ค่าใช้จ่ายอื่นๆ ได้แก่ ค่าน้ำ ค่าไฟฟ้า ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนในต้นทุนผันแปร ซึ่งคิดจากต้นทุนผันแปรทั้งหมดคูณกับอัตราคิดลดร้อยละ 6.25 ต่อปี (ตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจ เดือนสิงหาคม ปี 2548) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน และต้นทุนคงที่ประกอบด้วย ค่าเสื่อมราคาของเครื่องมืออุปกรณ์ ค่าจ้างแรงงานประจำของประจำห้องปฏิบัติการและค่าเสียโอกาสการเงินลงทุนต้นทุนคงที่ โดยได้คำนวณต้นทุนตามระยะเวลาการตรวจสอบที่ระยะเวลา 21 และ 33 วัน และหน่วยสุดท้ายของต้นทุนต่อหน่วยคิดออกมาในรูปต้นทุนต่อการตรวจสอบ 1 ต้นพืช

ต้นทุนที่เกิดขึ้นจากการสกัดดีเอ็นเอ การทำปฏิกิริยา PCR และการตรวจสอบด้วยวิธีเจล electrophoresis เป็นการคำนวณอยู่ภายใต้เงื่อนไข ภายในระยะเวลา 3 วันสามารถทำการตรวจสอบได้ 244 ต้น หรือ 2 ชุดเมล็ดพันธุ์ (seed lot) ดังนั้น ในช่วงระยะเวลา 21 และ 33 วัน

สามารถทำการตรวจสอบได้ 1,708 ต้น (14 ชุดเมล็ดพันธุ์) และ 2,684 ต้น (22 ชุดเมล็ดพันธุ์) ตามลำดับ โดยใช้แรงงานเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ 2 คน

ค่าสารเคมีต่างๆที่ใช้ ประเมินจากการสอบถามเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ, บริษัทผู้ผลิตและจำหน่าย โดยคำนวณเป็นต้นทุนต่อหน่วยสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วย Spreadsheet

ค่าวัสดุอุปกรณ์สิ้นเปลืองที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ประเมินจากการสอบถามเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ บริษัทผู้ผลิตและจำหน่าย

ค่าใช้จ่ายอื่นๆ ได้แก่ ค่าน้ำ ค่าไฟฟ้า ได้ข้อมูลจากการสอบถามจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และประเมินโดยคิดค่าใช้จ่ายเป็น 5% ของค่าใช้จ่าย ค่าน้ำและค่าไฟฟ้าเฉลี่ยต่อเดือน

ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนต้นทุนผันแปร คิดจากต้นทุนผันแปรที่เป็นเงินสดทั้งหมดคูณกับอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 (ตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจ) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน

การคิดค่าเสื่อมราคาเครื่องมืออุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ประเมินจากการสอบถามจากการสอบถามราคาจากตัวแทนจำหน่าย โดยคิดแบบ Straight Line Method ภายใต้งี้อายุการใช้งานเครื่องมือต่างๆมีอายุการใช้งานเพียง 5 ปี โดยมีมูลค่าซากเป็นศูนย์

การคิดค่าแรงงานประจำ (เงินเดือนประจำ) คิดตามอัตราค่าจ้างแรงงานตามวุฒิการศึกษาและประสบการณ์ทำงาน และคิดค่าจ้างแรงงานภายใต้งี้อายุในกรณีที่ใช้แรงงานเต็มที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ข้อมูลจากการสอบถาม ผู้จัดการห้องปฏิบัติการ ดร. จุลภาค คุ่นวงศ์

ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนต้นทุนคงที่ คิดจากต้นทุนคงที่ที่เป็นเงินสดทั้งหมดคูณกับอัตราดอกเบี้ยร้อยละ 6.25 (อ้างอิงตามอัตราดอกเบี้ยเงินกู้ขณะทำการสำรวจ) ตามระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ 21 และ 33 วัน

จากตารางที่ 17 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเตงกวาลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP ที่ระยะเวลา 21 วัน พบว่าต้นทุนรวมทั้งหมดเท่ากับ 31.72 บาทต่อต้น คิดเป็นต้นทุนที่เป็นเงินสด 24.67 บาทต่อต้น และต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด 7.05 บาทต่อต้น โดยเป็นต้นทุนผันแปรเท่ากับ 14.77 บาทต่อต้น ซึ่งต้นทุนผันแปรประกอบด้วย ค่าสารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ ค่าน้ำ ค่าไฟฟ้า และค่าเสียโอกาส ส่วนต้นทุนคงที่มีค่าเท่ากับ 16.95 บาทต่อต้น ซึ่งประกอบด้วย ค่าเสื่อมราคา ค่าแรงงานจ้างประจำ และค่าเสียโอกาสเงินลงทุน เมื่อคิดต้นทุนออกมาเป็นร้อยละ ต้นทุนส่วนใหญ่คือต้นทุนคงที่คิดเป็นร้อยละ 53.44 ของต้นทุนทั้งหมด ขณะที่ต้นทุนผันแปร เท่ากับร้อยละ 46.56 ของต้นทุนทั้งหมด และเมื่อคิดต้นทุนรวมต้นทุนที่ใช้ในการเพาะกล้า (0.45 บาทต่อต้น) พบว่ามีต้นทุนรวมทั้งหมด 32.71 บาทต่อต้น

จากตารางที่ 18 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเตงกวาลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP ที่ระยะเวลา 33 วัน พบว่าต้นทุนรวมทั้งหมดเท่ากับ 34.84 บาทต่อต้น คิดเป็นต้นทุนที่เป็นเงินสด 27.71 บาทต่อต้น และต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด 7.12 บาทต่อต้น โดยเป็นต้นทุนผันแปรเท่ากับ 15.13 บาทต่อต้น ซึ่งต้นทุนผันแปรประกอบด้วย ค่าสารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ ค่าน้ำ ค่าไฟฟ้า และค่าเสียโอกาส ส่วนต้นทุนคงที่มีค่าเท่ากับ 19.71 บาทต่อต้น ซึ่งประกอบด้วย ค่าเสื่อมราคาของเครื่องมืออุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ค่าแรงงานจ้างรายเดือน และค่าเสียโอกาสเงินลงทุน เมื่อคิดต้นทุนออกมาเป็นร้อยละ ต้นทุนส่วนใหญ่คือต้นทุนคงที่คิดเป็นร้อยละ 56.58 ของต้นทุนทั้งหมด ขณะที่ต้นทุนผันแปรเท่ากับร้อยละ 43.42 ของต้นทุนทั้งหมด และเมื่อคิดต้นทุนรวมต้นทุนที่ใช้ในการเพาะกล้า (0.45 บาทต่อต้น) พบว่ามีต้นทุนรวมทั้งหมด 35.29 บาทต่อต้น

ตารางที่ 17 ต้นทุนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP กรณีที่ดำเนินการตรวจสอบที่ตัวอย่าง 1,708 ต้นในระยะเวลาการตรวจสอบ 21 วัน

รายการ	ต้นทุนต่อ 1,708 ต้นต่อดีเอ็นเอเครื่องหมาย 1 ตำแหน่ง			ต้นทุนต่อต้น ร้อยละ	
	เป็นเงินสด	ไม่เป็นเงินสด	รวม		
ต้นทุนผันแปร	25,141.84	90.41	25,232.25	14.77	46.56
วัสดุปัจจัย	23,141.84	-	23,141.84	13.55	42.70
สารเคมี	14,410.00	-	14,410.00	8.44	26.59
<i>Taq</i> polymerase	3,015.47	-	3,015.47	1.77	5.56
สารเคมีอื่นๆ	11,394.53	-	11,394.53	6.67	21.03
วัสดุอุปกรณ์	8,731.84	-	8,731.84	5.11	16.11
Pipette tip	2,273.96	-	2,273.96	1.33	4.20
Eppendorf tubes	2,456.72	-	2,456.72	1.44	4.53
PCR plate	2,988.51	-	2,988.51	1.75	5.51
วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ	1,012.65	-	1,012.65	0.59	1.87
อื่นๆ	2,000.00	90.41	2,090.41	1.22	3.86
ค่าน้ำและค่าไฟฟ้า	2,000.00	-	2,000.00	1.17	3.69
ค่าเสียโอกาสต้นทุนผันแปร	-	90.41	90.41	0.05	0.17
ต้นทุนคงที่	17,000.00	11,958.47	28,958.47	16.95	53.44
ค่าเสื่อมราคาเครื่องมืออุปกรณ์	-	11,897.34	11,897.34	6.97	21.96
ค่าแรงงานประจำ	17,000.00	-	17,000.00	9.95	31.37
พนักงานห้องปฏิบัติการ	5,000.00	-	5,000.00	2.93	9.23
เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	12,000.00	-	12,000.00	7.02	22.14
ค่าเสียโอกาสต้นทุนคงที่	-	61.13	61.13	0.03	0.11
ต้นทุนรวมทั้งหมด	42,141.84	12,048.88	54,190.72	31.72	100
ต้นทุนต่อต้น	24.67	7.05	31.72		
ต้นทุนรวมต้นทุนต้นกล้า			32.17		

ที่มา: จากการสำรวจ

ตารางที่ 18 ต้นทุนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP กรณีที่ดำเนินการตรวจสอบ 2,684 ต้นในระยะเวลาการตรวจสอบ 33 วัน

รายการ	ต้นทุนต่อ 2,684 ต้นต่อดีเอ็นเอเครื่องหมาย 1			ต้นทุนต่อต้น ร้อยละ	
	ตำแหน่ง			รวม	
	เป็นเงินสด	ไม่เป็นเงินสด			
ต้นทุนผันแปร	40,365.76	228.09	40,593.86	15.13	43.42
วัสดุปัจจัย	36,365.76	-	36,365.76	13.55	38.90
สารเคมี	22,644.30	-	22,644.30	8.44	24.22
<i>Taq</i> polymerase	4,738.60	-	4,738.60	1.77	5.07
สารเคมีอื่นๆ	17,905.70	-	17,905.70	6.67	19.15
วัสดุอุปกรณ์	13,721.46	-	13,721.46	5.11	14.68
Pipette tip	3,573.37	-	3,573.37	1.33	3.82
Eppendorf tube	3,860.56	-	3,860.56	1.44	4.13
PCR plate	4,696.23	-	4,696.23	1.75	5.03
วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ	1,591.30	-	1,591.30	0.59	1.70
อื่นๆ	4,000.00	228.09	4,228.09	1.58	4.52
ค่าน้ำและค่าไฟฟ้า	4,000.00	-	4,000.00	1.49	4.28
ค่าเสียโอกาสต้นทุนผันแปร	-	228.09	228.09	0.09	0.24
ต้นทุนคงที่	34,000.00	18,887.94	52,887.95	19.71	56.58
ค่าเสื่อมราคาเครื่องมืออุปกรณ์	-	18,695.82	18,695.82	6.97	20.00
ค่าแรงงานประจำ	34,000.00	-	34,000.00	12.67	36.37
พนักงานห้องปฏิบัติการ	10,000.00	-	10,000.00	3.73	10.70
เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	24,000.00	-	24,000.00	8.94	25.67
ค่าเสียโอกาสต้นทุนคงที่	-	192.12	192.12	0.07	0.21
ต้นทุนรวมทั้งหมด	74,365.76	19,116.03	93,481.80	34.84	100
ต้นทุนต่อต้น	27.71	7.12	34.84		
ต้นทุนรวมต้นทุนต้นกล้า			35.29		

ที่มา: จากการสำรวจ

การเปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยวิธี GOT และเทคนิค SSLP

