ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
ปริญญา

พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์
สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

DNA Fingerprinting of Eucalypt Clones using Microsatellite Markers

นามผู้วิจัย นายธนรัตน์ ก.จันทราภานนท์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, Dr.Agr.Sci.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ .... **เดือน** .... **พ.ศ.** ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

DNA Fingerprinting of Eucalypt Clones using Microsatellite Markers

โดย

นายธนรัตน์ ก.จันทราภานนท์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธนรัตน์ ก.จันทราภานนท์ 2553: การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr. 58 หน้า

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ได้นำมาใช้ตรวจสอบโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ที่คัดเลือกมาทั้งหมด 39 คู่มีเพียง 28 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และมี 18 คู่ ที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสได้ จากการตรวจสอบดีเอ็นเอทั้ง 25 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ 18 คู่ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทั้งหมด 152 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA (unweighed pair group method using arithmetic average) พบว่าสามารถสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมซึ่งจัดกลุ่มยูคาลิปตัสออกเป็น 4 กลุ่ม เมื่อทำการคัดเลือกไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex PCR พบว่ามีไพรเมอร์ 4 คู่ ที่สามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกัน คือ EMBRA 2 กับ 22, 2 กับ 63, 22 กับ 69 และ 63 กับ 69 อีกทั้งยังได้โคลนชิ้นดีเอ็นเอ หาลำดับเบส และ ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ 6 คู่ แต่มีเพียง 4 คู่ ที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างได้ มี 3 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอแบบ muti-locus คือ NEM 1, 4 และ 6 อีก 1 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอแบบ single-locus อย่างไรก็ตามเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่คัดเลือกมาสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างยูคาลิปตัสที่มีความใกล้ชิดกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

________________ __________________________ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tanarat K.Jantapanon 2010: DNA Fingerprinting of Eucalypt Clones using Microsatellite Markers. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Surin Peyachoknagul, Dr.Agr. 58 pages.

Microsatellite marker was used to verify 25 eucalyptus clones. Thirty nine primer pairs were selected. Twenty eight primer pairs could amplify DNA in which 18 of them showed polymorphic band pattern among 25 eucalyptus clones. One hundred and fifty-two distinct DNA bands were scored and calculated for the genetic similarity and cluster analysis using simple matching and UPGMA (unweighed pair group method using arithmetic average). The constructed phylogenetic tree divided these eucalytus into four clusters. Two pairs of primer each, EMBRA 2 and 22, 2 and 63, 22 and 69 or 63 and 69, were selected to amplify DNA in the same reaction as a duplex PCR. In addition, five DNA fragments were cut from the gel, cloned, and sequenced. Six primer pairs were designed from these sequences. Three primer pairs, NEM 1, 3 and 6, showed multi-locus DNA bands and another one, NEM 2, showed single-locus DNA band. The result showed that these microsatellite markers could be used to examine and compare the genetic resources among closely related samples.

____________________________ ____________________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช ที่ให้ความรู้คำแนะนำ การช่วยเหลือ พร้อมทั้งการกระตุ้นการปฏิบัติการและการเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับงบประมาณในการทำงานวิจัย และทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 4612 ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือต่างๆ ที่ได้รับ ทั้งการให้คำปรึกษา การให้ข้อคิดเห็น

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมารดา นางกาญจนา ก.จันทราภานนท์ และบิดา นายอดุลย์ญาณ ก.จันทราภานนท์ ที่คอยอบรมเลี้ยงดูให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ และเป็นพลังในการผลักดันข้าพเจ้าเสมอมา

ธนรัตน์ ก.จันทราภานนท์

พฤษภาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	22
สรุปและข้อเสนอแนะ	44
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	45
ภาคผนวก	53
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	58

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ใช้ศึกษา แหล่งกำเนิด และบริเวณที่ปลูกของต้นพ่อแม่	15
2	ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	22
3	ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์	31
4	ลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ที่ได้จากโปรแกรม Fast PCR v.6	41

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 1, 2, 4 และ 5 ในยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่าง	24
2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 6, 7, 10 และ 11 ในยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่าง	25
3	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 5 และ EMBRA 6 ในยูคาลิปตัส 10 ตัวอย่าง เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel	26
4	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 5 และ EMBRA 6 ในยูคาลิปตัส 10 ตัวอย่าง เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโฟรีซิสใน non-denaturing polyacrylamide gel	27
5	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 2 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง	28
6	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 5 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง	28
7	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 18 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง	29
8	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 69 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง	29
9	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 179 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง	30
10	ดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ของโคลนยูคาลิปตัสที่ได้จากข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์	34
11	Phylogenetic tree ของยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.2	35
12	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ 22 ในยูคาลิปตัส 25 อย่าง	37
13	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ 63 ในยูคาลิปตัส 25 อย่าง	38
14	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 22 กับ 69 ในยูคาลิปตัส 25 อย่าง	39
15	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 63 กับ 69 ในยูคาลิปตัส 25 อย่าง	40
16	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ NEM 1	42

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ NEM 2	43

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสด้วยเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์

DNA Fingerprinting of Eucalypt Clones using Microsatellite Markers

คำนำ

จากข้อมูลดาวเทียมปี 2536 ประเทศไทยมีพื้นที่ป่าไม้เหลือเพียง 133,554.00 ตารางกิโลเมตร คิดเป็น 26.03 % ของพื้นที่ประเทศ แต่ความต้องการใช้ไม้ฟืนในครัวเรือนและอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีความต้องการไม้จำนวนมาก ทำให้ขาดแคลนแหล่งทรัพยากร ดังนั้น การแก้ปัญหาจึงต้องเร่งส่งเสริมการปลูกไม้เพื่อใช้สอยในครัวเรือน และอุตสาหกรรมที่จะมีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งไม้ที่จะปลูกควรเจริญเติบโตเร็ว ปลูกง่าย ทนต่อสภาพแห้งแล้ง และสามารถขึ้นได้ในพื้นที่ดินเสื่อมโทรมที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ไม้ยูคาลิปตัสเป็นไม้โตเร็วชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมดังที่กล่าวมา มีรูปทรงลำต้นตรงสามารถเจริญเติบโตและตัดฟันเพื่อใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่อายุ 3-5 ปี และยังสามารถแตกหน่อได้ดีโดยไม่ต้องปลูกใหม่ (กรมป่าไม้, 2548) และเมื่อมีการสำรวจใหม่ในปี 2547 พบว่ามีพื้นที่ป่าไม้เพิ่มขึ้นเป็น 167,590.98 ตารางกิโลเมตร คิดเป็น 32.66% ของพื้นที่ประเทศ

ประเทศไทยได้นำยูคาลิปตัสเข้ามาทดลองปลูกครั้งแรกในปี พ.ศ. 2492 (เกษมสุข, 2533) ต่อมาได้มีการปลูกยูคาลิปตัส 13 สปีชีส์ (species) ที่ศูนย์อนุรักษ์ไม้ป่าอินทขิลอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า *Eucalyptus camaldulensis* มีอัตราการรอดตายสูงกว่าสปีชีส์อื่น ๆ และยังสามารถปลูกได้ในพื้นที่ดินเค็มด้วย ปัจจุบันพบว่า *E. camaldulensis* มีฐานพันธุกรรมค่อนข้างคงที่ เนื่องจากได้รับการส่งเสริมการปลูกกันอย่างแพร่หลายและมีการขยายพันธุ์จากโคลนเดิมที่มีคุณภาพดี ดังนั้น จึงได้มีแนวความคิดในการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัสเพื่อให้มีฐานพันธุกรรมที่กว้างขึ้นด้วยการผสมพันธุ์ระหว่าง *E. camaldulensis* และยูคาลิปตัสสปีชีส์อื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าได้มีการนำพันธุ์ใหม่ ๆ เข้ามาปลูกเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีการรวบรวมหรือตรวจสอบจำนวนพันธุ์ที่แน่นอน จึงอาจมีความสับสน หรือซ้ำซ้อนในเรื่องของพันธุ์อยู่มาก การคัดเลือกยูคาลิปตัสลูกผสมที่มีลักษณะตามที่ต้องการนั้นต้องใช้เวลาเพื่อรอให้ต้นไม้โตเต็มที่ ซึ่งต้องใช้เวลานาน

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ มีหลายวิธี แต่วิธีที่เหมาะสำหรับตรวจสอบเพื่อการรับรองพันธุ์ คือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่มีความแม่นยำ น่าเชื่อถือ จึงมีการใช้อย่างแพร่หลายในพืชหลายชนิด เช่น พืชตระกูลถั่ว (Yu *et al.*,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1999) *Silene vulgaris* (Juillet *et al*., 2003) อะราบิดอปซิส (Clauss *et al*., 2002) กล้วยไม้สกุล *Ophyrus* (Soliva *et al*., 2000) เป็นต้น ในยูคาลิปตัสมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากหลายชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางพันธุกรรม ระบุพันธุ์ที่แน่นอน ตรวจสอบหาพันธุ์พ่อแม่ และการทำแผนที่ยีนใน *E. grandis* และ *E. urophylla* (Brondani *et al*.,1998; Brondani *et al*.,2002; Grattapaglia *et al*.,2004; Kirst *et al*., 2005) การตรวจสอบระบุพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน *E. globulus* (Steane *et al*., 2001) และ *E. leucoxylon* (Ottewell *et al*., 2005) เป็นต้น โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากยูคาลิปตัสบางชนิด สามารถนำมาใช้กับยูคาลิปตัสชนิดอื่นได้ด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับยูคาลิปตัส และนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าวไปใช้จำแนกโคลนพันธุ์ และ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไปของยูคาลิปตัส

ยูคาลิปตัสเป็นพันธุ์ไม้ที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae สกุล *Eucalyptus* พบมากกว่า 600 สปีชีส์ (สุขุน, 2538) ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปออสเตรเลีย สปีชีส์ที่มีความสำคัญได้แก่ *E. grandis*, *E. glubulus*, *E. citriodura*, *E. acmenioides*, *E. saligna*, *E. viminalis*, *E. maculata*, *E. cypellocarpa*, *E. tereticornis*, *E. maginata*, *E. nitens*, *E. regnans*, *E. camaldulensis*, *E. calophylla* และ *E. diversicolor* นอกจากนี้ยังมีถิ่นกำเนิดในหมู่เกาะอินโดมาเลเซียนอีก 2 สปีชีส์ คือ *E. deglupta* ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พื้นเมืองของประเทศปาปัวนิวกินี ติมอร์ อินโดนีเซีย และทางตอนใต้ของเกาะมินดาเนา ประเทศฟิลิปปินส์ และ *E. urophylla* ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พื้นเมืองของประเทศติมอร์และอินโดนีเซีย (Lindsay, 1976)

ยูคาลิปตัสเป็นพันธุ์ไม้ที่มีลักษณะเฉพาะ ซึ่งไม่เหมือนกับพันธุ์ไม้อื่น เช่น ใบอ่อนมีลักษณะแตกต่างไปจากใบแก่ เปลือกมีลักษณะต่าง ๆ ตั้งแต่เปลือกล่อนสีขาวนวลไปจนกระทั่งเปลือกติดตลอดไปกับต้น ใบมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันไปตั้งแต่ใบกลมไปถึงใบเรียวแบบต่าง ๆ ก้านใบ ดอก และเมล็ดก็มีรูปร่างลักษณะแบบต่าง ๆ เช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยูคาลิปตัสยังสามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่หลากหลายประเภท ตั้งแต่เขตร้อนจนถึงเขตหนาวซึ่งมีอุณหภูมิ 3-40 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 200-2,000 มิลลิลิตร/ปี ความสูงจากระดับน้ำทะเล 5-1,000 เมตร และยังสามารถปรับตัวเข้ากับดินได้ทุกประเภท (Ponfole, 1961)

จากการทดลองปลูกยูคาลิปตัสในพื้นที่หลายแห่ง พบว่ายูคาลิปตัสเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่มีอากาศร้อน ปัจจุบันพื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสแพร่ขยายไปทั่วโลกและเพิ่มขึ้นทุกปี มีการปลูกเป็นการค้าในหลายประเทศ ได้แก่ บราซิล แอฟริกาใต้ สเปน โปรตุเกส โมรอคโค อาร์เจนตินา สหรัฐอเมริกา มาดากัสการ์ อุรุกวัย เปรู อินเดีย เนปาล ปากีสถาน ศรีลังกา บังคลาเทศ เป็นต้น นอกจากนี้ยูคาลิปตัสยังปลูกเป็นไม้ประดับข้างถนนเพื่อให้ร่มรื่นในบางประเทศ เช่น จีน และพม่า เป็นต้น (Eldridge, 1997)

สำหรับประเทศไทย มีผู้นำเมล็ดยูคาลิปตัสหลายสปีชีส์เข้ามาครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2489 ในปี พ.ศ. 2492 มีหลักฐานว่ามีการทดลองปลูกยูคาลิปตัสครั้งแรกที่จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดอื่น ๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เช่น สุราษฎร์ธานี ศรีสะเกษ และกาญจนบุรี พบว่ายูคาลิปตัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีมีเพียงไม่กี่สปีชีส์ เช่น *E. camaldulensis*, *E. deglupta, E. citriodura* และ *E. tereticornis* โดย *E. camaldulensis* มีการเจริญเติบโตและการรอดตายสูงที่สุด (บุญวงศ์, 2537)

2. การใช้ประโยชน์ของยูคาลิปตัส

ไม้ยูคาลิปตัสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการเหมือนกับไม้ชนิดอื่น สามารถจำแนกการใช้ประโยชน์ตามลักษณะต่าง ๆ ได้ดังต่อไปนี้

1. การใช้ประโยชน์ในการก่อสร้างทั่วไป ไม้ยูคาลิปตัสแม้ว่าจะมีข้อตำหนิ เนื้อไม้บิดงอ แต่ก็มีผู้นำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ในประเทศออสเตรเลียไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส สามารถนำไปใช้สำหรับเป็นโครงสร้างบ้านเรือนและเป็นไม้หมอนรถไฟได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังนำมาใช้ภายในโดยทำเป็นเฟอร์นิเจอร์

2. การใช้ประโยชน์ด้านพลังงานเชื้อเพลิงในรูปฟืนและถ่าน ไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส นับว่าเป็นไม้ฟืนที่มีคุณภาพดีกว่าไม้ฟืนของไม้หลายชนิด เช่น ไม้กระถินยักษ์ ไม้กระถินณรงค์ ไม้สนประดิพัทธ์

3. การใช้ประโยชน์ในด้านน้ำมัน น้ำมันจากต้นยูคาลิปตัสสามารถใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และน้ำมันหอมระเหย

4. การใช้ประโยชน์ในการย้อมสี สารที่อยู่ในเปลือก ใบ ดอก หรือตาดอกของยูคาลิปตัส สามารถให้สีต่าง ๆ กัน ตั้งแต่สีแดง สีส้ม สีเหลือง ขึ้นอยู่กับชนิดของยูคาลิปตัสและสารเคมีที่ทำให้สีติด (พิจิตร, 2546)

