

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะเดื่อ
(อังกฤษ) Genetics variation of *Ficus* sp.
แหล่งเงิน เงินบรายใต้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2553
จำนวนเงิน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 - 30 กันยายน 2553
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โปธิ์เอี่ยม
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
E-mail: pocaim@hotmail.com

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA: cpDNA) ของพืชสกุล *Ficus* โดยใช้ตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการหาความสัมพันธ์ระหว่างมะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) สายพันธุ์ต่างๆ จากพระตำหนักสวนปทุมที่เก็บรวบรวมมาจากสถานที่ต่างๆ และมะเดื่ออุทุมพร (*Ficus racemosa*) จำนวน 1 สายพันธุ์ จากการใส่คู่ไพรเมอร์ c และ d พบว่าทุกตัวอย่างของ *F. carica* มีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส อย่างไรก็ตาม *F. racemosa* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยคู่ไพรเมอร์นี้ได้ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมด 32 ตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustalX กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. carica* จำนวน 6 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank เพื่อหา phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining ในโปรแกรม Phylip ผลจากการศึกษาสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มหลัก โดยในกลุ่มแรกแสดงลักษณะ monophyletic คือ สายพันธุ์ Khalt (EU191024) สำหรับสายพันธุ์ที่เหลือจะอยู่ในกลุ่มที่สองซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในระดับสปีชีส์ต่ำ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *trnL* (UAA) intron มีความหลากหลายไม่เพียงพอกับการนำมาใช้หาความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม, *TrnL* (UAA) Intron, *Ficus carica*

ABSTRACT

Ficus sp. was analyzed for DNA sequence diversity in the non-coding region of chloroplast DNA. The *trnL* (UAA) intron sequences was used as genetic markers and establishing refined genetic relationships for differentiating *Ficus carica* collected from Phratamnak Suan Pathum originating from diverse geographical areas as well as only one *Ficus racemosa*. Using the c and d primers, a single DNA band of approximately 550 bp was amplified from each fig cultivars. However, those primers failed to amplify reproducible products from *F. racemosa*. Thirty-two sequences were aligned using the ClustalX program and compared with 6 public sequences of *F. carica* available in the GenBank database. Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-joining algorithm in the Phylip package. Phylogram from 38 sequences were revealed the presence of 2 main groups. The first group is monophyletic branch composed by Khalt (EU191024). All the remaining cultivars are ranged in the second cluster that comprises two sub-groups. Most of them were revealed a very low genetic diversity. The result was suggest that direct sequencing of the *trnL* (UAA) intron regions do not evolve rapidly enough to resolve relationships at these lower taxonomic levels.

Keywords: Genetic Diversity, *TrnL* (UAA) Intron, *Ficus carica*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินรายได้ ประจำปี 2553 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณทัศนารถ กระจ่างวุฒิ ที่ให้ความรู้ และคำปรึกษาแนะนำในการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะเดื่อฝรั่ง ตลอดจนโครงการส่วนพระองค์ในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ณ วังสวนประทุม จังหวัดปทุมธานี ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เยี่ยม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญรูป.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ทฤษฎี.....	3
1.4.1 ลักษณะทั่วไปของมะเดื่อ.....	3
1.4.2 คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ.....	4
1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	10
2.1 วัสดุ อุปกรณ์.....	10
2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....	10
2.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....	10
2.1.3 วัสดุ และสารเคมี.....	11
2.2 วิธีการทดลอง.....	11
2.2.1 การเก็บตัวอย่าง.....	11
2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	11
2.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	12
2.2.4 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	13

บทที่ 3 ผล และอภิปรายผลการทดลอง.....	15
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง	15
3.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	17
3.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	17
3.2.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ.....	19
 บทที่ 4 สรุป และเสนอแนะ.....	 23
 บรรณานุกรม.....	 24

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer จำนวน 6 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบริเวณ non-coding region ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ.....	5
2.1 รายละเอียดตัวอย่าง <i>F. carica</i> จากฐานข้อมูล GenBank ที่นำไปใช้ในเปรียบเทียบหา ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	14
3.1 แสดงรหัส และสายพันธุ์ของมะเดื่อฝรั่งที่ใช้ในการวิจัย.....	15

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1	แสดงลักษณะทางสัณฐานของมะเดื่อฝรั่ง.....4
1.2	แสดงตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ c และ d ในอินทรอนบริเวณ <i>trnL</i> intron.....5
3.1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>F. carica</i> A: โคนใบเป็นรูปดิ่งหู ขอบใบมีรอยหยักลึก, B: โคนใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบมีรอยหยักเล็กน้อย, C: โคนใบเป็นรูปเงี่ยงใบหอก ขอบใบมีรอยหยักลึกมาก และ D: โคนใบรูปหัวใจ ขอบใบมีรอยหยักเพียงเล็กน้อย.....6
3.2	ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง <i>trnL</i> โดย เลนที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, เลนที่ 2 คือ FC 001 Fracazzano, เลนที่ 3 คือ FC 002 Kadoto หรือ Dotlato, เลนที่ 4 คือ FC 003 Horai, เลนที่ 5 คือ FC 004 Black genoa, เลนที่ 6 คือ FC 005 Brown turkey และเลนที่ 7 คือ negative (ชุดที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ).....18
3.3	โครงสร้างของบริเวณ <i>trnT</i> (UGU) – <i>trnF</i> (GAA) ที่ประกอบด้วยตำแหน่ง <i>trnL</i> (UAA) intron ระหว่าง <i>trnL</i> (UAA) 5' exon และ <i>trnL</i> (UAA) 3'exon และ <i>trnL</i> – <i>trnF</i> intergenic spacer ระหว่าง 3' exon ของ <i>trnL</i> (UAA) และ <i>trnF</i> (GAA) ตำแหน่งของไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product.....18
3.4	พิกัดตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน ของ FC 013 Paradiso nero (black).....19
3.5	Phylogenetic tree ที่ได้จาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่ง <i>trnL</i> ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม PHYLIP เปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานวิทยาที่ได้จำแนกกลุ่ม.....21