จากตารางที่ 19 พบว่าต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยใช้วิธี GOT ในกรณีจ้างเกษตรกรดำเนินการมีต้นทุนต่ำกว่าการดำเนินการปลูกทดสอบเอง ที่ระยะเวลา 21 วัน และ 33 วัน คือ 2.02 บาทต่อต้น และ 3.43 บาทต่อต้น ตามลำดับ ส่วนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยใช้เทคนิค SSLP ในกรณีการดำเนินการตรวจสอบเองพบว่ามีต้นทุนต่ำกว่าการจ้างหรือใช้บริการการตรวจสอบของหน่วยบริการทางชีวภาพ (Bioservice Unit: BSU) โดยเฉลี่ยคือประมาณ 41.72 บาทต่อต้น

เมื่อนำต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมโดยวิธี GOT และเทคนิค SSLP มาเปรียบเทียบกัน จากตารางที่ 20 พบว่าการตรวจสอบโดยใช้วิธี GOT ที่ระยะเวลา 21 วันทั้งในกรณีจ้างปลูกและดำเนินการปลูกทดสอบเองมีต้นทุนต่ำกว่าการทดสอบด้วยเทคนิค SSLP คือ ประมาณ 14.13 บาทต่อต้น และ 12.11 บาทต่อต้น ตามลำดับ ในขณะที่ ที่ระยะเวลา 33 วันการตรวจสอบโดยใช้วิธี GOT ในกรณีการจ้างพบว่ามีต้นทุนต่ำกว่าการทดสอบด้วยวิธี SSLP คือ ประมาณ 1.73 บาทต่อต้น แต่ในกรณีที่บริษัทดำเนินการปลูกทดสอบเองจะมีต้นทุนสูงกว่าการทดสอบด้วยเทคนิค SSLP คือ ประมาณ 1.70 บาทต่อต้น

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยวิธี GOT ระหว่างกรณีจ้างเกษตรกรและดำเนินการปลูกตรวจสอบเอง และใช้วิธี SSLP

ชนิดต้นทุน	ต้นทุนต่อต้นที่ 21 วัน			ต้นทุนต่อต้นที่ 33 วัน		
	GOT จ้าง	GOTไม่จ้าง	SSLP	GOT จ้าง	GOTไม่จ้าง	SSLP
ต้นทุนต้นแปร	2.56	4.49	14.77	2.56	5.82	15.13
ต้นทุนคงที่	15.48	15.57	16.95	31.00	31.17	19.71
ต้นทุนรวม	18.04	20.06	31.72	33.56	36.99	34.84
ต้นทุนรวมทั้งหมด	18.04	20.06	32.17	33.56	36.99	35.29

ที่มา: จากการคำนวณ

จากตารางที่ 20 พบว่าร้อยละของต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมด้วยวิธี GOT ในกรณีการจ้างนั้นส่วนใหญ่ คือ ต้นทุนคงที่ค่าจ้างแรงงานประจำและต้นทุนผันแปรค่าจ้างแรงงานรายวัน คือ คิดเป็นร้อยละ 85.50 และร้อยละ 14.14 ตามลำดับ ในกรณีการดำเนินการปลูกทดสอบเอง ร้อยละของต้นทุนส่วนใหญ่ คือ ต้นทุนคงที่ค่าจ้างแรงงานประจำและต้นทุนผันแปรค่าจ้างแรงงานรายวันเช่นกัน คือ คิดเป็นร้อยละ 76.85 และ 10.72 ตามลำดับ ในขณะที่ร้อยละของต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมด้วยเทคนิค SSLP มีสัดส่วนร้อยละของต้นทุนคงที่ (ร้อยละ 53.44) ใกล้เคียงกับต้นทุนผันแปร (ร้อยละ 46.56) โดยมีสัดส่วนร้อยละของต้นทุนคงที่สูงกว่าต้นทุนผันแปรเพียงเล็กน้อยคือ ประมาณ ร้อยละ 6.88 ซึ่งสัดส่วนในต้นทุนคงที่ส่วนใหญ่เป็นต้นทุนค่าจ้างแรงงานประจำและค่าเสื่อมราคา (ต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด) คือ ร้อยละ 31.17 และร้อยละ 21.96 ตามลำดับ สัดส่วนในต้นทุนผันแปรส่วนใหญ่เป็นต้นทุนค่าสารเคมีและปัจจัยการผลิตในห้องทดลองคือ ร้อยละ 26.59 และร้อยละ 16.11 ตามลำดับ

ตารางที่ 20 ร้อยละของต้นทุนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT ระหว่าง
กรณีการจ้างเกษตรกรดำเนินการ การดำเนินการปลูกตรวจสอบเอง และใช้ SSLP ที่
ระยะเวลา 21 วัน

รายการ	GOT	GOT	เทคนิค
	จ้างเกษตรกร	ดำเนินการเอง	SSLP
ต้นทุนต่อต้น (บาท/ต้น)	18.03	20.06	32.71
ต้นทุนผันแปรรวมทั้งหมด (ร้อยละ)	14.19	22.38	46.56
สารเคมี	0	0.86	26.59
ปัจจัยการผลิตในหึ่งทดลอง	0	0	16.11
ปัจจัยการผลิตในแปลงปลูก	0	8.65	0*
น้ำมัน	0	1.30	0
ค่าจ้างแรงงาน	14.14	10.72	0
อื่นๆ	0	0.77	3.69
ค่าเสียโอกาสการลงทุน	0.05	0.08	0.17
ต้นทุนคงที่รวมทั้งหมด (ร้อยละ)	85.81	77.62	53.44
ค่าเช่าที่ดิน	0	0.13	0
ค่าจ้างแรงงาน	85.50	76.85	31.37
ค่าเสื่อมราคาอุปกรณ์	0	0.36	21.96
ค่าเสียโอกาสการลงทุน	0.31	0.28	0.11

หมายเหตุ * ค่าต้นทุนต้นกล้า 0.45 บาทต่อต้น

ที่มา: จากการคำนวณ

การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP

จากตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตของการตรวจสอบด้วยวิธี SSLP พบว่า หากตัดขั้นตอนการตรวจสอบหาปริมาณดีเอ็นเอใน agarose gel electrophoresis ต้นทุนการตรวจสอบจะลดลงประมาณ 1.93 บาทต่อ และหากต้นทุนค่าเอ็นไซม์ *Taq* polymerase ลดลงจาก ยูนิทละ 8.03 บาท เป็น 1.75 บาทต่อยูนิท ต้นทุนการตรวจสอบจะลดลงประมาณ 1.38 บาทต่อต้น และในกรณีหากเพิ่มปริมาณตัวอย่างในขั้นตอนการตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel electrophoresis จาก 122 ตัวอย่าง เป็น 244 ตัวอย่างต่อการตรวจสอบ 1 ครั้ง ต้นทุนการตรวจสอบจะลดลงจาก 32.17 บาทต่อต้น เป็น 27.11 บาทต่อต้น คือลดลง ประมาณ 5.06 บาทต่อต้น

ตารางที่ 21 ต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาด้วยเทคนิค SSLP

ตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP	ต้นทุนต่อต้น (บาทต่อต้น)	ส่วนต่าง (บาทต่อต้น)
การตรวจสอบผ่านขั้นตอน agarose gel electrophoresis	34.10	
การตัดขั้นตอน agarose gel electrophoresis*	32.17	1.93
การใช้เอ็นไซม์ <i>Taq</i> polymerase ราคาลดลง	30.79	1.38
การเพิ่มปริมาณตัวอย่างต่อการตรวจสอบ 1 ครั้ง	27.11	5.06

หมายเหตุ * วิธีปกติที่ใช้ในการคำนวณต้นทุนในครั้งนี้

ที่มา: จากการคำนวณ

วิจารณ์

การพัฒนาและจำแนกลักษณะของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite

จากการพัฒนาและจำแนกลักษณะของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแดงกวาง โดยวิธี enrichment genomic library ด้วย B-CT₁₅ พบว่ามี positive clone ที่มี microsatellite ดีเอ็นเอ 66.93% (170/254) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการคัดเลือก false positive clones คือมีการคัดเลือกโคลนที่มีสัญญาณไม่ชัดเจนคิดมาด้วยทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของ positive clones ที่มี microsatellite ดีเอ็นเอไม่ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยนำ positive clones ที่ได้จากการคัดเลือกในครั้งแรก ไปทำการ hybridize ซ้ำ เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีสัญญาณชัดเจนอีกครั้งหนึ่ง ก่อนที่จะนำไปหาลำดับ ซึ่งวิธีการนี้จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

ประสิทธิภาพของการ enrichment ให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มี microsatellite ดีเอ็นเอครั้งนี้ มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ คือ 17.71% (170/960) ในขณะที่ประสิทธิภาพของการ enrichment ในพืชหลายชนิดมีค่าประมาณ 50%-90% (Butcher *et al.*, 2000) ซึ่งคาดว่าสาเหตุอาจมาจาก 1.) การคัดเลือกโคลนที่มีสัญญาณไม่ชัดเจนคิดมา 2.) ขั้นตอนของการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการจับตัวกันระหว่าง biotin และชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่สมบูรณ์ 3.) การล้างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการออกไม่หมดทำให้มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการคิดมา ดังนั้นโอกาสการได้มาของชิ้นส่วนที่มี microsatellite ดีเอ็นเอจึงค่อนข้างต่ำ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธีการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite โดยการสร้าง genomic library แบบเดิมในพืชหลายชนิดพบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า ซึ่งมีรายงานว่าประสิทธิภาพของการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในพืชโดยการสร้าง genomic library แบบเดิมมีเปอร์เซ็นต์ของ positive clones โดยเฉลี่ยเพียง 2.3% (Zane *et al.*, 2002) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการ enriched genomic library ด้วยการคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยตัวตรวจสอบทั้งก่อนและหลังการสร้างไลบรารี จะมีประสิทธิภาพดีกว่า ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและลดขั้นตอนการทำงานได้ดีกว่าการใช้วิธีการสร้าง genomic library แบบเดิมที่ไม่มีการ enrich

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า มีโคลนถึง 29.41% (50/170) เป็นโคลนที่มีลำดับเบสที่ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้เนื่องจากตำแหน่งของ microsatellite ดีเอ็นเออยู่บริเวณปลายซึ่งใกล้บริเวณ cloning site ข้างใดข้างหนึ่งของดีเอ็นเอพาหะมากเกินไปทำให้มีลำดับเบสขนานบข้างยาวไม่

เพียงพอสำหรับที่จะออกแบบไพรเมอร์ได้ ดังนั้นหากทำการเปลี่ยนชนิดของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นชนิดอื่น อาจทำให้มีโอกาสได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งของ microsatellite ดีเอ็นเออยู่ในบริเวณที่ตรงกลางเหมาะสมเพิ่มขึ้นและทำให้มีโอกาสได้จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายเพิ่มมากขึ้น