5. การใช้ประโยชน์ในด้านเยื่อกระดาษ พบว่าผลผลิตส่วนใหญ่ของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ในรูปแบบเยื่อสั้น จากการศึกษาคุณสมบัติของเส้นใย ของยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสที่มีอายุ 10 ปี โดยทัศนีย์ และคณะ (2525) พบว่ามีความยาวของเส้นใย 1.1895 มิลลิเมตร มีความกว้างของเส้นใย 0.0220 มิลลิเมตร และมีความกว้างของ fiber lumen 0.0150 มิลลิเมตร และจากการที่เส้นใยยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสมีผนังเซลล์บาง ทำให้มีแนวโน้มที่เส้นใยยึดติดกันได้ดี แรงยึดติดระหว่างเส้นใยสูง เมื่อใช้ทำกระดาษจะได้กระดาษที่แข็งแรงและเหนียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ยังได้มีการใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ อีกมาก เช่น การใช้ทำแผ่นชิ้นไม้อัด แผ่นใยไม้อัด ชิ้นไม้ผสมปูนซีเมนต์ เป็นต้น (สุชาติ, 2528) ในประเทศไทยได้นำยูคาลิปตัสมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ใช้ในการผลิตกระดาษ เชื้อเพลิง ทำเฟอร์นิเจอร์ เลี้ยงผึ้ง สกัดเป็นน้ำมันหอมระเหย นำผสมกับสบู่ ยากันยุง โลชั่นบำรุงผิว ใช้ผลิตเจลทำความสะอาดมือ ผสมในลูกอมรสเมนทอล-ยูคาลิปตัส ทำน้ำส้มควันไม้ ใช้ในการก่อสร้างต่างๆ ผลิตเป็นยาดม ยาฆ่าเชื้อ ใช้เพิ่มรายได้ให้กับชาวนา โดยให้นำไปปลูกบนคันนาควบคู่ไปกับการปลูกข้าว อีกทั้งยังใช้ยูคาลิปตัสในการปลูกป่าทดแทนควบคู่กับไม้ชนิดอื่นเพื่อให้ป่ากลับมาฟื้นตัวได้เร็วขึ้น เป็นต้น

3. การปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัส

รูปแบบการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัสมีหลายรูปแบบแต่รูปแบบที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ nucleus breeding strategy เสนอโดย Cotterill (1989) ซึ่งปรับปรุงมาจากการปรับปรุงพันธุ์แกะในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ หลักการของการปรับปรุงพันธุ์รูปแบบนี้ คือ จะแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มประชากรหลัก (main population) เป็นประชากรที่มีฐานพันธุกรรมกว้าง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และกลุ่มประชากรขนาดเล็กที่มีการคัดเลือกเฉพาะสายต้นที่มีลักษณะดีเด่น (nucleus population) ได้จากการคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีลักษณะดีเด่น (best parents) จากกลุ่มประชากรหลัก นำมาผสมกันเอง (best with best) แบบควบคุม (control pollination) จะได้ลูกผสมแบบ full-sib progeny นำไปปลูกทดสอบและคัดเลือกต้นที่ให้ลักษณะดีเด่นที่สุด ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพื่อปลูกต่อไป การปรับปรุงพันธุ์ในรูปแบบนี้จะให้ genetic gain สูงประมาณ 20-40% ทั้งนี้ขึ้นกับอัตราพันธุกรรม (heritability) ของลักษณะที่คัดเลือก จุดสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ในรูปแบบนี้ คือ การคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการสูงนั้น จะต้องเลือกต้นที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมสูงด้วย เพื่อให้ลูกผสมที่ได้ดีเด่นขึ้น วิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้สามารถคำนวณได้โดยใช้ข้อมูลทางพันธุศาสตร์เชิงปริมาณ (quantitative genetic data) และการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลที่น่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากกว่า (Dorothy *et al.*, 2006)

4. เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์ คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย และมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์ คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง (สุรินทร์, 2552) ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำ คือ สกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย และมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่น ๆ มากมาย เข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใส่ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2552)

Mutiplex PCR เป็นการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการตรวจสอบ แต่ยังมีข้อจำกัด คือ ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ต้องไม่มีส่วนที่เป็นคู่สมกัน และผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่จะต้องมีขนาดแตกต่างกัน อีกทั้งสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะต้องใกล้เคียงกันอีกด้วย (คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536)

ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ผลผลิตที่ถูกต้อง (non specific band) ซึ่งสามารถแก้ได้หลายวิธี ดังตัวอย่างต่อไปนี้ (สุรินทร์, 2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hot start PCR เป็นวิธีควบคุมให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มขึ้นหลังจากดีเอ็นเอเสียสภาพอย่างสมบูรณ์แล้วเท่านั้น ขณะเริ่มทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพครั้งแรกโดยเพิ่มอุณหภูมินั้น ไพรเมอร์อาจเข้าไปเกาะที่ตำแหน่งที่ไม่ถูกต้องและเกาะได้แบบไม่สมบูรณ์ แต่เอนไซม์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ได้ ทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ถูกต้อง วิธีที่จะป้องกันไม่ให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในช่วงที่เพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องไปถึงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพครั้งแรก ทำได้โดยยังไม่ใส่สารบางชนิดลงในปฏิกิริยาเช่น ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต แมกนีเซียมไอออน หรือเอนไซม์ โดยการใส่สารทุกชนิด ยกเว้นเพียง 1 ชนิด นำหลอดปฏิกิริยาไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่ดีเอ็นเอเสียสภาพแล้ว จึงใส่สารประกอบตัวสุดท้ายลงไป แต่การทำ hot start PCR โดยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลามาก อาจใช้เอนไซม์ที่มีการดัดแปลงโมเลกุลให้เริ่มทำปฏิกิริยาได้ เมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วเท่านั้น

Touch down PCR เป็นการทำพีซีอาร์โดยใช้สภาวะที่เข้มงวดมาก (high stringency) ในรอบแรก และค่อย ๆ ลดลงในรอบต่อมาตามลำดับ วิธีนี้ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณน้อย และมีแถบดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ด้วย การปฏิบัติใช้วิธีการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้สูงในรอบแรกและค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงทีละน้อยในรอบต่อ ๆ มาจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการทำปฏิกิริยาจริง ในรอบแรก ๆ ไพรเมอร์จะจับตัวกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ยาก เนื่องจากอุณหภูมิสูงกว่าค่า T_m มาก จึงจับตัวได้เฉพาะตำแหน่งที่ถูกต้องเท่านั้น ในรอบต่อ ๆ มาแม้ว่าจะลดอุณหภูมิลง แต่ผลผลิตที่ถูกต้องจะเพิ่มมากขึ้นเป็นหลายเท่าและมีมากกว่าดีเอ็นเออื่นมาก จึงไม่ต้องกลัวว่าไพรเมอร์จะจับตัวกับดีเอ็นเออื่นที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอีกต่อไป

5. เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายในทางพันธุศาสตร์ ใช้เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างภายในหรือระหว่างสปีชีส์ หรือประชากร (สุรินทร์, 2552) แบ่งออกกว้าง ๆ เป็น 3 ชนิด

1. เครื่องหมายที่ใช้ลักษณะปรากฏหรือลักษณะทางสัณฐาน (phenotypic หรือ morphological marker) คือ เครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้วิธีเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา หรือ สรีรวิทยา เช่น สีของผม สีของตา ลักษณะใบและจำนวนเกสรเพศผู้ เป็นต้น

2. เครื่องหมายที่ใช้ตัวบ่งชี้ทางเคมีหรือโปรตีน (biochemical หรือ protein marker) คือ เครื่องหมายที่ตรวจสอบได้โดยกระบวนการทางชีวเคมี เนื่องจากโปรตีนที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน ดังนั้นการตรวจสอบความแตกต่างของโปรตีนสามารถตรวจสอบได้ถึงความแตกต่างของแอลลีลของยีนที่ควบคุม ชนิดของเครื่องหมายโปรตีน เช่น ไอโซไซม์ (isozyme) และแอลโลไซม์ (allozyme) เป็นต้น

3. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมแพร่หลาย เพราะมีความหลากหลายสูง และตรวจได้ในระดับโมเลกุล ได้แก่ AFLP, RAPD และ SSR เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง และในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม หรือ ดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ ซึ่งข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นานกว่าเครื่องหมายโปรตีน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ ตรวจสอบได้ในทุกเนื้อเยื่อ ไม่ขึ้นกับการเจริญเติบโต ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบได้ทั้งในส่วนที่เป็นยีน หรือ ส่วนที่มีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ และครอบคลุมทั้งจีโนม วิธีตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอทำได้โดยหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงออกในรูปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชัน หรือ วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (สุรินทร์, 2552)

6. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในพืชและสัตว์ ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นคำที่ใช้เรียกการจัดเรียงตัวของเบสบนโครโมโซมที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน เพียง 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส ในตำแหน่งละไม่เกิน 100 ซ้ำ กระจายตัว อยู่ทั่วจีโนมและมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ลำดับซ้ำที่พบมากที่สุด ได้แก่ di- และ tri-nucleotide repeat (สุรินทร์, 2552) ส่วนมากพบในบริเวณที่ไม่ใช่รหัสในการสร้างโปรตีน (noncoding region) (Patarnell *et al*, 2001) ตัวอย่างเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลท์ เช่น ลำดับเบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซ้ำแบบโมโนนิวคลีโอไทด์ (C)n จะมีลำดับเบส CCCCC_CC เป็นจำนวน n ซ้ำ ลำดับเบสซ้ำแบบไดนิวคลีโอไทด์ (CA)n จะมีลำดับเบส CACACACA_ _ CA เป็นจำนวน n ซ้ำ ลำดับเบสซ้ำแบบไตรนิวคลีโอโอไทด์ (ATT)n จะมีลำดับเบส ATTATTATTATT_ _ _ ATT เป็นจำนวน n ซ้ำ เป็นต้น (วิชัยและคณะ, 2541)

ประเภทของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสามารถจำแนกได้ 6 ประเภท ดังนี้ 1) pure เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอซ้ำชนิดเดียวเรียงตัวต่อกันไปเรื่อย ๆ เช่น -(AC) $_{14}$- 2) interrupted pure เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีเบสอื่น เข้าแทรกในลำดับซ้ำชนิด pure ซึ่งเกิดจากการกลาย เช่น –TA-(CA)$_4$-TA-(CA)$_7$- 3) compound เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำหลายชนิดติดต่อกันเช่น -(CT)$_{22}$-(CA)$_6$ 4) interrupted compound เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีเบสอื่น ๆ เข้ามาแทรกในลำดับเบสซ้ำชนิด compound เช่น -(AC)$_{14}$-AG-AA-(AG)$_{12}$- 5) complex เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสในหน่วยซ้ำหลายชนิดทั้งไดนิวคลีโอไทด์ ไตรนิวคลีโอไทด์ หรือ เตตระนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น มาเรียงต่อกัน เช่น -(CACG)$_5$-(AG)$_{12}$-(ATA)$_7$- 6) interrupted complex เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีเบสอื่น ๆ เข้าแทรกในลำดับเบสซ้ำชนิด complex (Chambers and Macavoy, 2000)

ความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เกิดจากความแตกต่างของจำนวนซ้ำของลำดับเบสซ้ำ มีผลทำให้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีความหลากหลายสูง เนื่องจากมีการกลายเกิดขึ้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเข้าคู่ผิดตำแหน่งของลำดับเบสขณะที่มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (slippage during DNA replication) (Zane *et al.*, 2001) ทำให้เกิดการขาดหายไป (deletion) หรือการสอดแทรก (insertion) ของเบส นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจาก unequal crossing over ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของแอลลีล (allelic variation) ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (Richard and Pâques, 2000)

วิธีการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ใช้วิธีเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์หาความหลากหลายของจำนวนชุดของลำดับเบสซ้ำที่ปรากฏบนไมโครแซทเทลไลท์ได้ แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลท์ (flanking sequence) ในตำแหน่งนั้น ๆ ก่อน เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ (specific primer) สำหรับใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ได้โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Weber and May, 1989)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประโยชน์ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง จึงนิยมนำมาศึกษา และใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ใช้ในการจำแนกพันธุ์และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ลูกผสม เช่น การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ และความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพืชวงศ์แตง (จุลภาค, 2547) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ หลายชนิด เช่น องุ่น (Thomus and Scott, 1993) ถั่วเหลือง (Rongwen *et al*., 1995) มะม่วง (Eiadthong *et al*., 1999) มะพร้าว (Perera *et al*., 2001) กุ้งกุลาดำ (Xu *et al*., 2001) อ้อย (Cordeiro *et al*., 2003) รวมทั้งใช้ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ ใช้ในการทำแผนที่จีโนมในพืชและสัตว์ต่าง ๆ เช่น ข้าว (Zhao and Kochert, 1993) ข้าวโพด (Senior and Heun, 1993) ข้าวสาลี (Roder *et al*., 1998) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Lee and Kocher, 1996) ปลาเรนโบว์เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) (Sakamoto *et al*., 1999) ปลาดุกอเมริกัน (*Ictalurus punctus*) (Waldbieser *et al*., 2001) จากแผนที่จีโนมที่สร้างขึ้นมานี้ สามารถนำไปหาตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL, quantitative trait loci) ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การเจริญเติบโต ความต้านทานโรค หรือระยะการวางไข่ เป็นต้น เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการคัดพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (MAS, marker assisted selection) นอกจากนี้ยังสามารถใช้พิสูจน์บุคคลและหาความสัมพันธ์ในเครือญาติโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) (สุรินทร์, 2552)

ข้อดีและข้อจำกัดของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ โดยแต่ละไพรเมอร์จะตรวจสอบดีเอ็นเอตำแหน่งเดียว แต่ให้รูปแบบของแอลลีล หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหลายรูปแบบ (highly polymorphic) มีการกระจายทั่วไปในจีโนม แสดงลักษณะข่มแบบร่วมกัน (codominance) ข้อดีอีกประการหนึ่ง คือ เป็นเครื่องหมายที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งสามารถใช้เครื่องอัตโนมัติ ทำให้ประหยัดแรงงาน และทำได้รวดเร็ว สามารถพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ขึ้นเองโดยการโคลนและแยกได้โดยตรงจากจีโนมของตัวอย่าง หรือ จากการสืบค้นฐานข้อมูล เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในทุกสาขา แต่มีข้อจำกัดในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เนื่องจากมีหลายขั้นตอน ใช้เวลานาน และเสียค่าใช้จ่ายสูง (Maquire *et al*., 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในยูคาลิปตัส

งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ในยูคาลิปตัส เช่น Brondani *et. al*. (1998) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อใช้ในการทำแผนที่ (mapping) และแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์คือ *E. urophylla* และ *E. grandis* ซึ่งผลการวิจัย พบว่า สามารถทำแผนที่ และแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์นี้ได้เป็นอย่างดี ซึ่งไพรเมอร์ ที่ได้พัฒนาขึ้นมานั้นมีชื่อว่า EMBRA (*Eucalyptus* microsatellites from Brazil) ต่อมา Chaix *et. al*. (2002) ได้ปรับปรุงจากการทำพีซีอาร์แบบปกติมาเป็นแบบ multiplex PCR ซึ่งทำให้การตรวจสอบยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์คือ *E. urophylla* และ *E. grandis* ทำได้รวดเร็วขึ้น ต่อมาได้มีนักวิจัยหลายคนนำเอาไพรเมอร์นี้มาใช้ในการแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัสต่างสปีชีส์และแม้แต่พืชต่างชนิด เช่น Zucchi *et. al*. (2002) ได้นำไพรเมอร์ EMBRA มาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืช *Eugenia dysenterica* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Myrtaceae เช่นเดียวกับยูคาลิปตัส จากผลการวิจัยพบว่า สามารถหาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดี นอกจากนี้ นฤมล (2004) ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA 4, 7, 13, 17, 19 และ 20 ในการบ่งชี้ยูคาลิปตัส *E. camadulensis* กับ *E . tereticornis* และลูกผสมออกจากกัน ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ ที่ให้ผลดีมีอยู่ 2 ไพรเมอร์ คือ EMBRA 7 และ 20 และในปี 2006 Brondani *et. al*. ได้ใช้ ไพรเมอร์ EMBRA นี้ในการทำแผนที่ของยูคาลิปตัส *E. urophylla* และ *E. grandis* ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งต่อมา Nest *et. al*. (2000) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นจาก SSR มาเป็น ISSR และให้ชื่อไพรเมอร์ที่พัฒนาได้ว่า FMRSA ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่า FMRSA 1, 2, 3, 4 และ 5 ใช้จำแนกลูกผสมของยูคาลิปตัสชนิดอื่น ๆ ได้แต่ไม่ทั้งหมด นอกจากนี้ Steane *et. al*. (2001) ได้พัฒนาไพรเมอร์ ที่ให้ชื่อว่า EMCRC เพื่อใช้จำแนก *Eucalyptus globulus* ออกจากยูคาลิปตัสชนิดอื่น ๆ พบว่าไพรเมอร์ EMCRC 2, 3, 4, 8, 9, 11 และ 12 ให้ผลการแยกที่ดี ซึ่งจากงานวิจัยของเขายังสามารถนำไพรเมอร์นี้ไปใช้ตรวจสอบยูคาลิปตัสสปีชีส์อื่นได้ แต่ผลที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ต่อมา Freeman *et. al*. (2006) ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA และไพรเมอร์ที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ของยูคาลิปตัสชนิดอื่นมาศึกษาการทำ linkage map ใน *E. globulus* ทำให้ทราบว่ามีทั้งหมด 13 linkage และยังแสดงให้เห็นว่าในแต่ละเพศจะมีขนาดของแท่งโครโมโซมแตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Nevill *et. al*. (2008) ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA 9 คู่ และไพรเมอร์ที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ของยูคาลิปตัสชนิดอื่นมาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัสสปีชีส์อื่น 6 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ EMBRA 4 คู่ ที่สามารถแสดงความหลากหลายได้ดี ส่วนอีก 5 คู่นั้นสามารถแสดงความหลากหลายได้แต่ไม่ดีนัก ต่อมา ฐิติพร (2551) ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *E. camadulensis*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พบว่าสามารถแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมได้สูงและสามารถแบ่งประชากรตัวอย่างที่นำมาทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ไพรเมอร์ที่ใช้นี้ยังมีข้อจำกัดในการเพิ่มผลผลิตดีเอ็นเอของตัวอย่างอยู่ นอกจากการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบสายพันธุ์ยูคาลิปตัสแล้ว ยังมีการใช้เครื่องหมาย RAPD ตรวจสอบลูกผสมระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสและยูโรฟิลลาด้วย (สุธีร์, 2548)

8. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยใช้หลักฐานทางโมเลกุล จากสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการสืบทอดมาตามสายวิวัฒนาการ และทิ้งร่องรอยของการมีบรรพบุรุษร่วมให้ตรวจพบได้ หลักฐานทางโมเลกุลสามารถใช้ได้ดีกว่า เพราะไม่มีการลำเอียงและมีความแม่นยำมาก อีกทั้งตัวอย่างที่นำมาศึกษายังหาได้ง่าย ใช้ได้ทั้งข้อมูลของโปรตีนและดีเอ็นเอ ในส่วนของดีเอ็นเอนั้นสามารถใช้ได้ทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ

Phylogenetics เป็นการศึกษาประวัติหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยใช้แผนภาพคล้ายต้นไม้ กิ่งที่แยกแต่ละกิ่งแสดงการแยกตัวออกจากกัน เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า phylogeny หรือ evolutionary tree โดยมีสมมุติฐานหลักว่า สิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลทางโมเลกุลเหมือนกัน (homologous) มีบรรพบุรุษร่วมกัน แล้วค่อย ๆ มีการเปลี่ยนแปลงไปตามเวลา จึงมีการแยกออกจากกันครั้งละ 2 กิ่ง แต่ละจุดที่แยกออกจากกันเกิดได้อย่างอิสระ

วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองด้วยวิธี distance method จะอาศัยระยะห่างระหว่างตัวอย่างแต่ละคู่จากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด แผนภูมิต้นไม้จำลองที่สร้างขึ้นจะพิจารณาจากความสัมพันธ์ของค่า distance ที่ได้จากตัวอย่างแต่ละคู่เปรียบเทียบกับคู่อื่น ๆ วิธีการที่นิยมใช้ได้แก่ UPGMA (unweighted pair-groups method using arithmetic average) ซึ่งจะสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองโดยการหาคู่ตัวอย่างที่มี pairwise distance น้อยที่สุดจาก distance matrix จากนั้นจัดให้ตัวอย่างคู่นั้นรวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) ในส่วนอื่น ๆ ของ matrix ที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลุ่มดังกล่าวให้คงค่าเดิมไว้ จากนั้นดำเนินการรอบใหม่ โดยเริ่มจากการหาคู่ตัวอย่างที่มี pairwise distance น้อยที่สุดเช่นเดิมแล้วจัดกลุ่ม ดำเนินการเช่นนี้ไปจนทุกตัวอย่างถูกจัดเข้าอยู่ในกลุ่ม วิธีการนี้ใช้ได้ดีใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรณีที่อัตราการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบสคงที่เท่านั้น ถ้าอัตราการแทนที่เบสไม่คงที่แล้ว สัณฐานของแผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จะมีความคลาดเคลื่อนสูง (Nei and Kumar, 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างยูคาลิปตัส

ตัวอย่างยูคาลิปตัสที่นำมาศึกษาเป็นลูกผสมไม้ยูคาลิปตัส *E. camaldulensis* รุ่นที่ 2 จากแปลงทดสอบพันธุ์ สถานีฝึกนิสิต คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีทั้งหมด 120 สายพันธุ์ (family) แต่ละสายพันธุ์มี 24 ต้น เกิดจากการนำเมล็ดจากรุ่นที่ 1 มาปลูก (ได้จาก ดร.สาพิศ ดิลกสัมพันธ์ ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) โดยได้เลือกมาใช้ศึกษาเพียง 19 สายพันธุ์ 21 ตัวอย่าง และพันธุ์ที่มีการปลูกเป็นการค้า 4 พันธุ์ รวมทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 โดยตัวอย่างพืชที่เก็บมาจะแช่ไนโตรเจนเหลวและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ใช้ศึกษา แหล่งกำเนิด และบริเวณที่ปลูกของต้นพ่อแม่

ตัวอย่างที่	สายพันธุ์/ต้นที่	แหล่งกำเนิด	บริเวณ
1	129/18	Flat Rock Pool	Walsh-Mitchell River QLD*
2	88/23	Montalbion	Petford Region QLD*
3	D1	-	-
4	11/11	Eccles Creek/tributaries	Petford Region QLD*
5	22/13	Eccles Creek/tributaries	Petford Region QLD*
6	208/12	Katherine	Northern Territory
7	229/9	Morehead River	Other QLD*
8	226/23	Morehead River	Other QLD*
9	K51	-	-
10	188/17	Healeys Yard	Walsh-Mitchell River QLD*
11	44/23	Mishap Creek	Petford Region QLD*
12	K61	-	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	สายพันธุ์/ต้นที่	แหล่งกำเนิด	บริเวณ
13	119/10	Walsh River-W.Emu Creek Junction	Petford Region QLD*
14	109/14	Headwaters-Emureka Creek	Petford Region QLD*
15	196/18	Healeys Yard	Walsh-Mitchell River QLD*
16	227/7	Morehead River	Other QLD
17	178/23	Palmeryville	Walsh-Mitchell River QLD*
18	163/24	Walsh River Rockwood	Walsh-Mitchell River QLD*
19	112/21	Eureka Creek/tributaries	Petford Region QLD*
20	72/8	Petford Bridge	Walsh-Mitchell River QLD*
21	88/12	Montalbion	Petford Region QLD*
22	K69	-	-
23	228/17	Morehead River	Other QLD*
24	236/23	เมล็ดที่คัดเลือกในประเทศไทย	Thai selection
25	188/18	Healeys Yard	Walsh-Mitchell River QLD*

หมายเหตุ โดย D1 เป็น *E. camaldulensis* ของ Siam tree development, K51 เป็น *E. camaldulensis* ของ สวนกิตติ, K61 เป็นลูกผสมระหว่าง *E. brassiana* กับ *E. grandis* ของสวนกิตติ, K69 เป็นลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* กับ *E. pellita* ของสวนกิตติ ส่วน QLD* คือ Queensland

2. เครื่องคอมพิวเตอร์

เครื่องคอมพิวเตอร์และโปรแกรมในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ NTSYS-pc รุ่น 2.2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. ตรวจสอบข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของยูคาลิปตัสจากฐานข้อมูลและสังเคราะห์ไพรเมอร์

ตรวจสอบข้อมูลงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอกับยูคาลิปตัส โดยเฉพาะเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในฐานข้อมูล จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ และเลือกสังเคราะห์ไพรเมอร์ 39 คู่ (ตารางที่ 2) โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ได้มาจากฐานข้อมูล NCBI

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างยูคาลิปตัสจะใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Agrawal *et. al.* (1992) โดยจะนำตัวอย่างยูคาลิปตัสที่เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสมาสกัดดีเอ็นเอโดยมีขั้นตอนดังนี้ นำใบอ่อน 1 – 2 ใบ มาล้างให้สะอาด เช็ดให้แห้ง บดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ใส่ในหลอดเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 2x CTAB buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8) 600 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethnol 1.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 15 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 7 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย washing buffer (70% EtOH, 10 mM NaOAc pH 5.2) ปล่อยตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 15mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติม RNaseA (10 mg/ml) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เติม phenol : choloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 15 นาที ดูดสารละลายใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ กลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง ดูดสารละลายใสใส่หลอดใหม่ เติม 3 M NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า ของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

15 นาที ล้างตะกอนด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี สเปกโทรโฟโทเมทรี (spectrophotometry) และอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

3. ทดสอบเพื่อเลือกคู่ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3.1 นำไพรเมอร์ที่พัฒนาจาก *E. grandis* และ *E. urophylla* (Brondani *et al.*,1998) จำนวน 39 คู่ มาตรวจสอบโดยนำดีเอ็นเอ 3 ตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน polyacrylamide gel 6% แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate (ภาคผนวก) เพื่อเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอ 5 - 10 ตัวอย่าง ทำการปรับสภาวะการทำพีซีอาร์ เช่น ปรับอุณหภูมิช่วง annealing ให้มีค่าแตกต่างจากอุณหภูมิเดิมโดยเริ่มจากอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส โดยการเพิ่มครั้งละ 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละคู่

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์มีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

DNA Template (50 ng/µl)	2	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 mM)	2	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (50 mM)	0.8	ไมโครลิตร
forward primer (5 pmol/µl)	1	ไมโครลิตร
reverse primer (5 pmol/µl)	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5U/µl)	0.1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	11.1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.0	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โปรแกรมการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นที่ 1	pre-denaturation	94	องศาเซลเซียส	5 นาที
ขั้นที่ 2	denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 3	annealing	55-62	องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 4	extension	72	องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 5	ทำซ้ำ ขั้นที่ 2 – 4 จำนวน 29 รอบ			
ขั้นที่ 6	final extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที
ขั้นที่ 7	end	4	องศาเซลเซียส	

3.2 ทำพีซีอาร์แบบ hot start เป็นวิธีควบคุมให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มขึ้นหลังจากดีเอ็นเอเสียสภาพอย่างสมบูรณ์แล้วเท่านั้น โดยจะใช้เอนไซม์ surestart®*taq* DNA polymerase ของบริษัท STRATAGENE ที่มีการดัดแปลงโมเลกุลให้สามารถทำงานได้ต่อเมื่อผ่านสภาวะที่อุณหภูมิสูงแล้วเท่านั้น

3.3 ทำพีซีอาร์แบบ touch down เป็นวิธีการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้สูงในรอบแรกและค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงทีละน้อยในรอบต่อ ๆ มาจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการทำปฏิกิริยาจริง โดยรอบแรกจะใช้อุณหภูมิขั้น annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส แล้วลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.6 องศาเซลเซียส เป็นจำนวน 10 รอบ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อที่ 56 องศาเซลเซียส อีก 25 รอบ

โปรแกรมการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นที่ 1pre-denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
ขั้นที่ 2 denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 3 annealing	62 องศาเซลเซียส	1 นาที
(ลดลงรอบละ0.6 องศาเซลเซียส)		
ขั้นที่ 4 extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 5 ทำซ้ำ ขั้นที่ 2 – 4 จำนวน 10 รอบ		
ขั้นที่ 6 denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 7 annealing	56 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 8 extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 9 ทำซ้ำ ขั้นที่ 6 – 8 จำนวน 25 รอบ		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นที่ 10 final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที
ขั้นที่ 11 end	4 องศาเซลเซียส	

4. ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัส

เมื่อเลือกได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์แต่ละคู่แล้ว นำมาใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสทั้งหมด (ตารางที่ 1) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยวิธีนับแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏแต่ละไพรเมอร์ และนับแถบดีเอ็นเอที่สามารถแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัส โดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอให้เป็นแบบไบนารี (binary) พันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้ค่าเป็น “1” ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น ให้ค่าเป็น “0” แล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้จาก จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม หารด้วยจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏ จากนั้นหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี simple matching (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.2 และแสดงผลในรูปของ dendrogram

5. ทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ Duplex

duplex PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการตรวจสอบ แต่ขนาดของผลผลิตที่ได้แต่ละคู่นั้นจะต้องมีขนาดแตกต่างกัน โดยจะเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ที่มีความยาวแตกต่างกันมาจับคู่ แล้วทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกัน

โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

DNA Template (50 ng/µl)	2	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 mM)	2	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (50 mM)	0.8	ไมโครลิตร
forward primer คู่ที่ 1 (5 pmol/µl)	1	ไมโครลิตร
reverse primer คู่ที่ 1 (5 pmol/µl)	1	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

forward primer คู่ที่ 2 (5 pmol/μl)	1	ไมโครลิตร
reverse primer คู่ที่ 2 (5 pmol/μl)	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5U/μl)	0.1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	9.1	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.0	ไมโครลิตร

ใช้โปรแกรมการทำปฏิกิริยา แบบเดียวกับข้อ 3.1

6. โคลนแถบดีเอ็นเอแล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่

คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ช่วง 200 – 300 คู่เบส นำมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 1% agarose gel ย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้เอทิเดียมโบรไมด์ แล้วนำมาส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาจากเจล นำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®T Easy vector จากนั้นจะนำเข้าสู่เซลล์ *E.coli* ที่เตรียมไว้เป็น competent cell ด้วยวิธี heat shock แล้วนำไป spread ลงบนจานที่มีอาหาร LB ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน โดยบนอาหารนี้จะมี IPTG และ X-gal ผสมอยู่ แล้วนำไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 16 – 18 ชั่วโมง คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจโดยดูจากสีโคโลนีซึ่งจะเป็นสีขาว นำโคโลนีนี้มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN) แล้วนำส่งหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่โดยใช้โปรแกรม FastPCR V.6 และนำมาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัสอีกครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การตรวจสอบข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของยูคาลิปตัสจากฐานข้อมูล

จากการตรวจสอบข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของยูคาลิปตัสนั้นจะเน้นข้อมูลงานวิจัยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของ *Eucalyptus camaldulensis* เนื่องจาก *E. camaldulensis* มีอัตราการรอดตายสูงกว่าสปีชีส์อื่น ๆ ในประเทศไทย และยังสามารถปลูกได้ในพื้นที่ดินเค็มด้วย (สมคิด, 2543) แต่ไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของยูคาลิปตัสชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม พบว่า พันธุกรรมของ *E. camaldulensis* มีความคล้ายคลึงกับพันธุกรรมของ *E. grandis* มากกว่ายูคาลิปตัสชนิดอื่น (Ottewell *et al.* 2005) ดังนั้นจึงมุ่งไปที่ข้อมูลงานวิจัยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของ *E. grandis* ซึ่งพบว่า Brondani *et al.* (1998) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อใช้ในการทำแผนที่และแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์คือ E. *urophylla* และ *E. grandis* ซึ่งผลการวิจัยนั้นพบว่าสามารถทำแผนที่ และแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์นี้ได้เป็นอย่างดี ไพรเมอร์ที่ได้พัฒนาขึ้นมานั้นมีชื่อว่า EMBRA (Eucalyptus microsatellites from Brazil) ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 230 คู่ จากนั้นจึงดูว่าไพรเมอร์ EMBRA ทั้ง 230 คู่นี้ คู่ไหนบ้างที่มีการนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในยูคาลิปตัสชนิดอื่นแล้วประสบผลสำเร็จ

จากข้อมูลพบว่ามีไพรเมอร์ 39 คู่ (ตารางที่ 2) ที่มีผู้นำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในยูคาลิปตัสชนิดอื่นแล้วประสบผลสำเร็จ (นฤมล,2547; ฐิติพร, 2551; Zucchi *et al.* 2002; Santos *et al*, 2007) จึงได้สังเคราะห์ไพรเมอร์เหล่านี้ขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบยูคาลิปตัสในงานวิจัยครั้งนี้

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ	ไพรเมอร์	ลำดับเบสของ Forward primer (5'→3')	ลำดับเบสของ Reverse primer (5'→3')
1	EMBRA1	GATAGAACTTTCCTATTTGATCG	GTAGGATTTGATGTCTGCAA
2	EMBRA2	CGTGACACCAGGACATTAC	ACAAATGCAAATTCAAATGA
3	EMBRA3	GATCGGATTGGAGGAGAC	AATTCAATTCATCCAAAGC
4	EMBRA4	ATACAATGATTTGAAAGGGG	GAGTTGTTTGTTTTGTCGAA
5	EMBRA5	ATGCTGGTCCAACTAAGATT	TGAGCCTAAAAGCCCAAC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

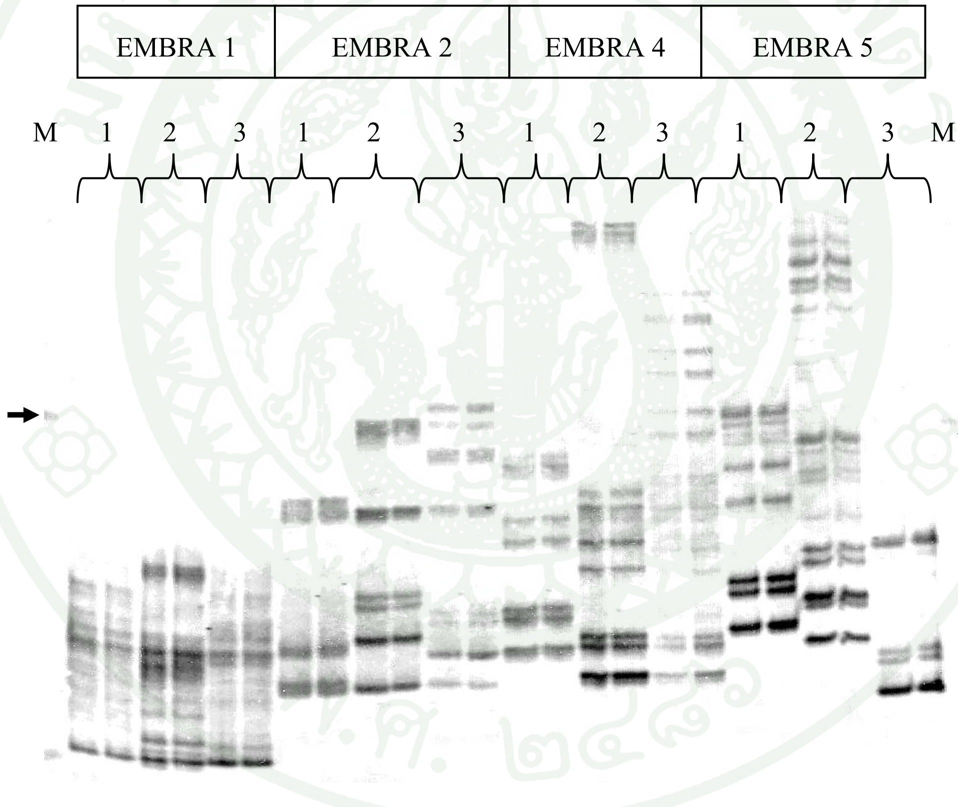
ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับ	ไพรเมอร์	ลำดับเบสของ Forward primer (5'▶3')	ลำดับเบสของ Reverse primer (5'▶3')
6	EMBRA6	AGAGAATTGCTCTTCATGGA	GAAAAGTCTGCAAAGTCTGC
7	EMBRA7	CACACCGTGTCAGTTAGC	AATAAGGAGGATTCCATGG
8	EMBRA8	CACAACTAAAAATCAAAACCC	AAAGAGCAGATTATTACAGAAGC
9	EMBRA9	AGTGAGAGAGATATTCGCGT	CCAATACAATCATCAATCCA
10	EMBRA10	GTAAAGACATAGTGAAGACATTCC	AGACAGTACGTTCTCTAGCTC
11	EMBRA11	GCTTAGAATTTGCCTAAACC	GTAAAATCCATGGGCAAG
12	EMBRA12	AGGATTTGTGGGGCAAGT	GTTCCCCATTTTCATGTCC
13	EMBRA13	ATTTCCCTAGGTTTGACATG	TCCAACATCTTACTCAACCA
14	EMBRA14	GCCTCAAACCAATTCAAAT	CATGATTCATCCCACTCCTC
15	EMBRA15	TTTGTTGGATGAGGACTT	CAACATGTTCTCCGAAAAG
16	EMBRA16	CAACGTTCCCCTTTCTTC	ATGTTAGGCCAAACCCAG
17	EMBRA18	CAGCTAGGATGTTAGACTTGG	GCACACCTAGAATTTTCAAACTA
18	EMBRA19	GACGGTTGATTTCCTGATT	GTGGTGCTCCTCTCCTCT
19	EMBRA21	ACAAGGGAAACTTGATCG	GGAACCGAACATAGCAAG
20	EMBRA22	GCACATGCACACACGGTTG	AAGGCCAGTGGTCGTGAGTC
21	EMBRA25	TCATCAGGTTCGCTCGTT	AGTTGAGTGAACACGCGG
22	EMBRA26	CCCACAACAAAAGGAAAG	AGAGGTGTTCGATTCAATTC
23	EMBRA33	CAATTTGCATGTCCAGTTTG	GCAGAAGTTGATTGAAAGCA
24	EMBRA63	CATCTGGAGATCGAGGAA	GAGAGAAGGATCATGCCA
25	EMBRA69	ACCTTGTGATGGATGAAGC	CCCGACAAGGATGAGAAA
26	EMBRA85	TGATCCATAATTAGGGTTACACA	CCGATGTCCAATGACTCC
27	EMBRA99	CTAATCATGAGGGGGAAG	CTTTCTCTCAGACGGTCAC
28	EMBRA108	CGCTAGTTGCTTCCATCTC	TTTCGTTGGAAGAGAGGC
29	EMBRA123	ATTCATGACCACTGGTTC	CCCCAAAGATAGGAGATAG
30	EMBRA127	CAAGCTGTAGGGTTCCTTT	GTATAAGACCCAAAGACCCA
31	EMBRA134	CACGTTTAAATGCGCAAGTG	CTCTGAGGAGTTGGCAGTAGC
32	EMBRA148	GATTACAAGCCACACCGT	AGCCAAGTTGTATCAGAACC
33	EMBRA166	AACGTGAACGTAGGTAG	ACAGATCAAAGTCTCTCTC
34	EMBRA179	GTCGGCTCACAGCATGAA	GCCTCCAGTAGTTAACAGACG
35	EMBRA180	ATCAACGACACATATGCAGC	GGATGCTTGGGTGATTGT
36	EMBRA192	GGATGCAGTTCTAGAGAG	GAGCGAGATCTAATCTTC
37	EMBRA210	CGTGTGGTTATGTGAACT	CCTAACAATGCATAAGCTC
38	EMBRA 265	TAT CAC TGG CAG GAC GCA	ACC GAC GCC GAT AAG AGA
39	EMBRA 267	GAC CTC CGC TTC AAC GAT	GTG CGA GAC CCT CAA TTC TA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

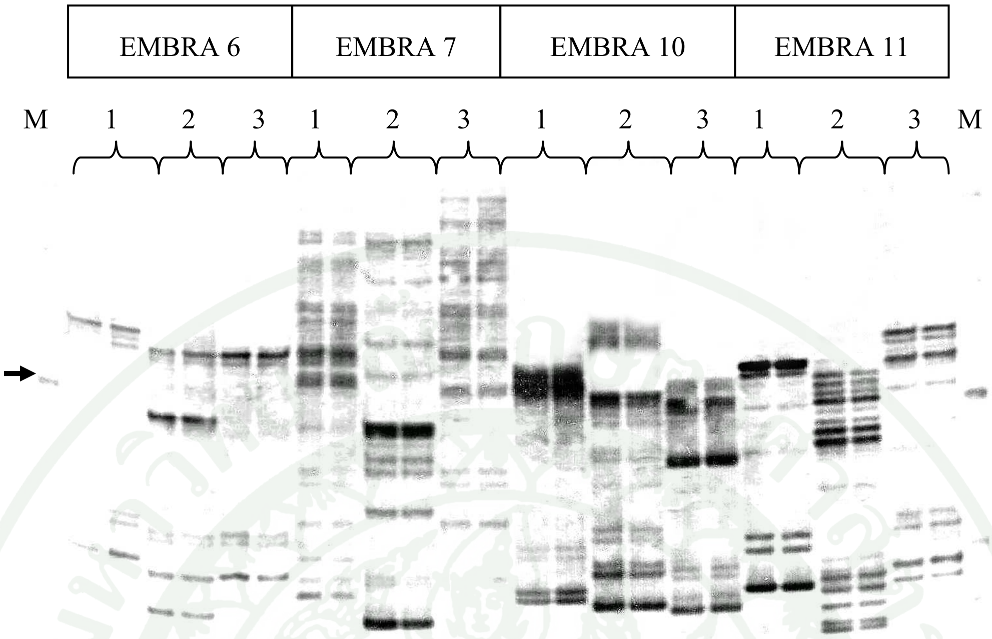
2. การตรวจสอบยูคาลิปตัสเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในครั้งนี้พัฒนามาเพื่อแยกความแตกต่างของยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์คือ *E. urophylla* และ *E. grandis* เมื่อนำมาใช้ศึกษากับโคลนพันธุ์ของ *E. camaldulensis* ไพรเมอร์เหล่านี้อาจไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ จึงได้นำมาทดสอบกับยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่าง คือพันธุ์ T5, K51 และลูกผสมระหว่าง *E. tereticornis* กับ *E. camaldulensis* พบว่าจาก 39 คู่ มีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 28 คู่ แต่สามารถแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่างได้จำนวน 20 คู่ ดังตัวอย่างในภาพที่ 1 และ 2



ภาพที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 1, 2, 4 และ 5 ในยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่าง โดย M คือ marker, 1 คือ พันธุ์ T5, 2 คือพันธุ์ K51, 3 คือลูกผสม *E. tereticornis* กับ *E. camaldulensis* ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



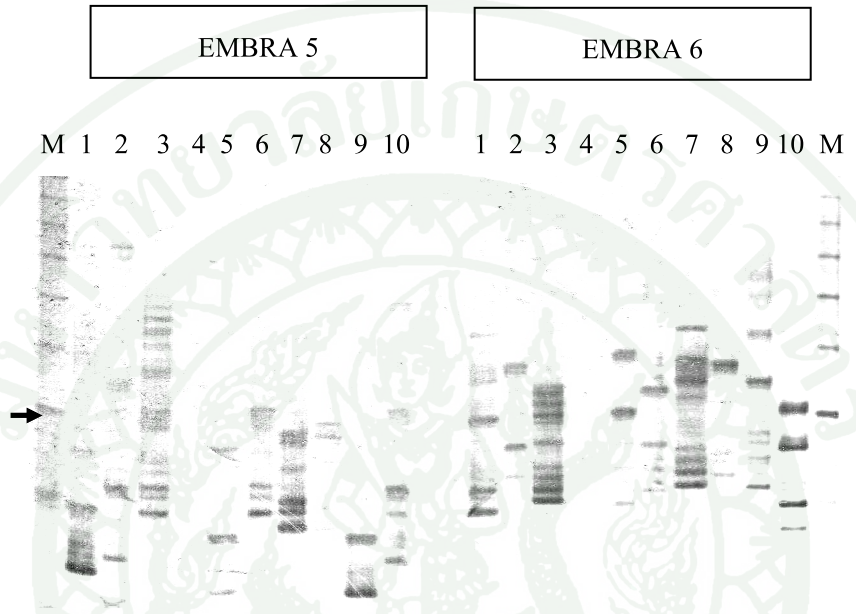
ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 6, 7, 10 และ 11 ในยูคาลิปตัส 3 ตัวอย่าง โดย M คือ marker, 1 คือ พันธุ์ T5, 2 คือ พันธุ์ K51, 3 คือ ลูกผสม *E. tereticornis* กับ *E. camaldulensis* ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

3. การทดสอบเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณและแยกขนาดดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ แม้ว่าไพรเมอร์ที่เลือกไว้จะแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ แต่ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีลักษณะแบบสุ่ม แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใหม่โดยการปรับอุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ช่วง annealing ให้มีค่าแตกต่างจากอุณหภูมิเดิมโดยเริ่มจากอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 1 องศาเซลเซียส จากการปรับอุณหภูมิพบว่าบางไพรเมอร์ เช่น EMBRA 5 ให้แถบดีเอ็นเอในแต่ละอุณหภูมิไม่แตกต่างกันมาก จึงทดลองนำมาใช้ทดสอบกับยูคาลิปตัส 10 ตัวอย่างพบว่าให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ส่วนไพรเมอร์อื่นเมื่อลองนำมาทดสอบกับยูคาลิปตัส 10 ตัวอย่าง พบว่ามีแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก เกิดจากแถบดีเอ็นเอบางส่วนคืนสภาพกลับเป็นเกลียวคู่ (ภาพที่ 3) จึงลองปรับเปลี่ยนวิธีในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยไม่ต้องทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ และแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน non-denaturing polyacrylamide gel ซึ่งพบว่าทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้น้อยลงและเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 4) ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้จนครบทุกตัวอย่าง และเมื่อนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้มาทดสอบกับตัวอย่างทั้งหมด พบว่าส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอ

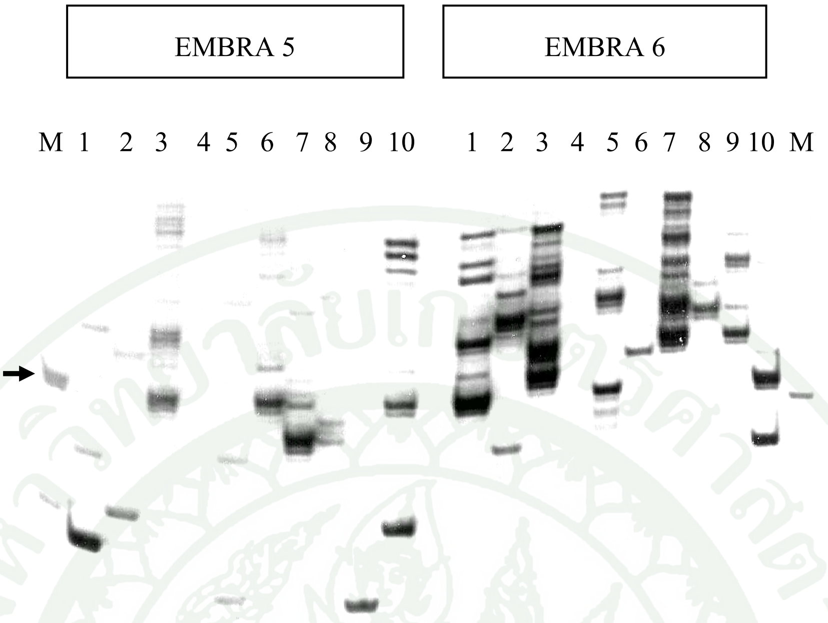
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวนมาก ดังนั้นจึงปรับวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งแบบ hot start และ touch down ซึ่งพบว่าให้แถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันมาก จึงลองนำมาปรับอุณหภูมิช่วง annealing ให้สูงขึ้นซึ่งพบว่าแถบดีเอ็นเอบางตัวอย่างได้หายไป ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ไม่เหมาะสม



ภาพที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 5 และ EMBRA 6 ในยูคาลิปตัส 10 ตัวอย่างเมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel โดย M คือ marker, 1 คือ พันธุ์ D1, 2 - 10 คือ ลูกผสม 196/18, 88/23, 236/23, 208/12, 72/8, 109/14, 178/23, 112/21 และ 227/7 ตามลำดับ ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 5 และ EMBRA 6 ในยูคาลิปตัส 10 ตัวอย่าง เมื่อแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโฟรีซิสใน non-denaturing polyacrylamide gel โดย M คือ marker, 1 คือ พันธุ์ D1, 2 - 10 คือ ลูกผสม 196/18, 88/23, 236/23, 208/12, 72/8, 109/14, 178/23, 112/21 และ 227/7 ตามลำดับ ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

4. การตรวจสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมด

จากการทดลองปรับสภาวะที่เหมาะสม พบว่า อุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 25 ตัวอย่างของไพรเมอร์ส่วนใหญ่ คือ ใช้อุณหภูมิช่วง annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส และจากการนำไพรเมอร์ทั้ง 20 คู่ ที่ได้คัดเลือกไว้มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ามีเพียง 18 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครบทั้ง 25 ตัวอย่างอันได้แก่ EMBRA 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 16, 18, 22, 26, 33, 63, 69, 108, 127, 148 179 ส่วนอีก 2 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงบางตัวอย่างจึงได้ตัดทิ้ง ดั้งนั้นจึงใช้ไพรเมอร์เพียง 18 คู่ในการศึกษาครั้งนี้ ดังตัวอย่างในภาพที่ 5 - 9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 5 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 2 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนแถวที่ 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างตามตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

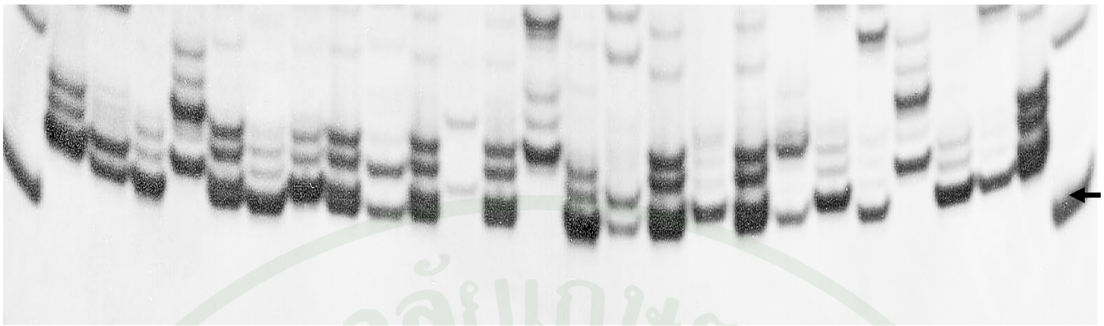
ภาพที่ 6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 5 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนแถวที่ 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างตามตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 18 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนแถวที่ 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างตามตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ภาพที่ 8 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 69 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนเลข 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างในตารางที่ 1 กรอบด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 179 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนแถวที่ 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

จากผลการตรวจสอบดีเอ็นเอทั้ง 25 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ 18 คู่ พบว่าผลที่ได้ค่อนข้างจำเพาะต่ออุณหภูมิที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อมีการลดหรือเพิ่มอุณหภูมิมักทำให้บางตัวอย่างไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากไพรเมอร์ไม่ได้พัฒนามาจาก *E. camaldulensis* โดยตรงอีกทั้งแถบดีเอ็นเอที่ได้ค่อนข้างมีจำนวนมากคล้ายกับงานวิจัยของ ฐิติพร (2551) ที่ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน *E. camaldulensis* ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้นั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ส่วนใหญ่ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ ใช้ช่วง annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส และคล้ายงานวิจัยของ นฤมล (2547) ที่ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA ในการตรวจสอบยูคาลิปตัสลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* กับ *E. tereticornis* ซึ่งพบว่ามีแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก นอกจากนี้ยังคล้ายกับงานวิจัยของ Rocha *et. al.* (2002) ที่ได้ใช้ไพรเมอร์ EMBRA ในการศึกษาความหลากหลายของยูคาลิปตัสทั้ง 15 ชนิด พบว่าใช้จำแนกแต่ละชนิดได้ แต่บางไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นได้ครบทุกตัวอย่าง อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ที่นำมาใช้เหล่านี้สามารถแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมได้สูง ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากมีลักษณะเป็นแบบ multi-locus ได้แก่ EMBRA 5, 6, 7, 8, 10, 11, 16, 18, 33, 63, 69, 108, 127 และ 148 ดังตัวอย่างภาพที่ 6, 7 และ 8 และ ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำเพาะเป็นแบบ single-locus ได้แก่ EMBRA 2, 22, 26 และ 179 ดังตัวอย่างภาพที่ 5 และ 9 เป็นต้น ซึ่งทั้ง 2 แบบสามารถนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ยูคาลิปตัสได้ ดังตารางที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์

primer	**จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด**	**จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดง Polymorphisms**	**% Polymorphisms**
EMBRA 2*	7	7	100.00
EMBRA 5	30	13	43.33
EMBRA 6	16	7	43.75
EMBRA 7	32	8	25.00
EMBRA 8	22	8	36.36
EMBRA 10	22	9	40.91
EMBRA 11	27	10	37.04
EMBRA 16	23	9	39.13
EMBRA 18	22	7	31.82
EMBRA 22*	6	6	100.00
EMBRA 26*	7	7	100.00
EMBRA 33	18	8	44.44
EMBRA 63	24	7	29.17
EMBRA 69	21	13	61.90
EMBRA 108	36	12	33.33
EMBRA 127	28	8	28.57
EMBRA 148	25	8	32.00
EMBRA 179*	6	6	100.00

หมายเหตุ *เครื่องหมายที่แสดงผลแบบ single-locus จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด คือจำนวนแอลลีล

สำหรับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นั้น ขนาดของแอลลีลที่แตกต่างกันอาจมีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณซ้ำ และ/หรือบริเวณที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีกลไกที่ทำให้เกิดการกลายของลำดับเบสซ้ำ 2 กลไก คือ 1.) เกิด DNA slippage ระหว่างที่มีการจำลองดีเอ็นเอ (Tachida and Iizuka, 1992) 2.) เกิด recombination ระหว่างสายดีเอ็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอ โดยเกิด unequal crossing over หรือโดย gene conversion ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวของลำดับเบสซ้ำ (Richard and Pâques, 2000) ประสิทธิภาพของกลไกที่ทำให้เกิดการกลายนี้ยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการกลายของลำดับเบสซ้ำ ได้แก่ ชนิดของลำดับเบสซ้ำ ขนาดของแอลลีล ตำแหน่งบนโครโมโซม ปริมาณของเบส G และ C ในบริเวณที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลท์ แบบของการแบ่งเซลล์ (ไมโทซิส หรือ ไมโอซิส) เพศ และจีโนไทป์ (Li *et al.*, 2002) ซึ่งจะส่งผลให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำมีขนาดแตกต่างกัน ทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ส่วนไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอหลายตำแหน่งจำนวนมาก อาจเกิดจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอในจีโนมมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ หรือสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ยังไม่เหมาะสม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Rocha *et. al.* (2002) ที่พบว่าไพรเมอร์ EMBRA ที่นำมาใช้ศึกษา ความหลากหลายของยูคาลิปตัสนี้ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและไม่มีความจำเพาะ จึงแก้ปัญหาโดยการปรับอุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้เหมาะสม อีกทั้งยังใช้เอนไซม์ DNA polymerase และเจล polyacrylamide ที่มีประสิทธิภาพสูง

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง

จากข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งหมด พบว่า ไพรเมอร์ที่ใช้ทั้ง 18 คู่ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลายทั้งหมด 152 แถบ และเมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.2 โดยคำนวณค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ด้วยวิธี simple matching (ภาพที่ 10) จากนั้นนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree (ภาพที่ 11) โดยที่ค่าดัชนีความคล้ายคลึง 63% สามารถแบ่งตัวอย่างยูคาลิปตัสที่นำมาศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยยูคาลิปตัสลูกผสม 129/18, 88/23, 208/12, 11/11 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.605 – 0.684 ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงมากที่สุดในกลุ่มนี้ คือ 88/23 กับ 208/12 (0.684) ส่วนตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ 11/11 กับ 129/18 (0.605)

กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 2-1 ประกอบไปด้วยยูคาลิปตัสพันธุ์ D1, K69, K51 และลูกผสม 178/23, 44/23, 109/14, 226/23, 236/23, 196/18, 112/21 ภายในกลุ่มมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.592 – 0.730 ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงมากที่สุดในกลุ่มนี้ คือ 226/23 กับ K51 (0.730) ส่วนตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ K69 กับ 226/23 (0.592) กลุ่ม 2-2 ประกอบไปด้วยยูคาลิปตัสพันธุ์ K61 และลูกผสม 22/13, 88/12, 208/12, 188/17, 188/18, 163/24, 72/8, 228/17 ภายในกลุ่มมีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.579 – 0.730 ซึ่งตัวอย่างที่มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงมากที่สุดในกลุ่มนี้ คือ 22/13 กับ 88/12 (0.730) ส่วนตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ K61 กับ 208/12 (0.579)

กลุ่มที่ 3 และ กลุ่มที่ 4 ประกอบไปด้วยยูคาลิปตัสลูกผสมเพียงตัวอย่างเดียว คือ 119/11 และ 227/7 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 3 และ 4 มีความสัมพันธ์กับยูคาลิปตัสตัวอย่างอื่นน้อยมากจึงถูกแยกออกมาเป็นกลุ่มใหม่

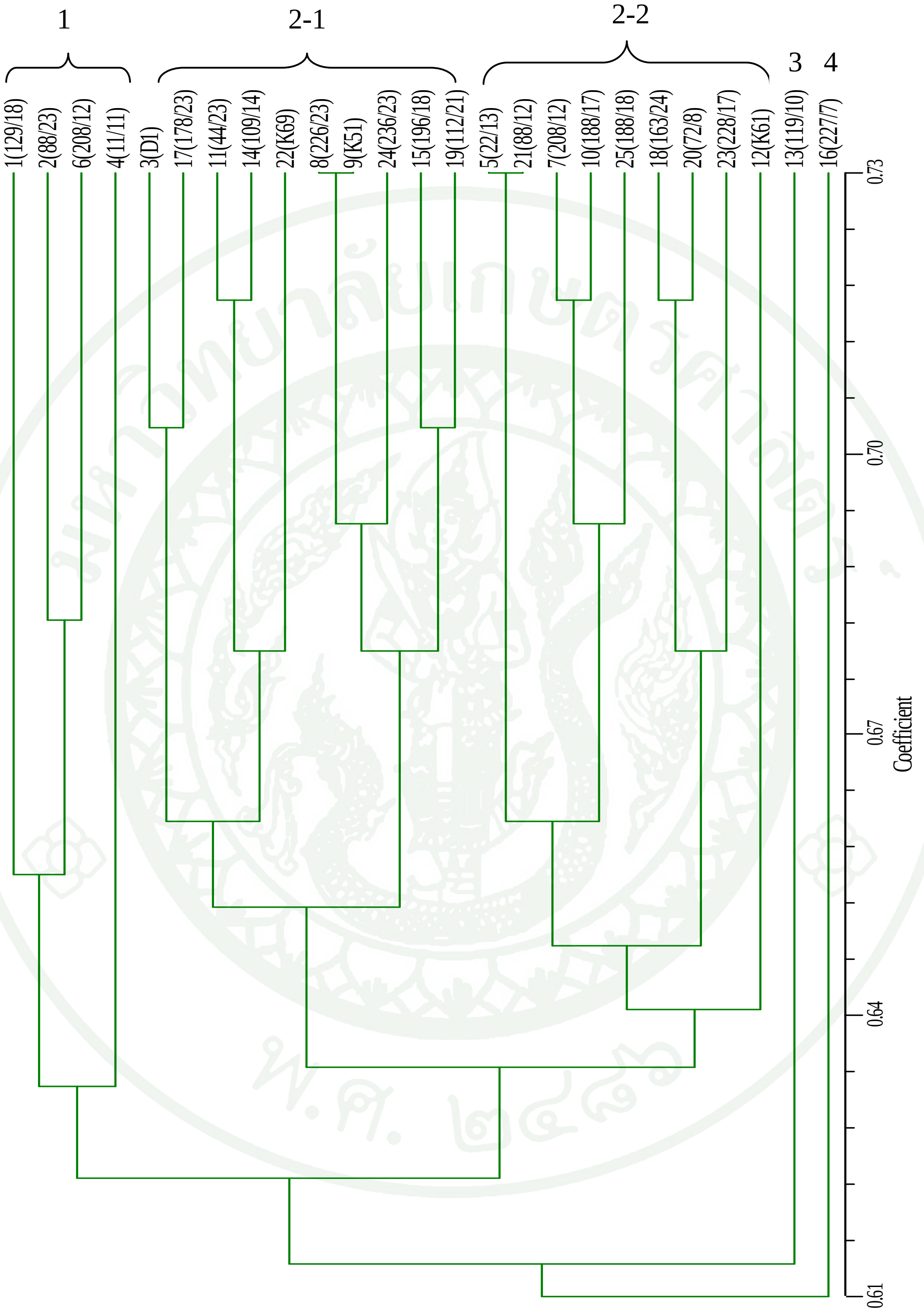
จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสด้วย phylogenetic tree พบว่าพันธุ์ D1 และ K51 ที่เป็น *E. camaldulensis* กับ K69 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *E. camaldulensis* กับ *E. pellita* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 2-1 แสดงให้เห็นว่ามีความใกล้ชิดกัน แต่ในตัวอย่างพันธุ์ K61 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง *E. brassiana* กับ *E. grandis* ถูกจัดไปอยู่ในกลุ่ม 2-2 ซึ่งมีความสัมพันธ์น้อยกว่าตัวอย่าง D1, K51 และ K69 ในบรรดาลูกผสมจากสายพันธุ์ต่าง ๆ สายพันธุ์ 226/23 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์ K51 มากที่สุด น่าจะเกิดจากการคัดเลือกสายพันธุ์ ซึ่งเลือกจากลักษณะที่ดีหลาย ๆ ประการ จึงมีแนวโน้มเหมือนกับพันธุ์ทางการค้าที่ผ่านการปรับปรุงและคัดเลือกมาก่อน และในสายพันธุ์ลูกผสมด้วยกันเอง พบว่าลูกผสมสายพันธุ์ที่ 188 ต้นที่ 17 มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่ 208 ต้นที่ 12 มากกว่าลูกผสมสายพันธุ์ที่ 188 ต้นที่ 18 ซึ่งเป็นลูกผสมที่มาจากสายพันธุ์เดียวกัน และในลูกผสมสายพันธุ์ที่ 88 ต้นที่ 12 ก็มีความใกล้ชิดกับลูกผสมสายพันธุ์ที่ 22 ต้นที่ 13 มากกว่าลูกผสมสายพันธุ์ที่ 88 ต้นที่ 23 ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ทั้งหมดได้มาจากการเพาะพันธุ์ด้วยเมล็ด จึงทำให้พันธุกรรมมีความหลากหลายอยู่มาก แต่ละสายพันธุ์ที่ศึกษายังมีพันธุกรรมไม่คงตัว จึงมีการกระจายของลักษณะในรุ่นลูก เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย phylogenetic tree จึงมีความใกล้ชิดกันน้อย และการจัดกลุ่มที่ได้ยังไม่ขึ้นกับแหล่งกำเนิดของต้นพ่อแม่พันธุ์ด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	1																								
2	0.658	1																							
3	0.651	0.638	1																						
4	0.605	0.645	0.572	1																					
5	0.625	0.599	0.592	0.665	1																				
6	0.658	0.684	0.665	0.658	0.625	1																			
7	0.612	0.572	0.632	0.625	0.724	0.612	1																		
8	0.651	0.625	0.645	0.665	0.671	0.612	0.671	1																	
9	0.605	0.658	0.651	0.658	0.678	0.671	0.704	0.73	1																
10	0.605	0.645	0.651	0.54	0.717	0.605	0.717	0.651	0.645	1															
11	0.612	0.638	0.645	0.625	0.632	0.586	0.579	0.605	0.691	0.665	1														
12	0.599	0.651	0.592	0.546	0.592	0.586	0.579	0.632	0.638	0.717	0.671	1													
13	0.618	0.618	0.599	0.566	0.638	0.658	0.638	0.599	0.632	0.645	0.638	0.612	1												
14	0.618	0.632	0.625	0.632	0.678	0.645	0.638	0.665	0.711	0.645	0.717	0.599	0.566	1											
15	0.618	0.671	0.651	0.671	0.612	0.645	0.651	0.678	0.724	0.632	0.638	0.612	0.605	0.671	1										
16	0.651	0.586	0.605	0.612	0.632	0.586	0.605	0.618	0.612	0.599	0.632	0.632	0.599	0.599	0.625	1									
17	0.671	0.671	0.704	0.632	0.665	0.592	0.704	0.678	0.684	0.645	0.691	0.625	0.618	0.684	0.684	0.651	1								
18	0.632	0.632	0.599	0.605	0.704	0.632	0.665	0.704	0.645	0.697	0.691	0.691	0.632	0.697	0.618	0.691	0.632	1							
19	0.625	0.599	0.645	0.586	0.671	0.678	0.632	0.671	0.691	0.665	0.684	0.632	0.678	0.638	0.704	0.645	0.638	0.625	1						
20	0.625	0.625	0.579	0.612	0.618	0.586	0.645	0.671	0.691	0.651	0.684	0.632	0.599	0.599	0.678	0.645	0.638	0.717	0.645	1					
21	0.618	0.671	0.612	0.618	0.73	0.658	0.599	0.625	0.632	0.618	0.612	0.651	0.618	0.658	0.592	0.546	0.592	0.684	0.651	0.572	1				
22	0.625	0.678	0.684	0.612	0.618	0.665	0.605	0.592	0.665	0.678	0.697	0.632	0.612	0.665	0.665	0.54	0.651	0.612	0.658	0.658	0.651	1			
23	0.559	0.625	0.592	0.665	0.645	0.665	0.618	0.618	0.665	0.638	0.658	0.618	0.612	0.625	0.678	0.605	0.586	0.665	0.658	0.697	0.665	0.671	1		
24	0.605	0.645	0.665	0.632	0.625	0.592	0.638	0.691	0.697	0.632	0.638	0.599	0.579	0.632	0.684	0.599	0.632	0.618	0.638	0.638	0.618	0.638	0.651	1	
25	0.651	0.651	0.592	0.586	0.671	0.625	0.671	0.645	0.638	0.717	0.645	0.671	0.625	0.638	0.599	0.632	0.559	0.691	0.658	0.618	0.651	0.592	0.645	0.651	1

ภาพที่ 10 ดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) ของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัสที่ได้จากข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 Phylogenetic tree ของยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง ที่ได้จากการใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ผลการทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex PCR

duplex PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน เพื่อลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาในการตรวจสอบ แต่ขนาดของผลผลิตที่ได้แต่ละคู่นั้นจะต้องมีขนาดแตกต่างกัน จากผลการเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความยาวแตกต่างกันมาจับคู่กันได้ทั้งหมด 4 คู่ คือไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ 22, 2 กับ 63, 22 กับ 69 และ 63 กับ 69 เมื่อนำแต่ละคู่มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกัน แล้วนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสใน 6% polyacrylamide gel

ผลการจับคู่ไพรเมอร์ ทุกคู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex ได้อีกทั้งยังแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน ดังนี้

คู่ไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ 22 ไพรเมอร์ EMBRA 2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 112 – 170 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ EMBRA 22 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 185 – 300 คู่เบส (ภาพที่ 12)

คู่ไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ 63 ไพรเมอร์ EMBRA 2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 112 – 170 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ EMBRA 63 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 170 – 400 คู่เบส (ภาพที่ 13)

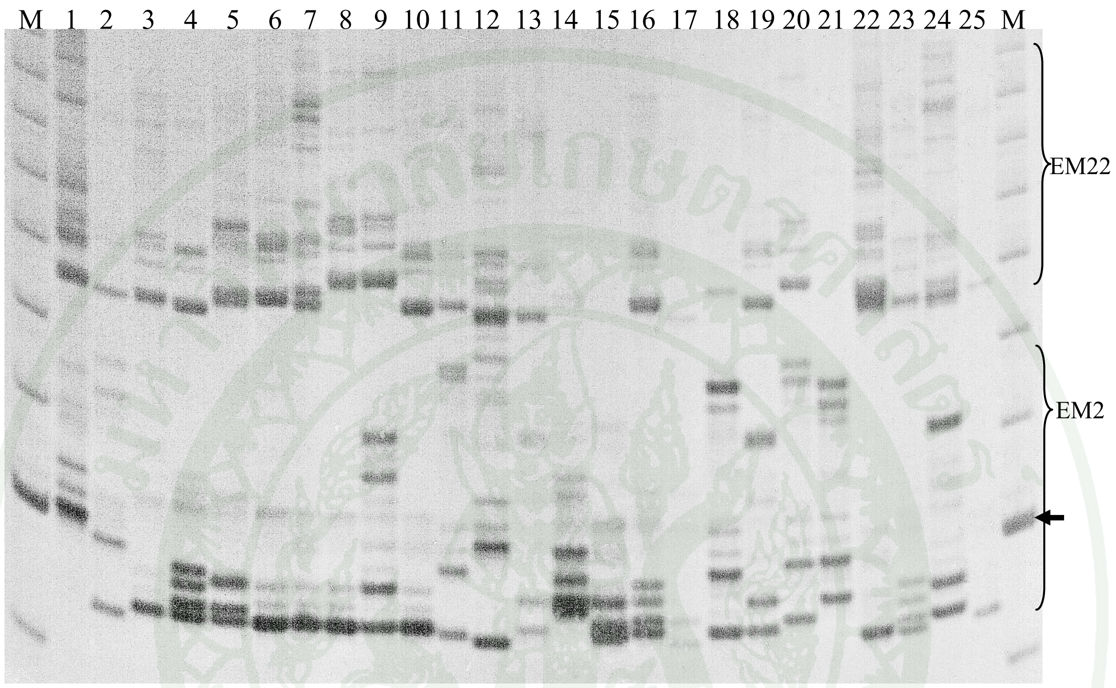
คู่ไพรเมอร์ EMBRA 22 กับ 69 ไพรเมอร์ EMBRA 22 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 186 – 300 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ EMBRA 69 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 50 – 170 คู่เบส (ภาพที่ 14)

คู่ไพรเมอร์ EMBRA 63 กับ 69 ไพรเมอร์ EMBRA 63 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 170 – 400 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ EMBRA 69 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 50 – 170 คู่เบส (ภาพที่ 15)

จากการนำไพรเมอร์ 4 ชุด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex PCR พบว่าสามารถแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน และแยกแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นออกจากกันได้ดี นอกจากนี้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำ duplex PCR ให้ผลเหมือนการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์เพียงคู่ใดคู่หนึ่ง แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex PCR ไม่ได้ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละคู่ไพรเมอร์ จึงสามารถนำไปใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chaix *et. al.* (2002) ที่ได้

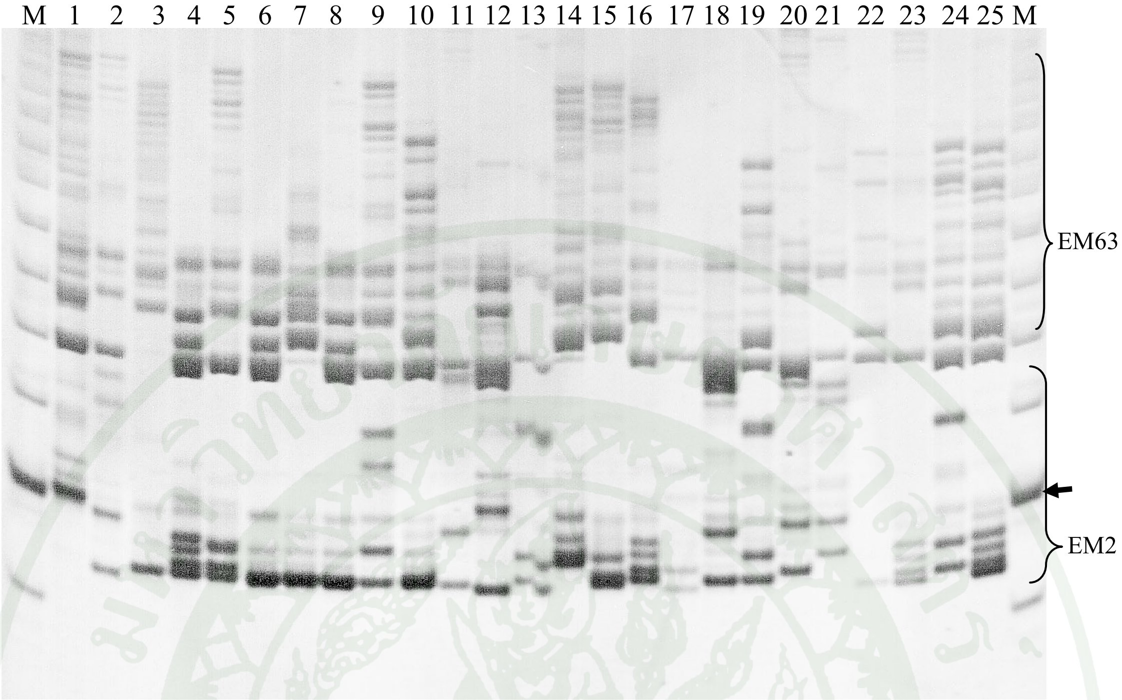
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำพีซีอาร์แบบ multiplex PCR ในการตรวจสอบยูคาลิปตัส 2 สปีชีส์คือ *E. urophylla* และ *E. grandis* ซึ่งทำได้รวดเร็วขึ้น และใช้แยกทั้ง 2 สปีชีส์ ออกจากกันได้