ก่อนทำการศึกษาค้างนี้ ผู้วิจัยได้ทดลองทำการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite โดยใช้ B-CA₁₅ และ B-CT₁₅ แต่พบว่าโอกาสพบลำดับเบสซ้ำชนิด (CA/GT)_n ต่ำมาก และพบว่า microsatellite ดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีจำนวนซ้ำสั้นๆเพียง 5-6 ซ้ำ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ในจีโนมดีเอ็นเอของแตงกวามีการกระจายตัวและมีความถี่ของการเกิดลำดับเบสซ้ำแบบ (CA/GT)_n ต่ำ แต่มีความถี่ของลำดับเบสซ้ำแบบ (CT/GA)_n มากกว่า จึงทำให้การคัดเลือกด้วย B-CT₁₅ มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า ซึ่งผลก็สอดคล้องกับงานรายงานของ Katzir et al. (1996) ที่พบว่าในแตงกวามีลำดับเบสซ้ำแบบ (CT/GA)_n มีความถี่สูงมากกว่าลำดับเบสซ้ำชนิดอื่นและนอกจากนั้นยังสอดคล้องกับงานศึกษาในพืชหลายชนิด ที่ได้รายงานไว้ เช่น Arabidopsis, ข้าวสาลี, ข้าวบาร์เลย์ และแตงโม (Bell and Ecker 1994; Plaschke et al., 1995; Liu et al., 1996, Jarret et al., 1997)

จากการจำแนกลักษณะของรูปแบบของ microsatellite ดีเอ็นเอพบว่าลำดับเบสซ้ำแบบ dinucleotide repeats มากถึง 93% ทั้งนี้เนื่องจากโดยทั่วไปในจีโนมของพืชจะพบลำดับเบสซ้ำแบบ dinucleotide repeats กระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนมและสามารถตรวจพบความแตกต่างได้สูงกว่าลำดับเบสซ้ำแบบ tri- และ tetra nucleotide (Condit and Hubbell, 1991; Areshchenkova and Ganal, 2002)

ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำและความสามารถในการแยกความแตกต่างทางจีโนมไพบ้ในการศึกษาค้างนี้มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางผนวกที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยใน องุ่น (Thomas and Scott, 1993) และ มะเขือเทศ (Smulders et al., 1997; Areshchenkova and Ganal, 2002) คือเมื่อจำนวนซ้ำของลำดับเบสซ้ำสูงความสามารถในการแยกความแตกต่างก็สูงเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยในพืชบางชนิด เช่น Arabidopsis (Bell and Ecker 1994); ข้าว (Panaud et al., 1996), พืชวงศ์กะหล่ำ (Szewc-McFadden et al., 1996) และ ข้าวบาร์เลย์ (Struss and Plieske, 1998) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำและความสามารถในการแยกความแตกต่างทางจีโนมไพบ้มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางตรงกันข้าม

การทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ในแตงกวา

จากการทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 86 ตำแหน่งที่พัฒนาได้ในครั้งนี้พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 57 ตำแหน่งหรือคิดเป็นประมาณ 66.23% (57/86) สามารถอ่านผลได้ชัดเจนและมีขนาดของอัลลีลตรงตามขนาดที่คาดไว้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในหลายฉบับว่าโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการทำปฏิกิริยา PCR หรือได้ PCR product หลังจากให้ออกแบบดีเอ็นเอเครื่องหมายหรือไพรเมอร์อยู่ที่ 60-90% (Rajeev *et al.*, 2005) สำหรับดีเอ็นเอเครื่องหมาย 19 ตำแหน่งหรือคิดเป็นประมาณ 22.09% (19/86) ที่ไม่พบ PCR product ซึ่งอาจเนื่องจากสาเหตุ 1.) ไพรเมอร์ข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างเกิดการจับตัวกันเองที่เรียกว่า Primer dimer หรืออาจเกิดจากองค์ประกอบและอุณหภูมิไม่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ดังนั้นอาจจะต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิหรือองค์ประกอบอื่นๆในขั้นตอนการทำ PCR ให้เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาต่อไป

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ dinucleotide repeat นั้นควรคำนึงถึงปัญหาของการเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นปื้นยาวหรือลักษณะแบบขั้นบันได (stutter band) ซึ่งสาเหตุเกิดจากขบวนการเข้าคู่ผิดตำแหน่งของลำดับเบสของดีเอ็นเอเครื่องหมายหรือไพรเมอร์ขณะที่มีการจำลองตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอในขบวนการปฏิกิริยา PCR (Litt and Luty, 1989) โดยการเกิดลักษณะของ stutter band อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ขนาดและจำนวนอัลลีลผิดพลาด และอาจทำให้การแยกลักษณะของ Homozygote ออกจาก Heterozygote ที่มีขนาดของอัลลีลห่างกันเพียง 2 คู่เบส ไม่สามารถทำได้ แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ trinucleotide repeat จะช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ trinucleotide repeat อาจจะมีความสามารถในการแยกความแตกต่างได้ต่ำกว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายมีลำดับเบสซ้ำแบบ dinucleotide repeat (Bryan *et al.*, 1997)

การตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite

จากตรวจสอบความแตกต่างระดับจีโนไทป์ในแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวน 57 ตำแหน่ง พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite 45 ตำแหน่ง หรือประมาณ 79%. (45/57) สามารถแยกความแตกต่างระดับจีโนไทป์ได้ ซึ่งถือได้ว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายนี้มีประสิทธิภาพในการบอกความแตกต่างได้ดี ในขณะที่ดี

เอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 12 ตำแหน่ง ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ (monomorphic) ทั้งนี้แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนเกิดขึ้นใน microsatellite ดีเอ็นเอทั้ง 12 ตำแหน่ง ในแดงกวา 8 accessions และแดงกวา 8 สายพันธุ์ และอาจเป็นไปได้ว่า microsatellite ดีเอ็นเอ ตำแหน่งเหล่านี้มาจากบริเวณที่เป็นส่วนของ gene หรือบริเวณ coding region ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นบริเวณนี้น้อยมาก (Rajeev *et al.*, 2005)

จากการประเมินค่า Expected heterozygosity (H_e) ของประชากรแดงกวา 8 accessions และแดงกวา 8 สายพันธุ์ มีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.54 (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าประชากรแดงกวาที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่สูงมาก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าแดงกวาที่นำมาใช้ครั้งนี้มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่แคบหรือผ่านการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์แบบผสมเลือดชิด (inbreeding) และจากการพิจารณาค่า Observed heterozygosity (H_o) พบว่าต่ำกว่าทางทฤษฎี (Expected heterozygosity) ซึ่งหมายความว่าแดงกวาที่เป็น heterozygote มีจำนวนน้อยกว่าที่ควรจะเป็นตามสมการฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นดังกล่าวอาจเกิดจากตัวอย่างประชากรแดงกวาที่นำมาใช้มีจำนวนน้อย (Lessios, 1992) ไม่ครอบคลุมพอที่จะพบจีโนไทป์ที่ลักษณะ heterozygote ตามที่คาดไว้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าในบริเวณที่ไพรเมอร์เกาะ (priming site) มีการเกิด mutation ทำให้เกิดลักษณะ null alleles ขึ้น จึงทำให้ค่า heterozygosity ต่ำกว่าความเป็นจริง (Rico *et al.*, 1997)

ค่า Polymorphism Information Content (PIC) เป็นค่าที่บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง (Botstein *et al.*, 1980) จากการศึกษาในประชากรแดงกวา 8 accessions และแดงกวา 8 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า PIC โดยเฉลี่ยประมาณ 0.4739 (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้สามารถบอกความแตกต่างระดับจีโนไทป์ได้และหากดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งใดมีค่า PIC สูง แสดงว่าเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมในตำแหน่งนั้นๆ สูง ซึ่งทำให้สามารถบอกความแตกต่างได้ดี ดังนั้นจึงควรพิจารณาเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่า PIC สูง เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์แดงกวาต่อไป

ค่าความน่าจะเป็นในการจำแนกความแตกต่างระดับจีโนไทป์โดยสุ่ม (Probability of Identity, PI) เป็นค่าที่บ่งบอกว่าโอกาสที่จะพบสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน ณ ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งหนึ่ง จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT933 มีค่า

PI มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.0656 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ณ ตำแหน่ง CMCT933 มีโอกาสที่จะพบแดงกว่า 2 พันธุ์ที่คัดเลือกมาโดยสุ่มและมีจีโนไทป์เหมือนกันเป็น 1 ใน 15 ขณะที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT254 มีค่า PI สูงเท่ากับ 0.2951 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ณ ตำแหน่ง CMCT254 มีโอกาสที่จะพบแดงกว่าที่มีจีโนไทป์เหมือนกันเป็น 1 ใน 2 ดังนั้นหากค่า PI ยิ่งต่ำโอกาสที่จะพบจีโนไทป์ที่เหมือนกันก็ยิ่งน้อยลง และข้อมูลค่า PI สามารถเป็นตัวช่วยในการตัดสินใจเลือกใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในการจำแนกสายพันธุ์แดงกว่าต่อไปได้

ถึงแม้ว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT97, CMCT435, CMCT565, CMCT602 และ CMCT664 จะสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง แดงกว่า 8 accessions และแดงกว่า 8 สายพันธุ์ได้ แต่พบว่ามีค่า PI สูงสุดคือ 0.7862 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งเหล่านี้ มีโอกาสที่จะพบแดงกว่าที่มีจีโนไทป์เหมือนกันเป็น 1 ใน 1 และมีค่า PIC ที่ต่ำสุด คือ 0.1103 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการบอกความแตกต่างได้ต่ำ ดังนั้นดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้ง 5 ตำแหน่งนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แดงกว่าต่อไป

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย Microsatellite ตรวจสอบจีโนไทป์ข้ามสายพันธุ์

การที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ของแดงกว่าบางตำแหน่งสามารถใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ใน แคนตาลูป แดงโม ฟักทองและมะระได้ ทั้งนี้เนื่องจากพืชทั้ง 4 ชนิดอยู่ในวงศ์เดียวกัน มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมและมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน จึงมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (conserved sequence) หรือเกิดลักษณะที่เรียกว่า orthologous ซึ่งหมายถึงการเกิดลักษณะของ gene หรือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกัน (Brown, 1999) จึงทำให้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแดงกว่าตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ conserved สามารถ Amplified ได้ในพืชวงศ์แดง และผลการศึกษารุ่นนี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาในพืชวงศ์แดงของ Danin-Poleg *et al.* (2001) และ Patricia *et al.* (2004)

เปอร์เซ็นต์ของความสามารถตรวจสอบข้ามสายพันธุ์ อาจจะเป็นตัวบอกได้ว่าแดงกว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับแคนตาลูปมากกว่าแดงโมและมะระ เนื่องจากแดงกว่า (*C. sativus*) และแคนตาลูป (*C. melo*) ใน genus เดียวกัน ขณะที่แดงโม (*Citrullus vulgaris*) และ มะระ (*Momordaca charantia*) เป็นพืชที่อยู่ต่าง genus สำหรับฟักทอง(*Cucurbita spp.*) น่าจะมีความ

ใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับแสงกวาน้อย แต่อย่างไรก็ตามควรมีการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายนี้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 4 ชนิดนี้ต่อไป

ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ของแสงกวานบางตำแหน่งที่ไม่สามารถ Amplify ได้ (การเกิดลักษณะ null alleles) ในแคนตาลูป แดงโม ฟักทองและมะระ อาจอธิบายได้ว่ามีการเกิด mutation ลักษณะแบบ base substitution, insertion และ deletion ในส่วนของบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ (Primer binding site) ที่ไพรเมอร์เกาะ (Callen *et al.*, 1993; Lehman *et al.*, 1996; Peakall *et al.*, 1998)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 8 ตำแหน่ง คือ CMCT254, CMCT290N, CMCT390, CMCT435, CMCT 641, CMCT662, CMCT662 และ CMCT664 มีความสามารถในการตรวจสอบข้ามสายพันธุ์สูงคือสามารถตรวจสอบในพืชทั้ง 4 ชนิดได้ และหากนำลำดับเบสของดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีใน Genbank อาจเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้เป็นส่วนที่เป็น conserved sequences และมี homology กับส่วนที่เป็น coding sequence ที่สำคัญ ตามที่ Patricia *et al.* (2004) รายงานว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในเมลอน ตำแหน่ง CMBR 48 ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในแสงกวา แดงโมและฟักทอง มีลำดับเบสที่ homology กับ chloroplastic 16S ribosomal RNA gene

เนื่องจากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite มีค่าใช้จ่ายในค่อนข้างสูงและต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนา ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากความสามารถตรวจสอบข้ามสายพันธุ์ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในพืชวงศ์แตงจะช่วยให้ลดค่าใช้จ่ายและลดระยะเวลาในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายขึ้นมาใหม่พร้อมกับลดค่าใช้จ่ายในการศึกษาทางพันธุกรรมในพืชวงศ์แตงได้

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย Microsatellite ตรวจสอบความเป็นลูกผสม

การตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างแม่และพ่อ (Parental polymorphism survey)

การศึกษาครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ของการตรวจพบความแตกต่างระหว่างแม่และพ่อโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite 10 ตำแหน่ง มีค่า 70%-80% ซึ่งถือว่าสูงมาก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้

ได้ว่าพ่อและแม่พันธุ์ที่ใช้สร้างเมล็ดพันธุ์แดงกวางลูกผสมแต่ละคู่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแตกต่างกันมากประกอบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ทั้ง 10 ตำแหน่งเป็นตำแหน่งที่เกิดความแปรปรวนสูงคือมีค่า PIC เฉลี่ย 0.58 (ตารางที่9) จึงทำให้สามารถบอกความแตกต่างได้ดี

หากต้องการความชัดเจนในการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT252, CMCT358, CMCT390 และ CMCT662 ควรใช้ระยะเวลาในการทำการแยกแถบดีเอ็นเอในกระแสไฟฟ้าให้นานขึ้นหรือทำการแยกแถบดีเอ็นเอในเจลที่มีเปอร์เซ็นต์ของ polyacrylamide ที่สูงขึ้นเช่น ที่ระดับ 6% polyacrylamide

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (Genetic purity testing)

การตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์หรือการแสดงออกทางสัณฐานวิทยา เช่น การแสดงออกของเพศ (sex expression) ขนาดผล สีผล และสีของหนาม พบว่าแดงกวางพันธุ์ CUB ทั้ง 5 ต้นมีลักษณะทางฟีโนไทป์เป็นลูกผสมซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นต้น off type ในขณะที่เดียวกันการตรวจสอบในระดับจีโนไทป์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ตำแหน่ง CMCT252 สามารถตรวจพบว่าแดงกวางพันธุ์ CUB ทั้ง 5 ต้นคือ CUB2, CUB13, CUB16, CUB76 และ CUB85 เป็นต้น off type (ภาพที่ 10) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก เกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรมในบริเวณตำแหน่ง CMCT252 ซึ่งเป็นบริเวณ non coding region จึงไม่มีผลต่อการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ตรวจสอบ ทำให้การตรวจในระดับฟีโนไทป์ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

กรณีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายอื่นๆ อีก 7 ตำแหน่ง พบว่าผลการตรวจสอบไม่สอดคล้องกัน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า

1. ต้นแม่หรือต้นพ่อที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์แดงกวางลูกผสมพันธุ์ CUB ยังไม่ใช่สายพันธุ์แท้ (pure line) ที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบ homozygous 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อนำมาเป็นแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมจึงมีโอกาสได้ลูกผสมที่มีการกระจายตัวอย่างไม่สม่ำเสมอคือได้ลูกผสมที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous หลากรูปแบบ ทำให้ผลการตรวจสอบไม่แม่นยำ ดังนั้นความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์แม่และพ่อที่นำมาใช้สร้างลูกผสมมีผลต่อความถูกต้องของการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite เป็นอย่างมาก เพราะถ้าต้นแม่และพ่อ

ไม่ใช่สายพันธุ์แท้ (Pure line) ก็จะส่งผลกระทบต่อทำให้เกิดการกระจายตัวของดีเอ็นเอบางตำแหน่งในรุ่นลูกได้ ซึ่งจะทำให้ผลการตรวจสอบผิดพลาดได้

2. แต่งวา CUB ทั้ง 5 ต้นเป็นต้น off type ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างแม่พันธุ์กับพ่อพันธุ์สายพันธุ์อื่นที่ปะปนมาในระหว่างขั้นตอนการผลิตเมล็ดพันธุ์ (ถ้าต้นแม่และพ่อพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบ homozygous 100 เปอร์เซ็นต์) ก็อาจเป็นไปได้ว่า ก.) ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT358, CMCT641, CMCT662 และ CMCT726 ไม่สามารถบอกความแตกต่าง (monomorphic) ระหว่างแม่และพ่อพันธุ์อื่นได้ จึงทำให้ผลการตรวจสอบแสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนแม่ ซึ่งตามความเป็นจริงแล้วไม่มีความแตกต่างเกิดขึ้นในตำแหน่งเหล่านี้ ข.) ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT252, CMCT315, CMCT390 และ CMCT746 สามารถบอกความแตกต่าง (polymorphic) ระหว่างแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์อื่นได้ โดยที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT252, CMCT315 และ CMCT746 ให้ผลสอดคล้องกันคือแต่งวาทั้ง 5 ต้นเป็นต้น off type ในขณะที่ของการตรวจสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT390 กับให้ผลว่าเป็นลูกผสม ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ณ ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่ง CMCT390 มีขนาดอัลลีลของต้นพ่อที่แท้จริงและพ่อพันธุ์อื่นที่เท่ากันซึ่งเป็นการเกิดลักษณะที่เรียกว่า homoplasious alleles คือเป็นอัลลีลที่มีขนาดเท่ากันแต่มีลำดับเบสซ้่าที่แตกต่างกัน (Anger and Bernatchez, 1997) ในส่วนของการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในพันธุ์ CUD พบว่า ต้น CUD35 มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนแม่เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 12) แสดงว่าเป็นต้นที่มาจากเมล็ดที่ได้มาจากการผสมตัวเองของต้นแม่

การตรวจสอบความเป็นความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์แต่งवालูกผสมชั่วที่ 1 ด้วยการปลูกทดสอบพบว่า แต่งवालูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์มีความบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite พบว่า แต่งवालูกผสมพันธุ์ CUA และ CUC มีความบริสุทธิ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และแต่งवालูกผสมพันธุ์ CUD มีความบริสุทธิ์เป็น 99.15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ตั้งไว้ในระบบการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ลูกผสมคือมีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และผลการตรวจสอบแต่งवालูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ CUB มีความบริสุทธิ์เป็น 95.45 เปอร์เซ็นต์เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐาน ดังนั้นหากใช้ผลของการตรวจสอบด้วย GOT เมล็ดพันธุ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ชุดนี้ก็สามารถจัดจำหน่ายได้ แต่ถ้าใช้การตรวจสอบด้วยวิธี SLP ชุดเมล็ดพันธุ์ CUB อาจจะต้องถูกระงับการจำหน่ายได้

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นต้องใช้แรงงานที่มากกว่าและใช้ระยะเวลาที่ยาวนานกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP ขณะที่การตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP มีความรวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือมากกว่า อย่างไรก็ตามการจะเลือกใช้วิธีการใดในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมนั้นขึ้นอยู่กับเหตุผลและการพิจารณาของนักปรับปรุงพันธุ์และผู้ตรวจสอบพันธุ์ ว่าเมล็ดพันธุ์ที่ตรวจสอบมีวัตถุประสงค์ทางธุรกิจอย่างไร เช่น

ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา isozyme และดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD เนื่องจากพ่อและแม่พันธุ์มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากโดยไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แสดงออกถึงความแตกต่างที่ชัดเจนและไม่มี isozyme หรือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD ที่สามารถแยกได้ ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ก็จะเป็นทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบ

ในกรณีที่มีความต้องการจำหน่ายหรือส่งออกเร่งด่วนและการตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบยาวนาน เช่นต้องรอถึงระยะการสุกแก่ของผล หรือมีปัญหาการเข้าทำลายของโรคแมลงหรือมีภัยธรรมชาติทำลายแปลงปลูกทดสอบทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ทันเวลา การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ก็น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่านำมาใช้เนื่องจากมีความรวดเร็วในการตรวจสอบ โดยเฉพาะหากต้องส่งออกไปยังประเทศที่มีมาตรฐานและเข้มงวดเรื่องความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม การตรวจสอบด้วยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ยิ่งมีความสำคัญและจำเป็นอย่างมาก เนื่องจากหากผลการตรวจสอบไม่แม่นยำก็อาจจะส่งผลให้ไม่สามารถส่งออกและจำหน่ายได้

อย่างไรก็ตามการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ไม่ใช่วิธีการที่จะมาทดแทนการใช้วิธีการปลูกทดสอบ (GOT) หรือการตรวจสอบด้วย isozyme หรือ RAPD ได้ แต่เป็นเพียงวิธีการหนึ่งที่เป็นทางเลือกให้กับบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ว่าจะเลือกใช้กรณีใดได้บ้าง และนอกจากนั้นต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบก็น่าจะนำมาใช้ประกอบการพิจารณาด้วย

การวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนวิธีการตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่างเทคนิค SSLP และ GOT

ในการศึกษาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนวิธีการตรวจสอบบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมระหว่างวิธี SSLP และ GOT โดยเป็นการวิเคราะห์ต้นทุนและการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตของการตรวจสอบด้วยวิธี SSLP การศึกษาคั้งนี้จะแสดงให้เห็นถึงรายละเอียดของต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาคั้งนี้ได้จากการสัมภาษณ์ 1.) เจ้าหน้าที่ของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์และเจ้าหน้าที่ตรวจสอบพันธุ์ 2.) เกษตรกรทั้งหมดที่ทำการรับจ้างปลูกทดสอบจำนวน 7 ราย ณ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และ 3.) สัมภาษณ์เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอเครื่องหมายของ ดร. จุลภาค คุ้มวงศ์ ณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในปี 2548

ต้นทุนส่วนใหญ่ที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธีการ GOT ทั้งในกรณีจ้างปลูกทดสอบและดำเนินการปลูกทดสอบเอง ได้แก่ แรงงานปลูกและแรงงานที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช โดยคิดเป็นประมาณมากกว่าร้อยละ 87 ของต้นทุนทั้งหมด สำหรับแรงงานเจ้าหน้าที่ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชถือได้ว่ามีความสำคัญและจำเป็นอย่างมาก โดยจะต้องเป็นผู้ที่มีประสบการณ์และมีความเชี่ยวชาญชำนาญการในการตรวจสอบดังนั้นจึงมีค่าจ้างสูง ส่วนวัสดุปัจจัยที่ใช้ทางการเกษตรไม่ใช่ต้นทุนหลักของการตรวจสอบด้วยวิธีการนี้ และหากต้องการลดต้นทุนการตรวจสอบด้วยวิธี GOT ทำได้เพียงการลดค่าแรงงานจ้าง ซึ่งถือว่าโอกาสเป็นไปได้น้อยมากเนื่องจากตามหลักความเป็นจริงอัตราจ้างแรงงานจะมีค่าสูงขึ้นตามประสบการณ์และภาวะค่าครองชีพที่สูงขึ้นและระยะเวลาที่เปลี่ยนไป ประกอบกับหากภาวะราคาน้ำมันที่สูงขึ้นย่อมส่งผลกระทบต่อค่าครองชีพของแรงงานที่สูงขึ้นดังนั้นในอนาคตค่าแรงงานย่อมสูงขึ้นด้วย