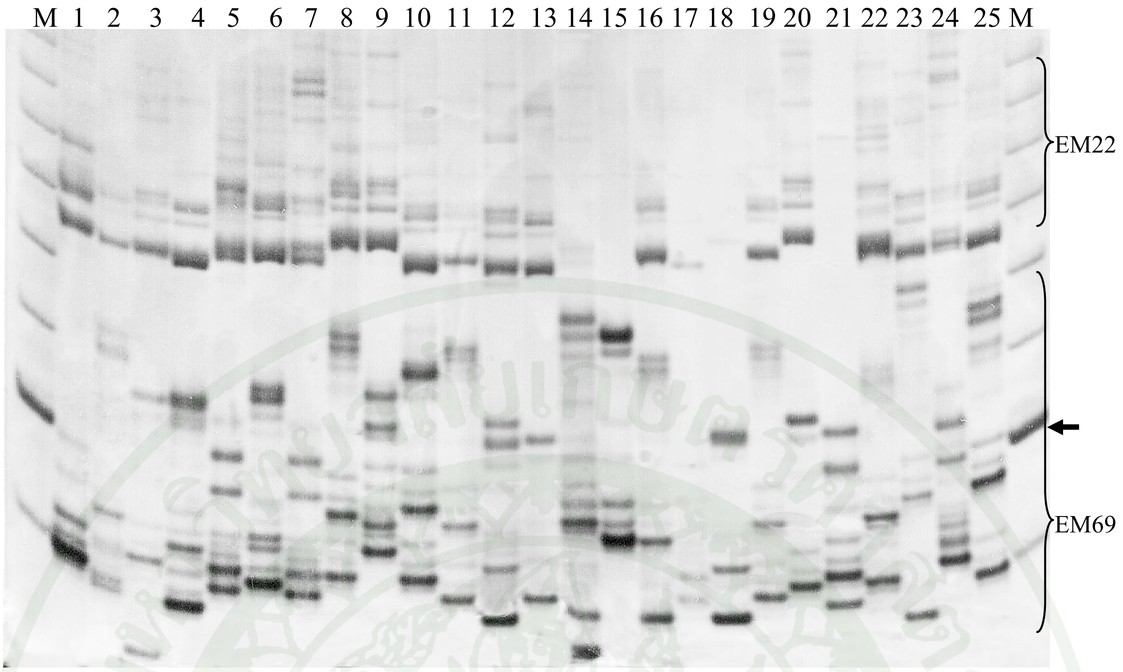
ภาพที่ 12 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ 22 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนเลข 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างใน ตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



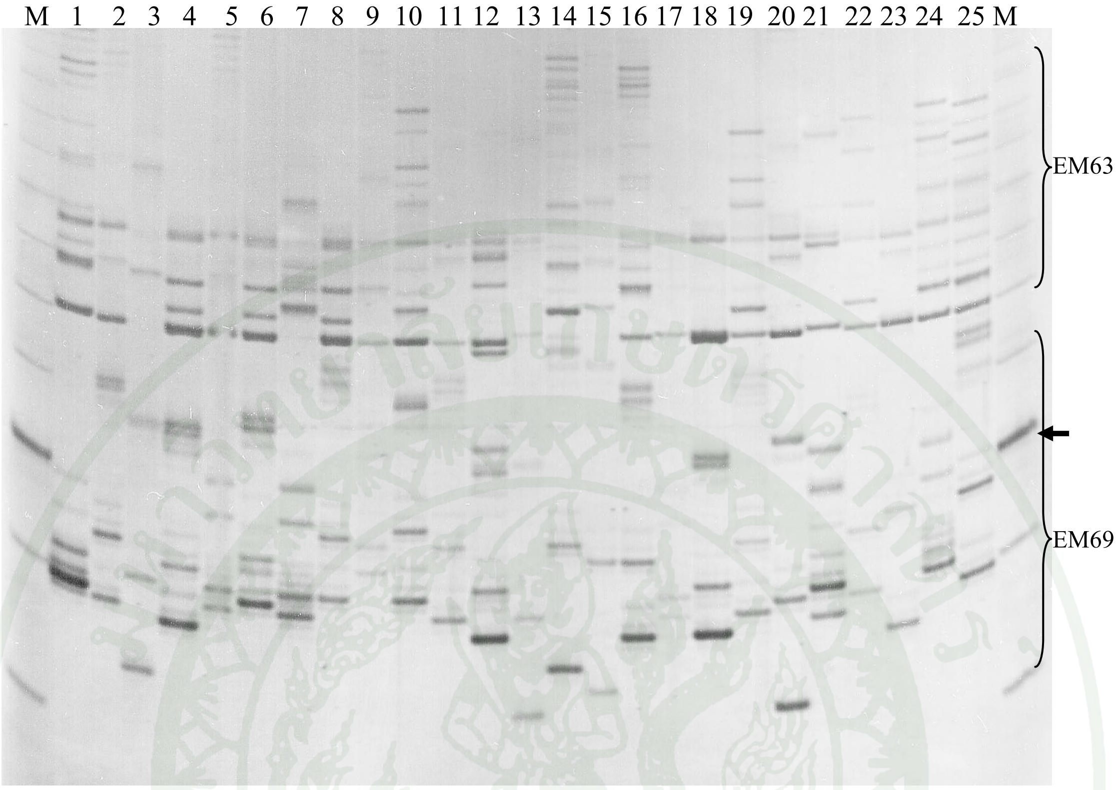
ภาพที่ 13 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 2 กับ 63 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนเลข 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างใน ตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 22 กับ 69 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่าง โดย M คือ marker ส่วนเลข 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างใน ตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ duplex PCR ของไพรเมอร์ EMBRA 63 กับ 69 ในยูคาลิปตัส 25 ตัวอย่างโดย M คือ marker ส่วนเลข 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างใน ตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

7. การโคลนแถบดีเอ็นเอแล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ซึ่งได้แก่ไพรเมอร์ EMBRA 8, 11, 12, 127 และ 148 นำแต่ละไพรเมอร์มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ตัวอย่างยูคาลิปตัสลูกผสม 229/9 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส ตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจมาทำให้บริสุทธิ์ นำมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดแล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจโดยดูจากโคโลนีที่ขึ้นเป็นสีขาว ซึ่งพบว่ามีจำนวนมากในแต่ละตัวอย่าง จึงสุ่มโคโลนีแต่ละตัวอย่างมาเพียง 5 โคโลนี สกัดเอาพลาสมิดออกมาแล้วส่งไปหาลำดับเบส จากการหาลำดับเบส พบว่า ผลผลิตที่ได้ทุกไพรเมอร์มีลำดับเบสซ้ำแบบไดนิวคลีโอไทด์ (GA)n เรียงต่อกัน และเมื่อนำลำดับเบสที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตัวอย่างมาออกแบบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพรเมอร์ที่จำเพาะใหม่โดยใช้โปรแกรม FastPCR V.6 สามารถออกแบบไพรเมอร์ใหม่ได้จำนวน 6 คู่ ให้ชื่อว่า NEM 1 – 6 ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ที่ได้จากโปรแกรม FastPCR V.6

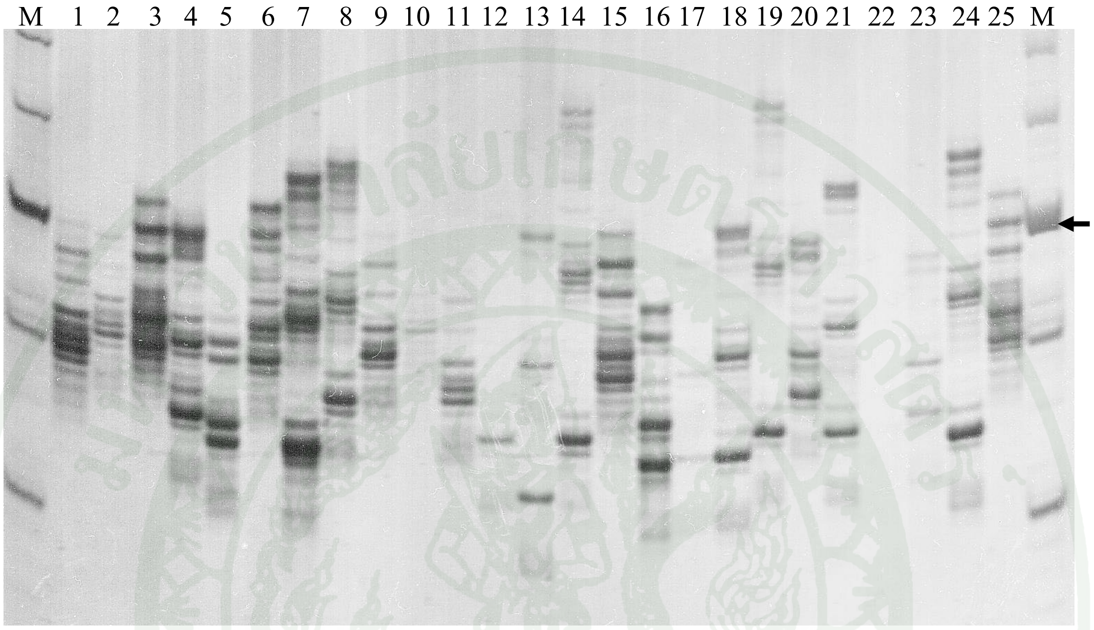
ลำดับ	ไพรเมอร์	มาจากเครื่องหมาย	ลำดับเบสของ Forward primer (5'→ 3')	ลำดับเบสของ Reverse primer (5'→ 3')
1	NEM 1	EMBRA 8	CACTGGTGCACAACCTGGAT	GTTCAAGGGGGCTTGTGTAAA
2	NEM 2	EMBRA 11	TTCCCCATTTTCATGTCCTT	TCTTTCTCTCAAGCCCAAGC
3	NEM 3	EMBRA 12	GAATTTGCCTAAACCCAACG	GCAGGTATGATACACGGATGG
4	NEM 4	EMBRA 127	TAAGACCCAAAGACCCAAGTTT	CAAGATGTAGGGTTCCTGTGG
5	NEM 5	EMBRA 127	AGACCCAAAGACCCAAGTTTC	CGCTCACCACAAACAAGAAC
6	NEM 6	EMBRA 148	CCAACAAAAGTATCTGGGTGAA	TCTGTTGCCTTCTCCTTCTTG

เมื่อนำไพรเมอร์ใหม่นี้มาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 4 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แต่ไม่ครบทุกตัวอย่าง ได้แก่ NEM 1, 2, 4 และ 6 โดยไพรเมอร์ NEM 1, 4 และ 6 ให้แถบดีเอ็นเอที่ได้ใกล้เคียงกับไพรเมอร์ EMBRA 8, 127 และ 148 ตามลำดับ ซึ่งเป็นแบบ multi-locus (ภาพที่ 16) ส่วนไพรเมอร์ NEM 2 นั้นให้แถบดีเอ็นเอต่างไปจากไพรเมอร์ EMBRA 11 และให้แถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ single-locus (ภาพที่ 17)

จากผลทำให้ทราบว่า ถึงแม้จะทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่แต่ยังคงให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอคล้ายกับไพรเมอร์ EMBRA ที่นำผลผลิตมาออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเป็นแบบ multi-locus แสดงว่าในตัวอย่างยูคาลิปตัสที่นำมาใช้มีหลายบริเวณที่จับได้กับไพรเมอร์นี้ ส่วนไพรเมอร์ NEM 2 ที่ให้แถบดีเอ็นเอแบบ single-locus นั้นแสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้มีความจำเพาะต่อบริเวณเดียว แต่การที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างอาจจะต้องมีการปรับสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้เหมาะสมต่อไป ส่วนไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เลยถึงแม้จะปรับเปลี่ยนอุณหภูมิแล้ว อาจเนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบมานี้จับกันเองหรือเกิดโครงสร้างที่ไม่เหมาะสม จึงควรออกแบบไพรเมอร์ใหม่ให้มีขนาดยาวขึ้นหรือสั้นลง หรือเปลี่ยนตำแหน่งที่สังเคราะห์ไพรเมอร์ไปอาจจะได้ผลที่ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากลำดับเบสที่บริเวณ 3' ของไพรเมอร์มีความสำคัญมาก โดยถ้าจับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบไม่ดี หรือมีส่วนที่เป็นคู่สมภายในไพรเมอร์เดียวกัน จะมีผลต่อปฏิกิริยามาก (สุรินทร์, 2552) นอกจากนี้ควรมี melting temperature และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ GC content ใกล้เคียงกัน และควรมีเบส G หรือ C ที่ปลาย 3' OH ทั้ง forward และ reverse ไพรเมอร์ (ปาริชาติ ศรีจำเริญ, 2547)



ภาพที่ 16 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ NEM 1 โดย M คือ marker ส่วนเลข 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างใน ตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ NEM 2 โดย M คือ marker ส่วนเลข 1 – 25 เป็นลำดับตัวอย่างของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างใน ตารางที่ 1 ลูกศรด้านข้างแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 125 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการค้นข้อมูลทำให้สามารถสังเคราะห์ไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 39 คู่ มีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 28 คู่ สามารถแสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัสทุกตัวอย่างได้จำนวน 18 คู่ แต่แถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนมากจึงปรับเปลี่ยนวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นแบบ touch down PCR และ hot start PCR พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่แตกต่างกันมาก และเมื่อปรับอุณหภูมิในช่วง annealing ให้สูงขึ้นพบว่าแถบดีเอ็นเอของบางตัวอย่างหายไป จากผลที่ได้ทำให้ทราบว่า คู่ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ส่วนใหญ่แสดงแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ multi-locus แต่ก็มีไพรเมอร์บางคู่ที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ single-locus

จากการวิเคราะห์ผลการตรวจดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 18 คู่ เมื่อนำมาทำ phylogenetic tree พบว่าสามารถแยกความสัมพันธ์ของยูคาลิปตัสได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยยูคาลิปตัส 4 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.605 – 0.684 กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 2-1 มีจำนวน 10 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.592 – 0.730 กลุ่ม 2-2 มีจำนวน 9 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่าง 0.579 – 0.730 กลุ่มที่ 3 และ 4 ประกอบด้วยตัวอย่างเพียงกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับยูคาลิปตัสตัวอย่างอื่นน้อยมากจึงถูกแยกออกมาเป็นกลุ่มใหม่

จากการคัดเลือกไพรเมอร์มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ duplex PCR พบว่ามีไพรเมอร์ทั้งหมด 4 คู่ ที่สามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกัน ได้แก่ EMBRA 2 กับ 22, 2 กับ 63, 22 กับ 69 และ 63 กับ 69 ทำให้ประหยัดเวลาและสารเคมีในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคลนพันธุ์ยูคาลิปตัส

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ให้แถบดีเอ็นขนาดใหญ่มาโคลน แล้วออกแบบไพรเมอร์ใหม่ พบว่า สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 6 คู่ ได้แก่ NEM 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 และเมื่อนำไพรเมอร์ใหม่นี้มาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัสทั้ง 25 ตัวอย่างใหม่ พบว่ามีเพียง 4 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ คือ NEM 1, 2, 4 และ 6 แต่ผลผลิตที่ได้ยังมีลักษณะเป็น multi-locus ยกเว้นไพรเมอร์ NEM 2 ที่แสดงผลแบบ single-locus จึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบยูคาลิปตัสต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกษมสุข เกษสกุล. 2536. **ยูคาลิปตัสพันธุ์ไม้เศรษฐกิจที่มีค่าทั้งปัจจุบันและอนาคต**. กองอนุรักษ์ต้นน้ำ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมป่าไม้. 2548. **เอกสารเผยแพร่**. ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน สำนักส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้.