ปัจจัยที่สำคัญและเป็นต้นทุนหลักของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP คือ ห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการพร้อมและแรงงานที่มีความชำนาญ การตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP สัดส่วนของต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปรมีค่าใกล้เคียงกันโดยมีสัดส่วนของต้นทุนคงที่สูงกว่าต้นทุนผันแปรเพียงเล็กน้อยคือประมาณร้อยละ 6.88 ซึ่งสัดส่วนในต้นทุนคงที่ส่วนใหญ่เป็นต้นทุนค่าจ้างแรงงานประจำและค่าเสื่อมราคา (ต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด) คือ ร้อยละ 31.17 และ ร้อยละ 21.96 ตามลำดับ และสัดส่วนในต้นทุนผันแปรส่วนใหญ่เป็นต้นทุนค่าสารเคมีและปัจจัยการผลิตในห้องทดลอง คือ ร้อยละ 26.59 และ ร้อยละ 16.11 ตามลำดับ ดังนั้นโอกาสที่จะลดต้นทุนสามารถทำได้เช่น การลดปริมาณการใช้ปัจจัยการผลิตหรือลดขั้นตอนการ

ดำเนินงานที่ไม่จำเป็นออก ก็จะช่วยลดต้นทุนได้ และนอกจากนี้แล้วหากผู้ปฏิบัติการตรวจสอบมีความชำนาญมากขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้น ก็จะช่วยลดต้นทุนได้

การเปรียบเทียบต้นทุนระหว่างการใช้วิธี GOT และเทคนิค SSLP ถึงแม้ว่าการตรวจสอบด้วยวิธีการ GOT จะมีต้นทุนที่ต่ำกว่าเทคนิค SSLP ในกรณีที่ตรวจสอบได้ในช่วง vegetative period แต่ GOT ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาและความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบคือหากต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่ยาวนานมากขึ้นหรือต้องตรวจสอบในระยะสุกแก่ของผลการตรวจสอบด้วยวิธี GOT อาจจะมีต้นทุนที่สูงกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP และเมื่อเปรียบเทียบ ณ การใช้ระยะเวลาการตรวจสอบที่เท่ากัน พบว่าที่ระยะเวลา 33 วัน ต้นทุนของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP มีค่าต่ำกว่าต้นทุนการตรวจสอบด้วยวิธี GOT เป็น 1.70 บาทต่อต้นและเทคนิค SSLP สามารถตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ได้สูงถึง 22 seed lot หรือ 2,684 ต้นขณะที่การตรวจสอบด้วยวิธี GOT สามารถตรวจสอบได้เพียง 20 seed lot หรือ 2,400 ต้นต่อพื้นที่ 100 ตารางวา

สำหรับข้อจำกัดของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP คือจำเป็นต้องลงทุนสร้างห้องปฏิบัติการตรวจสอบและซื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจสอบซึ่งเป็นเงินลงทุนครั้งแรกที่สูงมาก แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP มีข้อดีอยู่หลายประการคือ มีความน่าเชื่อถือและมีความรวดเร็วคือสามารถตรวจสอบผลได้ภายในระยะเวลาสั้นเพียง 3 วันต่อชุดเมล็ดพันธุ์ตัวอย่าง 2 สายพันธุ์หรือ 244 ต้น ขณะที่ข้อดีของการตรวจสอบด้วยวิธี GOT ก็คือต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบ เช่น ในกรณีที่แปลงตรวจสอบมีปัญหาโรคและแมลงระบาดหรือเกิดสภาวะภัยธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม เป็นสาเหตุให้ต้องทำการปลูกทดสอบซ้ำทำให้ระยะเวลาการตรวจสอบยาวนานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อให้มีต้นทุนที่สูงขึ้นได้และส่งผลกระทบต่อทำให้ไม่สามารถจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ได้ตรงตามเวลา

เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนของการใช้เทคนิค SSLP ตรวจสอบระหว่างกรณีที่จ้างตรวจสอบหรือใช้บริการตรวจสอบของหน่วยชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ กับดำเนินการของบริษัทเอง พบว่า การดำเนินการเองจะมีต้นทุนที่ต่ำกว่า คือ 41.72 บาทต่อต้น แต่บริษัทจะต้องคำนึงถึงการลงทุนครั้งแรกที่สูงเกี่ยวกับการซื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบด้วย ดังนั้นมีข้อเสนอว่าควรทำการศึกษาถึงจุดคุ้มทุนของการดำเนินการลงทุนซื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจสอบและเปรียบเทียบกับทางเลือกใช้บริการตรวจสอบต่อไป

การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP พบว่าวิธีการนี้สามารถที่ลดต้นทุนได้โดย 1.) การลดต้นทุนด้านปัจจัยวัสดุและสารเคมี โดยการลงทุนซื้อในปริมาณที่มากเพื่อลดต้นทุนต่อหน่วย เช่น เอ็นไซม์ *Taq* polymerase หากซื้อในปริมาณมากขึ้นต้นทุนต่อหน่วยจะลดลง ทำให้ต้นทุนการทดสอบลดลงได้ 2.) การลดขั้นตอนการทำงาน โดยตัดขั้นตอนการวัดปริมาณดีเอ็นเอออก ในกรณีนี้สามารถทำได้ก็ต่อเมื่อเจ้าหน้าที่มีความชำนาญในการสกัดดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี 3.) การเพิ่มปริมาณตัวอย่างตรวจสอบมากขึ้นในขั้นตอนการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นอกจากนี้แล้วหากได้มีการศึกษาพัฒนาปรับเปลี่ยนเทคนิคหรือขั้นตอนการตรวจสอบให้รวดเร็วและสามารถตรวจสอบได้จำนวนมากต่อการตรวจสอบ 1 ครั้ง น่าจะเป็นหนทางที่จะช่วยลดต้นทุนการตรวจสอบได้ต่อไป

การตัดสินใจเลือกใช้วิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมนอกจากต้นทุนจะเป็นตัวช่วยในการตัดสินใจใช้เทคโนโลยีแล้วระยะเวลาและความแม่นยำหรือความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบก็เป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะรูปแบบการตกลงทางธุรกิจ จำหน่ายเมล็ดพันธุ์เป็นอย่างไรต้องการความรวดเร็วของผลการตรวจสอบและความแม่นยำของผล มากน้อยแค่ไหนและถ้ามองไปข้างหน้าหากประเทศไทยได้เป็นแหล่งสร้างพันธุ์และผลิตเมล็ดพันธุ์ พืชวงศ์แดงเพื่อจำหน่ายทั่วโลก ความรวดเร็วและความน่าเชื่อถือของผลการตรวจสอบนับว่ามี ความสำคัญอย่างมาก ดังนั้นการตรวจตรวจสอบด้วยการเทคนิค SSLP ก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าจะ นำไปใช้ได้ต่อไป

สรุป

การศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแตงกวาได้จำนวน 86 ตำแหน่ง โดยดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 57 ตำแหน่งสามารถเพิ่มปริมาณ microsatellite ดีเอ็นเอได้และดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 45 ตำแหน่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรแตงกวา 8 accessions และแตงกวา 8 สายพันธุ์ ได้ ซึ่งมีค่า He เฉลี่ย เท่ากับ 0.54 และค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.48 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite ในแตงกวาสามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมและดีเอ็นเอเครื่องหมายบางตำแหน่งในแตงกวาสามารถใช้ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์ได้ในแคนตาลูป, แตงโม, ฟักทอง และมะระ นอกจากนี้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด microsatellite สามารถใช้ในการจัดการเชื้อพันธุกรรม การจำแนกพันธุ์ ศึกษาทางพันธุกรรม และใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาและพืชวงศ์แตงทั้ง 4 ชนิดได้ต่อไป

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวาลูกผสมที่ระยะเวลา 21 วันและ 33 วัน ต้นทุนการตรวจสอบด้วยวิธี GOT มีค่าประมาณ 20.06 บาทต่อต้นและ 36.99 บาทต่อต้นตามลำดับ ขณะที่ต้นทุนการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP มีค่าประมาณ 32.17 บาทต่อต้นและ 35.29 บาทต่อต้น ตามลำดับ

การเปรียบเทียบต้นทุนระหว่างการใช้วิธี GOT และเทคนิค SSLP ในกรณีที่ตรวจสอบได้ในช่วง vegetative period หรือที่ระยะ 21 วัน การตรวจสอบด้วยวิธี GOT จะมีต้นทุนที่ต่ำกว่าวิธี SSLP อยู่ 12.11 บาทต่อต้น แต่ GOT ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาและความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบคือหากต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่ยาวนานมากขึ้นหรือต้องตรวจสอบในระยะสุกแก่ของผล การตรวจสอบด้วยวิธี GOT อาจจะมีต้นทุนที่สูงกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP และเมื่อเปรียบเทียบ ณ การใช้ระยะเวลาการตรวจสอบที่เท่ากัน พบว่าที่ระยะเวลา 33 วัน ต้นทุนของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP มีค่าต่ำกว่าต้นทุนการตรวจสอบด้วยวิธี GOT เป็น 1.70 บาทต่อต้นและเทคนิค SSLP สามารถตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ได้สูงถึง 22 ชุดเมล็ดพันธุ์ หรือ 2,684 ต้นขณะที่การตรวจสอบด้วยวิธี GOT สามารถตรวจสอบได้เพียง 20 ชุดเมล็ดพันธุ์ หรือ 2,400 ต้นต่อพื้นที่ 100 ตารางวา

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จามุญญณ์ ขนบดี. 2541. การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- ชลธิชา นิวาสประภคติ และ จุลภาค กู้นวงศ์. 2541. การศึกษาตัวตรวจสอบชนิด **microsatellite** ในการจำแนกพันธุ์พริก, น.32. ในรายงานการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36 ระหว่างวันที่ 3-5 เดือนกุมภาพันธ์ 2541. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุเทวี สุขปรากฏ. 2522. **ผักฤดูร้อน**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 170 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Angers, B. and L. Bernatchez. 1997. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. **Mol. Biol. Evol.** 14: 230-238.
- Areshchenkova, T. and M. W. Ganal. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theor. Appl. Genet.** 104: 229-235.
- Ashok, D. and P. Vilas. 2005. Identification of cotton hybrid through the combination of PCR based RAPD, ISSR and microsatellite markers. **J. Plant Biochemistry & Biotechnology.** 14: 53-55.

- Becker, J. and M. Heun. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. **Plant Molecular Biology**. 27: 835-45.
- Bell, C. J. and J. R. Ecker. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. **Genomics**. 19: 137-144.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. David. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **Am. J. Hum. Genet.** 32: 314-331.
- Briggs, F. N. and P. F. Knowles. 1967. **Introduction to plant Breeding**. Reinhold Pub. Corp., New York. 426p.
- Brown, T.A. 1999. **Genomes**. p93. The Bath Press Ltd., United Kingdom.
- Brown, S. M., M. S. Hopkins, S. E. Mitchell, M. L. Senior, T. Y. Wang, R. R. Duncan, F. Gonzalez-Candelas and S. Kresovich. 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) Moench. **Theor. Appl. Genet.** 93: 190-198.
- Bryan, G. J. , A. J. Collins, P. Stephenson, A. Orry, J. B. Smith and M. D. Gale. 1997. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. **Theor. Appl. Genet.** 94: 557-563.
- Burg, H. C. and B. M. van den Berg. 1996. State of the art of large-scale genetic purity testing of hybrid vegetable seeds using isoelectric focusing at PetoSluis. **Electrophoresis**. 17(3): 502-504.

- Büscher, N., E. Zyprian and R. Blaich. 1993. Identification of grapevine cultivars by DNA analysis: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10 mer primers. **Vitis**. 32: 187-188.
- Butcher, P. A., S. Decroocq, Y. Gray and G. F. Moran. 2000. Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. **Theor. Appl. Genet.** 101: 1282-1290.
- Callen, D. 1993. Incidence and origin of null alleles in th (AC)_n microsatellite markers. **Am. J. Hum. Genet.** 52: 922-927.
- Condit, R. and S. P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**. 34: 66-71.
- Danin-Poleg, Y., N. Reis, G. Tzuri and N. Katzir. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in cucumis. **Theo. Appl. Genet.** 102: 61-72.
- Della Vecchia, P.T., C.A. R. Dasilva and P. Terenciano-Sobrinho. 1998. Use of molecular marker techniques in seed testing by Brazilian seed company. **Sci agri., Piracicaba**. 55: 79-82.
- Dijkhuizen, A., W. C. Kennad, M. J. Havey and J. E. Staub. 1996. RFLP variation and genetic relationship in cultivated cucumber. **Euphytica**. 90: 79-87.
- Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucl. Acids Res.** 16: 6217-6145.
- Dreher, K., M. Khairallah, J-M. Ribaut and M. Morris. 2003. Money matter (I): cost of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. **Molecular Breeding**. 11: 221-234.

- Fulton, TM., J. Chunwongse and S. D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Mol. Biol. Rep.** 13: 207-209.
- Ghislain, M., F. Rodriguez, F. Villamon, J. Nunez, R. Waugh and M. Bonierbabe. 1999. Establishment of microsatellite assays for tomato genetic identification. **CIP Program Report 1990-2000.** p167-174.
- Hamanda, H. and T. Kakunaga. 1982. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. **Nature.** 298: 396-398.
- Haydn, K., Y. Guoyou, F. Rebecca and J. Stephen. 2005. Genetic and economic analysis of targeted marker-assisted wheat breeding strategy. **Molecular Breeding.** 16: 67-78.
- Jarret, R. L., L. C. Merrick, T. Holms, J. Evans and M. K. Aradhya. 1997. Simple sequence repeats in watermelon [*Citrullus schrad* (Thunb) Matsum & Nakai]. **Genome.** 40: 433-441.
- Kallo, G. and B.O. Bergh. 1993. Cucumber. pp.197-234. *In* T. Tatliogu. Genetic Improvement for Vegetable Crops. **Pergamon Press.** UK, USA, KOREA, JAPAN.
- Karakousis, A., A. R. Barr, K. J. Chalmers, G. A. Ablett, T. A. Holton, R. J. Henry, P. Lim and P. Langridge. 2003. Potential of SSR markers of plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm. **Australian Journal of Agricultural Research.** 54: 1197-1210.
- Katzir, N., Y. Danin-Poleg, G. Tzuri, Z. Karchi, U. Lavi and P. B. Cregan. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several cucurbitaceae species. **Theor. Appl. Genet.** 93: 1282-1290.

- Kaul, R., A. Singh, R. K. Vijn, M. S. Tandia and R. Behl. 2001. Evaluation of genetic variability of 13 microsatellite makers in native Indian pigs. **J. Genet.** 80(3): 149-153.
- Kinet, J. M. and M. M. Peet. 1997. The cucurbits. p. 345-386. *In* H.C.Wien, ed. The Physiology of Vegetable Crops. **CAB International.** UK, USA.
- Kisuki, S. and Y. Isagi. 2002. Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* ssp. japonica. **Heredity.** 88: 313-321.
- Langencrantz, U., H. Ellengren and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plant and vertebrates. **Nucleic Acids Res.** 21(5): 1111-1115.
- Lehman, T. 1996. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. **Genetics.** 144: 1155-1163.
- Lessios, H.A. 1992. Testing electrophoresis data for agreement with Hardy-Weinberg expectations. **Mar. Biol.** 112: 517-523.
- Levinsen, G. and G.A. Gutman. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA evolution. **Mol. Biol. Evol.** 4: 203-221.
- Libner, Ib. and Nonnecke. 1989. Vegetable Production. **Van Nostrand Reinhold.** USA: 505-569.
- Litt, M. and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 397-401.

- Liu, Z. W., R. M. Biyashev and M. M. A. Saghai. 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theor. Appl. Genet.** 93: 869-876.
- Mariette, S., V. Le Corre, F. Austerlitz and A. Kremer. 2002. Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-off between markers. **Mol. Ecol.** 11: 1145-1156.
- Matsuura, S., A. Saito and Y. Fujita. 1994. An approach for rapid checking of seed purity by RFLP analysis of nuclear DNA in F1 hybrid of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **J. Japanese Soc. Hort. Sci.** 63: 379-383.
- McCouch, S.R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. G Cho, N. Huang, T. Ishii and M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology.** 35: 89-99.
- McDonald, M.B. 1995. Genetic purity: from protein electrophoresis to RAPDs. p.256-271. In **the fiftieth annual corn & sorghum industry research conference.** USA.
- Morris, D.B., K. R. Richard and J. M. Wright. 1996. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. **Can. J. Fish. Aquat.Sci.** 53: 120-126.
- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci.Am.** 262: 56-65.
- Nei, M. and W. Li. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics.** 89: 583-590.

- Panaud, O., X. Chen and S. R. McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol Gen Genet.** 252: 597-607.
- Patricia, S. R., C. L. L Tuli, L. T. Rodrigo, S. C. B. Gláucia, A. B. José, and E. Márcio. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology** <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/9>, July 14, 2004
- Peakall, R., S. Gilmore, W. Keys, M. Morgante and A. Rafalski. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for transferability of SSRs in plants. **Mol. Bio. Evol.** 15: 1275-1287.
- Phillip, A., P. Crockett, L. Bhalla, C. K. Lee and M. B. Singh. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar. **Genome.** 43(2): 317-321.
- Plaschke, J., M. W. Ganai and M. S. Röder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.** 91: 1001-1007.
- Powell, W., G.C. Machray and J. Provan. 1996a. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science.** 1: 215-222.
- _____, M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996b. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding.** 2: 225-238.
- Primmer, C.R., T. Raudsepp, B. P. Chowdhary, A. R. Moller and H. Ellegren. 1997. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Res.** 7: 471-482.

- Ramachandran, C. and R. K. J. Narajan. 1984. Composition of nuclear DNA in cucumis species. (Unpublished)
- Rajeev, K., A. V. Graner and M. E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and application. **Trends in biotechnology**. 1(23): 48-55.
- Rico, C., K. M. Ibrahim, I. Rico and G. M. Hewitt. 1997. Stock composition in north Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. **J. Fish. Biol.** 51: 462-475.
- Saiki, RK., S. Scharf, F. A. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. 230: 1350-1354.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition. **Cold Spring Harbor, NY**.
- Scott, K. D., P. Eggler, G. Seaton, M. Rossetto, E. M. Ablett, L. S. Lee and R. J. Henry. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. **Theor. Appl. Genet.** 100: 723-726.
- Sefc, K. M., F. Lefort, M. S. Grando, K. D. Scott, H. Steinkellner and M. R. Thomas. 2001. Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. **Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine**. 1-30.
- Serquen, F.C., J. Bacher and J. E. Staub. 1997. Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random-amplified polymorphic DNA markers. **Mol. Breed.** 3: 257-268.
- Smith J. S. C. and J. C. Register. 1998. Genetic purity and testing technology for seed quality: a company perspective. **Seed Science Research**. 8: 285-293.

- Smulders, M. J. M, G. Bredemeijer, W. Rus-Kortekaas, P. Arens and B. Vosman. 1997. Use of short microsatellites from database sequence to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theor. Appl. Genet.** 97: 264-272.
- Struss, D. and J. Plieske. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theor. Appl. Genet.** 97: 308-315.
- Szewc-McFadden, A. K., S. K. Kresovich, S. M. Bliet, S. E. Mitchell and J. R. McFerson. 1996. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species. **Theor. Appl. Genet.** 93: 534-538.
- Tautz, D., M. Trick and G. Dover. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature.** 322: 652-653.
- This, P., C. Cuisset and J. M. Boursiquot. 1997. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. **Am. J. Enol. Vitic.** 48: 492-501.
- Thomas, M. R. and N. S. Scott. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence tagged sites (STSs). **Theor. Appl. Genet.** 86: 985-990.
- Van Treuren, R., H. Kuittinen, K. Karkkainen, E. Baena-Gonzales and O. Savolainen. 1997. Evolution of microsatellite in *Arabis petrea* and *Arabis lyrata* outcrossing relatives *Arabidopsis thiana*. **Molecular Biology and Evolution.** 14(3): 22-229.
- Walter, T.W., U. Posluszny and P. G. Kevan. 1989. Isoenzyme analysis of the grape (*Vitis*). I.A practical solution. **Can. J. Bot.** 67: 2894-2899.

- Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhong and S.D.Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem repeats. **Theor. Appl. Genet.** 88:1-6.
- Wang, X. F., R. Knoblauch and N. Leist. 2001. Identification of varieties and testing of hybrid purity of rice by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. **Genetic resources** 26(1): 18-19.
- Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms. **Geneomic.** 7: 524-530.
- Weber, J. and P. E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism, which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Genet.** 44: 388-396.
- Westman, A.L. and S. Kresovich. 1998. The potential for cross-taxa simple sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* and crop brassica. **Theor. Appl. Genet.** 96: 272-281.
- Winter, P., T. Pfaff, S. M. Udupa, B. Huttel, P. C. Sharma, S. Sahi, R. Arreguin-Espinoza, F. Weigand, F. J. Muehlbauer and G. Kahl. 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. **Mol. Gen. Genet.** 262: 90-101.
- Wu, K. S. and S. D.Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Mol. Gen. Genet.** 241: 225-235.
- Yashitola, J., T. Thirumurugan, R. M. Sundaram, M. K. Naseerullah, M. S. Ramesha, N. P. Sarma and Ramesh V. Sonti. 2002. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. **Crop Science.** 42: 1369-1373.

Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review, **Mol. Ecol.** 11: 1-16.