คณะเทคนิคการแพทย์. 2536. **ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology**. พิมพ์ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

จุลภาค คุ้นวงศ์. 2547. **การพัฒนา Microsatellite marker เพื่อใช้ในการตรวจความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมพืชผักในวงศ์มะเขือและวงศ์แตง และใช้ในการปรับปรุงพันธุ์.** สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฐิติพร สายมณี. 2551. **การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล ธนานันต์. 2547. **การตรวจสอบยูคาลิปตัสด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและการถ่ายยีน HAL2 เข้าสู่ยูคาลิปตัสลูกผสม *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus tereticornis***. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทัศนีย์ รัติวานิช, อรรณพ อภิชาตบุตร และเพ็ญศรี นามประเสริฐ. 2525. **การผลิตเยื่อซัลเฟตจากไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส**. กองวิจัยผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

บุญวงศ์ ไทยอุตส่าห์. 2537. อดีต ปัจจุบัน และอนาคตไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย. **ว.สักทอง 12(4) : 6-13.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปาริชาติ ศรีจำเริญ. 2547. **การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*) ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิจิตร โชคพัฒนา. 2546. **ยูคาลิปตัส**. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน สำนักพิมพ์เกษตรสาส์น, นนทบุรี.

วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทัศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิลกรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2541. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล**. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

สมคิด สิริพัฒนดิลก และ สุธีร์ ดวงใจ. 2543. **การปรับปรุงผลผลิตเนื้อไม้ยูคาลิปตัสโดยการสร้างลูกผสม**. ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุขุน ภิระวัฒน์. 2538. **ความจำเป็นที่ต้องรีบสร้างสวนป่ายูคาลิปต์ด่วนที่สุด**. บริษัทฟ้าอภัย จำกัด, กรุงเทพฯ.

สุชาติ ไทยเพชร 2528. **คุณสมบัติของไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสและการใช้ประโยชน์**. รายงานการสัมมนาไม้ยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิส, 30 ตุลาคม – 1 พฤศจิกายน กรมป่าไม้ , กรุงเทพฯ.

สุธีร์ ดวงใจ. 2548. **การพิสูจน์ลูกผสมระหว่างยูคาลิปตัสคามาลดูเลนซิสและยูคาลิปตัสยูโรฟิลลาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**.สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Agrawal, G. R., R. N. Pandey and V. P. A. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris*. **Biotech. Biodiv. Lett**. 2:19-24.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Benbouza H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR marker in polyacrylamide gels. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 10(2): 77-81.

Brondani, R. P. V., C. Brondani and D. Grattapaglia. 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Mol. Genet. Genomics** 267: 338-347.

Brondani, R. P. V., C. Brondani and D. Grattapaglia. 2006. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biol**. 6: 20.

Brondani, R. P. V., C. Brondani., R. Tarchini and D. Grattapaglia. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers *in Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet**. 97: 816-827.

Chaix, G., I. Chantal, M. Poitel, S. Razafiarivelo, D. Verhaegen and J. C. Maillard. 2002. Microsatellite primer amplification by multiplexing: A first application to *Eucalyptus grandis*. **Plant Mol. Biol. Rep**. 20: 1-5.

Chembers, G. K. and E.S. Macavoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. **Comp. Biochem. Physiol**. 126: 455-476.

Clauss, M.J., H. Cobban and T. Mitchell-Olds. 2002. Cross-species microsatellite markers for elucidating population structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Brassicaeae). **Mol. Ecol**. 11: 591-601.

Cordeiro, G. M., Y. B. Pan and R. J. Henry. 2003. Sugarcane microsatellite for assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Sci**. 165: 181-189.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cotterill, P.P. 1989. Nucleus breeding system. General session: Advanced generation breeding strategy, pp. 36-42. **In 20th. Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference June 26-30.** South Carolina, United States of America.

Dorothy, A. S., C. Natalie, C.J. Rebecca, E.V. Rene and M.P. Bradley. 2006. A comparative analysis of population structure of a forest tree, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), using microsatellite markers and quantitative traits**. Tree Genet. Genomes** 2: 30-38.

Eiadthong, W., K. Yonemori, A. Sugiura, N. Utsanomiya and S. Subhadrabanhy. 1999. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers. **Sci. Hort**. 82: 57-66.

Eldridge, K., J. Davidson, C. Harwood and G.V. Wyk. 1997 . ***Eucalyptus* Domestication and Breeding**. Clarendon Press, Hong Kong.

Freeman, J. S., B. M. Potts, M. Shepherd and R. E. Vaillancourt. 2006. Parental and consensus linkage maps of *Eucalyptus globulus* using AFLP and microsatellite markers. **Silvae Genetica** 55: 4-5.

Grattapaglia, D., V.J. Ribeiro and G.D.S.P. Rezende. 2004. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. **Theor. Appl. Genet**. 109: 192-199.

Juillet, N., H. Freymond, L. Degen and J. Goudet. 2003. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in the bladder campion, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) **Mol. Ecol. Notes** 3: 358-359.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kirst, M., C.M. Cordiero, G.D.S.P. Rezende and D. Grattapaglia. 2005. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **J. Hered**. 96: 161-166.

Lee, W. J. and T. D. Kocher. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **J. Fish Biol**. 49:169-171.

Li, Y.C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles and E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Mol. Ecol.** 11: 2453-2465.

Lindsay, D. P. 1976. **The Biology of Eucalypts.** Edward Arnold, London.

Maguire, T.L., K.J. Edwards, P. Saenger and R. Henry. 2000. Characterization and analysis of microsatellite loci in a mangrove species, *Avicennia marind* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). **Theor. Appl. Genet.** 101: 279-285.

Nest, E., T. Steenkamp, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2000. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Eucalyptus* from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR)**. Plant Breed**. 119: 433-436.

Nei, M. and S. Kumar. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** 1 ed. Oxford university press, New York.

Nevill, P.G., A. Reed, G. Bossinger, R.E. Vaillancourt, M. Larcombe and P.K. ADES. 2008. Cross-species amplification of *Eucalyptus* microsatellite loci. **Mol. Ecol. Resour**. 8: 1277-1280.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ottewell, K.M., S.C. Donnellan, G.F. Moran and D.C. Paton. 2005. Multiplexed microsatellite markers for the genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other *Eucalyptus* species. **J. Hered**. 96: 445-451.

Perera, L., J. R. Russell, J. Proran and W. Powell. 2001. Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocus nucifera* L., Var. typica) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. **Euphytica** 122: 381-389.

Ponfole, A. R. and J. L. Wihs. 1961. **The Eucalypts: Botany, Chemistry, Cultivation and Utilization**. Leonard Hill, London.

Rocha, R.B., J.I.M. Abad, I.E. Pires and E.F. Araujo. 2002. Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* spp. genotypes using RAPD and SSR markers. **Scientia Forestalis** 62: 24-31

Richard G.F. and F. Pâques. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. **EMBO Rept.** 11: 122-126.

Roder, M. S., V. Korzun, V. B. Gill and M. W. ganal. 1998. The Physical mapping of microsatellite markers in wheat. **Genome** 41: 278-283.

Rongwen, J., M. S. Akkaya, A. A. Bhagwat, U. Lavi and P. B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theor. Appl. Genet**. 90: 43-48.

Sakamoto, T., R. G. Danzmann, N. Okamoto, M. M. Ferguson and D. E. Ihssen. 1999**.** Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 173: 33-43.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Santos, K.L., L.J. Welter, A.C. Dantas, M.P. Guerra, J.P. Ducroquet and R.O. Nodari. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genet. Mol. Biol.** 30: 73-79.

Senior, M. L. and M. Heun. 1993. Mapping maize microsatellite and polymerase chain reaction conformation of the targeted repeats using CT primer. **Cell** 36: 884-889.

Soliva, M., B.Gautshi, C. Salzmann, I. Tenzer and A. Widmer. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophyrus araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. **Mol. Ecol**. 9: 2178-2179

Steane, R., E. Vaillancourt, J. Russell, W. Powell, D. Marshall and B. M. Potts. 2001. Development and characterisation of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). **Silvae Genetica** 50: 2.

Tachida, H. and M. Iizuka. 1992. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. **Genetics** 131: 471-478.

Thomus, M. R. and N. S. Scott. 1993. Microsatellite repeat in grapevine reveal DNA polymorphism when analyzed as sequence tagged site (STS). **Theor. Appl. Genet**. 86: 985-990.

Waldbieser, C., D. J. Nonneman and W. R. Wolters. 2001. A microsatellite based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Ani. Genet**. 28: 295-298.

Weber, J. L. and P. E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms with can be types using polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet**. 44: 388-396.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Xu, Z., J. H. Primarera, L. D. delapena, P. Pettit, J. Belaak and A. Alcivar-Warren. 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture** 199: 13-40.

Yu, K., S.J. Park and V. Poysa. 1999. Abundance and variation of microsatellite DNA sequence in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome** 42: 27-34.

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

Zhao, X. and G. Kochert. 1993. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a $(CGC)_n$ microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Mol. Biol**. 21: 607-614.

Zucchi, M. I., R . P . V. Brondani, J . B. Pinheiro, C. Brondani and R. Vencovsky. 2002. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Mol. Ecol. Notes** 2: 512–513.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแยกดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel

การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น จากนั้นเช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิคร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก ส่วนกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจกปล่อยให้แห้ง 5- 10 นาที แล้วนำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่แล้วใช้เทปกาวติดกระจกทั้ง 3 ด้านเพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา และใช้คลิปหนีบอีกครั้งหนึ่ง

การเตรียมเจลพอลิอะครีลาไมด์ (non-denaturing polyacrylamide gel)

สารที่ใช้เตรียมเจลพอลิอะครีลาไมด์ประกอบไปด้วย น้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร, 5X TBE 3 มิลลิลิตร และเติมอะครีลาไมด์ (acrylamide:bisacrylamide = 19:1) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ammonium persulfate ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟอง เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หวีลงไป วางกระจกในแนวระดับแล้วปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2-3 ชั่วโมง

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด แกะเทปกาว ดึงหวีออกและประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม 0.5X TBE ลงในช่องทั้งด้านบนและด้านล่าง แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์เป่าเอาฟองอากาศออกให้หมด หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-6 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol และ 40% sucrose) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 ลงในช่องแต่ละช่อง เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ปิดเครื่อง แล้วนำกระจกออกมา แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน แล้วนำเจลไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรทดัดแปลงจากวิธีของ Benbouza *et al.* (2006)

นำกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ใน fixative (95% เอทานอล 33 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 265.5 มิลลิลิตร) 5 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า จากนั้นนำกระจกมาใส่ในสารละลายซิลเวอร์ ($AgNO_3$ 0.38 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และฟอร์มาลดีไฮด์ 1 มิลลิลิตร) นำกระจกมาแช่เป็นเวลา 5-7 นาทีเขย่าเบา ๆ อย่างต่อเนื่อง นำกระจกมาจุ่มในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปใส่ในสารละลาย developer (น้ำ 250 มิลลิลิตร, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม) เขย่าจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน แล้วแช่กระจกใน fixative 2 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาจากนั้นนำกระจกมาตากให้แห้ง

การโคลนชิ้นดีเอ็นเอ

1. เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM®T vector (Promega, USA) โดยเตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยใส่ผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร 2X Rapid Ligation Buffer 5.0 ไมโครลิตร pGEM®T vector 1.0 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (400,000 U/ml) 1.0 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. นำคอมพีเทนต์เซลล์ ออกจากตู้ -80 องศาเซลเซียส มาแช่ในกระติกน้ำแข็งเพื่อให้ละลาย
3. เติมสารละลายดีเอ็นเอ (จากข้อ 1) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
4. นำหลอดที่มีสารละลายดีเอ็นเอและคอมพีเทนต์เซลล์จุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายกลับมาแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 2 นาที
5. เติมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ และ 20 mM glucose ปรับ pH 6.8-7.0) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ใส่ X-gal และ IPTG ลงบนผิวหน้าอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร รอจนแห้ง นำสารละลายจากข้อ 5 มาเกลี่ยลงบนอาหารให้แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

7. ตรวจดูโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวและสีฟ้าที่เจริญบนอาหาร คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวมาทำการทดลองต่อไป

ลำดับเบส

ลำดับเบสของโคลนที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 8

TCACAACTAAAAATCAAAACCCACTGGTGCACAACCTGGATGCACTTATCTCCACCA
AATTAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATTTACACAAGCCCCCTTGAACCCCAAG
CTTCAGCTTCTGTAATAATCTGCTCTTTA

ลำดับเบสของโคลนที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 11

GTTCCCCATTTTCATGTCCTTTAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGTGCAATATACAAAGCTGGTAATCAAGCTTGGGCTTGAGAGAGAGAA
CCGCACTTGCCCCACAAATCCT

ลำดับเบสของโคลนที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 12

GCTTAGAATTTGCCTAAACCCAACGTAGGGTGTAGAGGGAGGGAGAGAGAGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGGACATCAGGGGGGACGTGGAATGCACCAAAGACCCATC
CTTGAATCATACCTGCTTGAGCCGCCGCAACATATTCAGCGACCATGTATTTATCTAC
TATCATGTCATTTTGAACGCCAGTATCTTCGAAAAAG

ลำดับเบสของโคลนที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 127

GTATAAGACCCAAAGACCCAAGTTTCTTCCTGAGCTCACACAAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATGTGGAGGAGAGAGAGGATACCTC
TCCTTGAAAATGCCACTGAACCCACAGGAACCCTACATCTTG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลำดับเบสของโคลนที่ได้จากไพรเมอร์ EMBRA 148

GATTACAAGCCACACCGTGTCAGTTAGCTCTCTGTTGCCTTCTCCTTCTTGCTCACCTT
CCACTACCAAAGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAAGTCATGCCTTGCGCCTGTGA
GTTGCCATGGAATCCTCCTTATTTTTCACCCAGATACTTTTGTTGGGTTCTGATACAAC
TTGGCTA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายธนรัตน์ ก.จันทราภานนท์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	9 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยบูรพา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกตรศาสตร์ ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการ ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์