Zhang J., M. B. McDonald and P. M. Sweeney. 1997. Testing for genetic purity in petunia and cyclamen seed using random amplified polymorphic DNA markers. **Hort. Science.** 32: 246-247.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การประเมินค่าทางสถิติต่างๆของดีเอ็นเอเครื่องหมายภายในประชากรแดงกวาที่ทำการศึกษานี้ อยู่บนสมมติฐานสมดุลประชากรของ Hardy-Weinberg และดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งมีการกระจายตัวกันอย่างอิสระ โดยอัลลีลที่เป็นโฮโมโลกัสกันอยู่ในสภาพดิพลอยด์

1. การประเมินค่า **Expected heterozygosity (He)** (Nei, 1978)

ค่า He คำนวณจากค่าความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง ตามสมมติฐานของ Hardy-Weinberg เพื่อประเมินสัดส่วนของจีโนไทป์ที่อยู่ในรูป Heterozygous โดยเป็นการบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในประชากรนั้นๆ สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$He = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 \quad (1)$$

2. การประเมินค่า **Polymorphism Information Content (PIC)** (Botstein *et al.*, 1980)

ค่า (PIC) เป็นค่าที่บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - 2 \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k P_i P_j^2 \quad (2)$$

3. การประเมินค่า Probability of Identity (PI) (Kaul *et al.*, 2001)

ค่าความน่าจะเป็นในการจำแนกความแตกต่างระดับจีโนไทป์โดยสุ่ม (Probability of Identity, PI) เป็นค่าที่บ่งบอกว่าโอกาสที่จะพบสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด ที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน ณ ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งหนึ่งๆ สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$PI_n = \sum_{i=1}^k (P_i)^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k (2P_i P_j)^2 \quad (3)$$

เมื่อพิจารณาค่า PI ร่วมกันตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไป จะได้

$$PI_{combined} = \prod_{n=1}^m PI = (PI_1)(PI_2) \dots (PI_m) \quad (4)$$

โดยที่

P_i	=	ความถี่ของอัลลีลที่ i ณ ตำแหน่งนั้น
P_j	=	ความถี่ของอัลลีลที่ j ณ ตำแหน่งนั้น
k	=	จำนวนอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้น
PI_n	=	ค่า PI ณ ตำแหน่งที่ n
m	=	จำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมาย

ตารางผนวกที่ ก1 ขนาดของอัลลีลและความถี่อัลลีลของแท่งกว่า 8 accessions และแท่งกว่า 8 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite 45 ตำแหน่ง

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง	ขนาด ของอัลลีล	ความถี่ของ อัลลีล	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง	ขนาด ของอัลลีล	ความถี่ของ อัลลีล
CMCT10N	221	0.33	CMCT134N	236	0.44
	212	0.33		234	0.50
	203	0.04		232	0.06
	194	0.29	CMCT156	156	0.33
CMCT14	202	0.15		148	0.43
	196	0.50		142	0.07
	192	0.30		138	0.17
CMCT22	167	0.05	CMCT191	204	0.43
	170	170		194	0.57
	164	164	CMCT216	326	0.06
CMCT35	158	158		318	0.33
	135	0.19		312	0.61
	133	0.19	CMCT252	332	0.05
	119	0.31		320	0.10
CMCT42	117	0.31		314	0.29
	150	0.65		302	0.48
	148	0.35		292	0.05
CMCT71	296	0.62		290	0.05
	272	0.33	CMCT254	210	0.24
	260	0.05		208	0.76
CMCT77	144	0.33	CMCT266N	264	0.14
	140	0.63		260	0.62
	122	0.04		257	0.19
CMCT97	139	0.47		255	0.05
	137	0.47	CMCT290N	172	0.03
	130	0.03		170	0.03
CMCT108	126	0.03		162	0.47
	192	0.04		160	0.47
	166	0.41	CMCT315	224	0.29
	160	0.56		222	0.46
CMCT117N	200	0.09		218	0.21
	198	0.50		198	0.04
	196	0.41			

ที่มา: จากการคำนวณ

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง	ขนาด ของอัลลีล	ความถี่ของ อัลลีล	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง	ขนาด ของอัลลีล	ความถี่ของ อัลลีล
CMCT323	224	0.05	CMCT651	264	0.03
	222	0.23		260	0.03
	216	0.18		256	0.47
	208	0.05		252	0.47
	204	0.50		CMCT656	224
CMCT358	284	0.29	216		0.52
	276	0.33	210	0.13	
	270	0.38	CMCT661	152	0.64
CMCT390	254	0.04		140	0.36
	246	0.48	216	0.52	
	242	0.39	210	0.13	
	240	0.19	CMCT662	234	0.25
	230	0.19		222	0.17
CMCT435	435	0.06	220	0.42	
	400	0.94	206	0.04	
CMCT565	266	0.06	196	0.08	
	256	0.94	186	0.04	
CMCT598	314	0.45	CMCT664	238	0.94
	300	0.32		208	0.06
	286	0.23	CMCT674	288	0.06
CMCT602	160	0.94		276	0.11
	158	0.06	256	0.17	
CMCT619	264	0.42	246	0.67	
	252	0.54	CMCT720	278	0.14
	238	0.04		238	0.55
CMCT632	138	0.05	228	0.05	
	136	0.05	224	0.05	
	130	0.23	220	0.23	
	128	0.68	CMCT726	236	0.52
CMCT641	246	0.05		232	0.35
	242	0.65	220	0.13	
	238	0.25			
	232	0.25			

ที่มา: จากการคำนวณ

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง	ขนาด ของอัลลีล	ความถี่ของ อัลลีล	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง	ขนาด ของอัลลีล	ความถี่ของ อัลลีล
CMCT746	322	0.05	CMCT933	185	0.04
	302	0.16		183	0.08
	288	0.05		180	0.21
	280	0.21		168	0.25
	274	0.47		166	0.13
	248	0.05		145	0.04
	198	0.60		135	0.25
CMCT775	194	0.35	CMCT944	305	0.05
	180	0.05		303	0.05
	372	0.76		299	0.55
CMCT781	366	0.18	CMCT950	293	0.27
	356	0.06		284	0.05
	318	0.09		271	0.05
CMCT799	306	0.22	126	0.31	
	304	0.17	124	0.38	
	288	0.09	122	0.17	
	282	0.43	120	0.14	
	222	0.04			
CMCT904	220	0.48			
	216	0.25			
	214	0.09			
	212	0.09			
	200	0.04			

ที่มา: จากการคำนวณ

ตารางผนวกที่ ข2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำของ Microsatellite ดีเอ็นเอและความสามารถในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite

จำนวนซ้ำ	จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมาย	จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายให้ Polymorphic	% Polymorphic
4-8	18	8	44%
9-11	10	9	90%
≥ 12	29	28	97%

ภาคผนวก ข

รายละเอียดต้นทุนที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของแตงกวา

ตารางผนวกที่ ข1 ราคาของปัจจัยการผลิตที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT

รายการ	ราคา (บาท)	ปริมาณ	ราคาต่อหน่วย
เมล็ดพันธุ์	8,500.00	1,000 กรัม	8.50
ต้นกล้าพันธุ์	0.45	1 ต้น	0.45
Peat moss	614.65	1 กระสอบ	614.65
Vermiculites	632.80	1 กระสอบ	632.80
วัสดุเพาะใช้ Peat moss 8: Vermiculite 1	5,550.00	9 กระสอบ	616.67
วัสดุเพาะ 1 กระสอบ	616.67	45 กระบะ	13.70
กระบะเพาะ	13.18	1 กระบะ	13.18
ปุ๋ย			
15-15-15	610.40	50 กิโลกรัม	12.21
21-0-0	400.50	50 กิโลกรัม	8.01
สารเคมี			
สกาย	257.60	500 กรัม	0.52
ซอสแม็ค	44.80	100 ซีซี	0.45
น็อกทรีน	257.60	1,000 ซีซี	0.26
คอมโบ	187.04	500 ซีซี	0.37
คาโคนิล	274.18	500 กรัม	0.55
โนมิลคิล	117.60	250 กรัม	0.47
อโทรนิล	64.96	50 ซีซี	1.30
ออร์กามิน	108.64	500 ซีซี	0.22
มามีโกร12-9-6	56.00	500 ซีซี	0.11
มามีโกร12-27-23	47.04	1,000 กรัม	0.05
เบสมอร์	30.24	100 ซีซี	0.30
ค้ำ	0.80	1 ค้ำ	0.80
พลาสติกคลุมแปลง1.20 x 200 เมตร	1,259.39	1 ม้วน	1259.39
เชือกฟาง	20.00	1 ม้วน	20.00
น้ำมันเชื้อเพลิงเฉลี่ย	626.43	1 ครั้ง	626.43

ตารางผนวกที่ ข2 ค่าจ้างแรงงาน ค่าจ้างรถไถ ค่าซ่อมแซม ค่าเช่าที่ดินและค่าเสื่อมราคา ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี GOT

รายการ	ต้นทุน (บาท)	หน่วย
ค่าจ้างแรงงาน รายวัน	120.00	ต่อวัน
ค่าจ้างเจ้าหน้าที่ตรวจสอบคุณภาพ	12,000.00	บาท/เดือน
ค่าจ้างผู้เชี่ยวชาญ	25,000.00	บาท/เดือน
ค่าจ้างรถไถ เฉลี่ย	321.43	บาท/ครั้ง
ค่าซ่อมแซมวัสดุอุปกรณ์การเกษตร	50.22	บาท/21 วัน
ค่าซ่อมแซมวัสดุอุปกรณ์การเกษตร	78.91	บาท/33 วัน
ค่าเช่าที่ดิน	3,000.00	ไร่/ปี
ค่าเช่าที่ดิน	750.00	งาน/ปี
ค่าเช่าที่ดิน	62.50	งาน/เดือน
ค่าเสื่อมราคาวัสดุอุปกรณ์การเกษตร	173.65	บาท/21 วัน
ค่าเสื่อมราคาวัสดุอุปกรณ์การเกษตร	272.87	บาท/33 วัน

ตารางผนวกที่ ข3 ราคาสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค
SSLP

รายการสารเคมี	ราคา	ราคารวมภาษี	ปริมาณ หน่วย	ราคาต่อหน่วย หน่วย
Acetic Acid Glacial	580	620.60	2,500 ml	0.25 ml
Acrylamide	3,500	3,745.00	500 g	7.49 g
Agarose	6,000	6,420.00	100 g	64.20 g
Amonium Persulfate APS	3,000	3,210.00	100 g	32.10 g
Bine silane	5,600	5,992.00	25,000 ul	0.24 ul
Bis acrylamide	2,600	2,782.00	100 g	27.82 g
Boric acid	1,400	1,498.00	1,000 g	1.50 g
BPB Bromphenol blue	1,700	1,819.00	25 g	72.76 g
Choloform	950	1,016.50	2,500 ml	0.41 ml
Clearview	120	128.40	200 ml	0.64 ml
CTAB	5,000	5,350.00	500 g	10.70 g
dNTP 100 mM	4,550	4,868.50	1,000 ul	4.87 ul
EDTA	660	706.20	250 g	2.82 g
ETOH	1,000	1,070.00	2,500 ml	0.43 ml
Etridium Bromide 10mg/ml	1,000	1,070.00	10,000 mg	0.11 mg
Formaldehyde 37 %	870	930.90	2,500 ml	0.37 ml
Formamide 98%	2,500	2,675.00	500 ml	5.35 ml
Glycerol	1,690	1,808.30	2,500 ml	0.72 ml
Hydrochloric acid	450	481.50	2,500 ml	0.19 ml
Isoamyl Alcohol	2,000	2,140.00	500 ml	4.28 ml
Isopopanal Alcohol	2,000	2,140.00	500 ml	4.28 ml
Lauroly-sarkosine	1,700	1,819.00	100 g	18.19 g
Primer forward 100 uM	500	535.00	200 ul	2.68 ul
Primer revers 100 uM	500	535.00	200 ul	2.68 ul
Polyvinyl Pyrolidene (PVP)	1,500	1,605.00	100 g	16.05 g
Sodium dodecyl sulfte (SDS)	10,500	11,235.00	1,000 g	11.24 g
Silver nitrate	2,200	2,354.00	100 g	23.54 g
Sodium bisulfite	520.00	556.40	500 g	1.11 g
Sodium Carbonate	890.00	952.30	1,000 g	0.95 g
Sodium Chloride	220.00	235.40	1,000 g	0.24 g
Sodium Hydroxide pellet	340.00	363.80	1,000 g	0.36 g

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

รายการสารเคมี	ราคา	ราคารวมภาษี	ปริมาณ	หน่วย	ราคาต่อหน่วย	หน่วย
Sodium Thiosulfate	470.00	502.90	500 g		1.01 g	
Sucrose	1,500.00	1,605.00	1,000 g		1.61 g	
TEMED	1,500.00	1,605.00	50 ml		32.10 ml	
Tris	4,200.00	4,494.00	1,000 g		4.49 g	
Tris-base	1,500.00	1,605.00	500 g		3.21 g	
Urea	1,800.00	1,926.00	1,000 g		1.93 g	
XC	2,800.00	2,996.00	10 g		0.30 mg	
Lamda DNA 500 ug/1ul	2,270.00	2,428.90	10,000 ul		0.24 ul	
dNTP 100 mM	4,550.00	4,868.50	1000 ul		4.87 ul	
Taq polymerase	7,500.00	8,025.00	1000 u		8.03 u	
PhiX 174 DNA /Hinf I marker 50	4,010.00	4,290.70	1000 ul		2.19 ul	
Hinf I	4,095.00	4,381.65	1250 u		3.51 u	
PhiX 174 DNA 50 ug	3,410.00	3,648.70			3,648.70/50ug	

ตารางผนวกที่ ข4 ราคาวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSLP

รายการวัสดุอุปกรณ์	ราคา	ราคารวมภาษี	ปริมาณ	หน่วย	ราคาต่อหน่วย
PCR plate	3,750.00	4,012.50	25.00	Piece	160.50
PCR tube	4,400.00	4,708.00	3,000.00	Piece	1.57
Tip 1000 ul	2,000.00	2,140.00	3,000.00	Piece	0.71
Tip 200 ul	1,400.00	1,498.00	3,000.00	Piece	0.50
Tube 1.5-1.7 ml	2,000.00	2,140.00	3,000.00	Piece	0.71
ถุงมือ	115.00	123.05	100.00	Piece	1.23

ตารางผนวกที่ ข5 ต้นทุนต่อหน่วยของสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SSLP

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (B)	Cost of reagents (B)	Cost of solution (B)	Final cost of solution per unit (B)
JC solution									
0.5% Acitic acid in 95 % ethanal 100 ml		100ml						40.58	0.41B/ml
95% ETOH			99.5ml		0.41		40.46		
Acitic acid			0.5ml		0.25		0.12		
40% acrylamide 500 ml		500ml						1,851.10	3.70B/ml
Acrylamide			190g		7.49		1,423.10		
Bis-acryamide			10g		42.80		428.00		
4.5% Acrylamide solution + Urea 1 L		1,000 ml						1,326.35	1.33B/ml
40% acrylamide			112.5ml		3.70		416.50		
Urea 7.5M			450g		1.93		866.70		
5XTBE			200ml		0.22		43.15		
ddH2O			688ml						
0.8% Agarose		100ml						51.36	0.51B/ml
Agarose			0.8 g		64.20		51.36		
10% APS solution 50 ml		50ml						160.50	3.21B/ml
Ammonium Persulfate (APS)			5g		32.10		160.50		
ddH2O			50ml						
Bind-Silane solution								0.72	0.24B/ul
Bind-silane			3ul		0.24		0.72		

ตารางผนวกที่ ๗๕ (ต่อ)

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (฿)	Cost of reagents (฿)	Cost of solution (฿)	Final cost of solution per unit (฿)
JC solution									
Blue juice	1,000ml							594.15	0.59฿/ml
Glycerol			700ml			0.72	506.32		
5X TBE			100ml			0.22	21.58		
0.5M EDTA buffer pH8.0			40ml			0.00	0.13		
20%SDS			10ml			2.25	22.47		
10%Bromphenolblue			60ml			0.73	43.66		
10 %Brom Phenol Blue	1,000ml							727.60	0.73฿/ml
Bromphenolblue			10 g			72.76	727.60		
Choloform:Isoamyl 24:1	2500ml							1,403.84	0.56฿/ml
Choloform			2400ml			0.41	975.84		
Isoamyl			100ml			4.28	428.00		
2 %CTAB	100ml							39.42	0.39฿/ml
CTAB			2g			10.70	21.40		
Tris -Cl pH8.0			10ml		1M	0.00	0.03		
EDTA			4ml		0.5M	0.00	0.01		
NaCl			27.9ml		5M	0.07	1.92		
PVP			1g			16.05	16.05		

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (฿)	Cost of reagents (฿)	Cost of solution (฿)	Final cost of solution per unit (฿)
JC solution									
Extraction buffer 1L		1000ml						236.25	0.24฿/ml
Sucrose			119.8g		0.35 M	1.61	192.28		
Tris			12.1g		0.1 M	3.21	38.84		
EDTA			1.68g		5 mM	2.82	4.75		
HCl			2ml			0.19	0.39		
DNA Extraction solution		12ml						5.55	0.46฿/ml
Extraction buffer			5ml			0.24	1.18		0.00฿/ul
Nuclei lysis buffer			5ml			0.17	0.84		
5% Sakosyl 1			2ml			0.91	1.82		
Sodium Bisulfite			0.1g			1.11	0.11		
PVP			0.1g			16.05	1.61		
DNA Sequencing Strop Solution		200ml						1,050.47	5.25฿/ml
formamide 98%			196ml		98%	5.35	1,048.60		0.01฿/ul
Bromophenol Blue			0.005g		0.025%	72.76	0.36		
Xylene Cyanol			5mg		0.025%	0.30	1.50		
0.5M EDTA pH8.0			4ml		10mM	0.00	0.01		
10 mM dNTP mixture		100µl						48.69	0.49฿/ul
100 mM dNTP mixture			10µl			4.87	48.69		
ddH2O			90µl						

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (฿)	Cost of reagents (฿)	Cost of solution (฿)	Final cost of solution per unit (฿)
JC solution									
0.5 M EDTA pH8.0	1,000ml							3.19	0.00฿/ml
EDTA(MW = 372.24)			186.12g				2.82		
NaOH pellet			20g				0.36		
dH ₂ O			980ml						
95 %ETOH	1,000ml							406.60	0.41฿/ml
ETOH (Absolute Alcohol)			950ml		0.43		406.60		
ddH ₂ O			50ml						
90 %ETOH	1,000ml							385.20	0.39฿/ml
ETOH			900ml		0.43		385.20		
ddH ₂ O			100ml						
70 %ETOH	1,000ml							299.60	0.30฿/ml
ETOH			700ml		0.43		299.60		
ddH ₂ O			300ml						
10 mg/ml Ethidium Bromide Stock	10ml							10.70	1.07฿/ml
Ethidium Bromide			100mg			0.11	10.70		0.00฿/ul
ddH ₂ O			10ml						
Ethidium bromide re-staining solution	1000ml							0.11	0.00฿/ml
ddH ₂ O			1000ml						
10 mg/ml Ethidium Bromide Stock			100µl			0.00	0.11		
Lamda DNA 50 ng/ul	10000ul								0.24฿/ul
Lamda DNA 500 ug/ul			1ul			2,428.90	2,428.90		

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (฿)	Cost of reagents (฿)	Cost of solution (฿)	Final cost of solution per unit (฿)
JC solution									
Nuclei lysis buffer 1 L	1000ml							167.55	0.17฿/ml
Tris			24.2g		0.2M	3.21	77.68		
EDTA			18.6g		0.05M	2.82	52.54		
NaCl			116.9g		2M	0.24	27.52		
CTAB			20g		2%	0.39	7.88		
HCl			10ml			0.19	1.93		
NaCl (5 M)	1000ml							68.78	0.07฿/ml
NaCl (MW 58.44)			292.2g			0.24	68.78		
dH ₂ O			960ml						
PhiX 174 DNA Digested with <i>Hinf</i>I (MWM)	1000ul							3,687.96	3.69฿/ul
ddH ₂ O			120μl						
10X Buffer			20μl		1X				
Phi X 174 DNA			50u		50 ug	3,648.70	3,648.70		
<i>Hinf</i> I			10units			3.51	35.05		
Sequencing dye			800ul			0.01	4.20		
Primer									
Forvert Primer 10 uM	200ul							53.50	0.27฿/ul
Primer 100 uM			20ul			2.68	53.50		
ddH ₂ O			180ul						

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (฿)	Cost of reagents (฿)	Cost of solution (฿)	Final cost of solution per unit (฿)
JC solution									
Reward Primer 10 uM	200ul							53.50	0.27฿/ul
Primer 100 uM			20ul			2.68	53.50		
ddH ₂ O			180ul						
5% Sakosyl 1 L	1000ml							909.50	0.91฿/ml
lauroly-sarkosine			50g		5%	18.19	909.50		
dH ₂ O			980ml						
20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 1 L	1,000ml							2,247.00	2.25฿/ml
SDS			200g			11.24	2,247.00		
dH ₂ O			950ml						
Silver Staining Solution 1 (Fixer)	2000ml							49.65	0.02฿/ml
Acetic Acid			200ml		10%	0.25	49.65		
ddH ₂ O			1800ml						
Silver Staining Solution 2 (Sliver stain)	2000ml							48.20	0.02฿/ml
Silver nitrate (AgNO ₃)			2g		0.20%	23.54	47.08		
37%Formaldehyde			3ml			0.37	1.12		
ddH ₂ O			995ml						
Silver Staining Solution 3 (Developer)	2000ml							58.27	0.03฿/ml
Sodium carbonate			60g		3%	0.95	57.14		
37%Formaldehyde			3ml			0.37	1.12		
Sodium thiosulfate			0.01g			1.01	0.01		

ตารางผนวกที่ ๗5 (ต่อ)

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (฿)	Cost of reagents (฿)	Cost of solution (฿)	Final cost of solution per unit (฿)
JC solution									
50X TAE Buffer 1 L	1,000ml							791.31	0.79฿/ml
Tris base			242g			3.21	776.82		
Acetic acid Glacial			57.1ml			0.25	14.17		
0.5M EDTA buffer pH 8.0			100ml			0.00	0.32		
ddH2O			940ml						
1X TAE Buffer 1 L	1000ml							15.83	0.02฿/ml
50X TAE Buffer			20ml			0.79	15.83		
ddH2O			980ml						
5X TBE buffer, pH 8.0 1 L	1000ml							215.75	0.22฿/ml
Tris base			54g		0.45 M	3.21	173.34		
Boric acid			27.5g		0.45 M	1.50	41.20		
0.5 M EDTA			20ml		10 mM	0.00	0.06		
ddH2O			950ml						
HCl			6ml			0.19	1.16		
1X TBE buffer, pH 8.0 1 L	1000ml							43.15	0.04฿/ml
5X TBE buffer, pH8.0			200ml			0.22	43.15		
dH2O			800ml						
10X TE pH 8.0	1,000ml							0.40	0.00฿/ml
1M Tris buffer pH8.0			100ml			0.00	0.34		
0.5M EDTA buffer pH8.0			20ml			0.00	0.06		
dH2O			880						

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

Solutions	Final values	Unit	Quantity	Unit	Final concentration	Units of final concentration (฿)	Cost of reagents (฿)	Cost of solution (฿)	Final cost of solution per unit (฿)
JC solution									
1X TE pH8.0	1,000ml							0.04	0.00฿/ml
10X TE pH 8.0			100ml			0.00	0.04		
dH2O			900ml						
TE dye	1,000ml							118.86	0.12฿/ml
Blue juice			200ml			0.59	118.83		0.00฿/ul
1X TE			800ml			0.00	0.03		
0.5M Tris HCl pH 7.5	1,000ml							3.40	0.00฿/ml
Tris-Base	121.141M		60.57g				3.21		
dH2O			920ml						
HCl			65ml				0.19		
1M Tris HCl pH 8.0	1,000ml							3.40	0.00฿/ml
Tris-Base			121.14g				3.21		
dH2O			940ml						
HCl			40ml				0.19		