



วิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus*
camaldulensis โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF *EUCALYPTUS*
CAMALDULENSIS USING MICROSATELLITE MARKERS

นางฐิติพร สายมณี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis* โดยใช้
เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

Genetic Diversity Analysis of *Eucalyptus camaldulensis* Using Microsatellite Markers

นามผู้วิจัย นางจิตติพร สายมณี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทน์เปรม, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์วิจิตร ใจอารีย์, Dr. rer. agr.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 3 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis* โดยใช้เครื่องหมาย
ไมโครแซทเทลไลต์

Genetic Diversity Analysis of *Eucalyptus camaldulensis* Using Microsatellite Markers

โดย

นางฐิติพร สายมณี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2551

จิตติพร สายมณี 2551: การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันท์เปรม, Ph.D. 66 หน้า.

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) เป็นไม้เศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากของประเทศไทย ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้สามารถปลูกได้ในสภาพพื้นที่ที่มีความแตกต่างกัน มีความต้านทานโรคและแมลง รูปแบบของการปรับปรุงพันธุ์ที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือ nucleus breeding strategy ที่มีหลักการสำคัญอยู่ที่การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม นำมาสร้างเป็นประชากรขนาดเล็กที่มีลักษณะดีเด่น (nucleus population) ซึ่งพ่อแม่พันธุ์จำนวนหนึ่งถูกคัดเลือกและทดสอบภายในประเทศ จึงไม่สามารถตรวจสอบถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติได้ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้เพื่อต้องการทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่พันธุ์ภายในประเทศกับพ่อแม่พันธุ์ที่คัดเลือกใหม่จากต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการตรวจสอบ โดยแยกพ่อแม่พันธุ์ที่คัดเลือกใหม่จากต่างประเทศเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* จำนวน 20 ตัวอย่าง และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* จำนวน 20 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างของประเทศไทย 5 ตัวอย่าง ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาใน *E. grandis*, *E. urophylla* และ *E. globulus* ในการตรวจสอบโดยคัดเลือกไพรเมอร์จากทั้งหมด 80 ไพรเมอร์ เหลือจำนวนไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 12 ไพรเมอร์ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป STRUCTURE พบว่า สามารถแบ่งประชากรเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยทั้งหมด 20 ตัวอย่างของ *E. camaldulensis* ssp. *simulata*, 18 ตัวอย่างของ *E. camaldulensis* var. *obtusa* และ 1 ตัวอย่างจากประเทศไทย และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่างของ *E. camaldulensis* var. *obtusa* และ 4 ตัวอย่างจากประเทศไทย ดังนั้น ในการผสมพันธุ์สามารถผสมข้ามกลุ่มกันได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันมาก นอกจากนี้ยังประเมินได้เบื้องต้นว่าระหว่าง *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* มีโครงสร้างของประชากรที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นจึงสามารถสร้างประชากรในการปรับปรุงพันธุ์รวมกันเป็นประชากรเดียวกันได้

ลายมือชื่อนิสิต

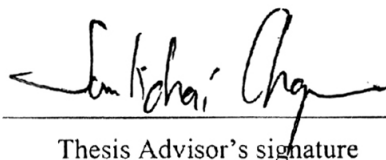
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Titiporn Saimanee 2008: Genetic Diversity Analysis of *Eucalyptus camaldulensis*
Using Microsatellite Markers. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major
Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis
Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 66 pages.

Eucalyptus camaldulensis is an important economic tree in Thailand, but there are still some problems about environmental adaptation, disease and insect resistance which need to be improved. A famous conventional tree improvement program is 'Nucleus Breeding Strategy'. This method needs parents having difference in genetic background, however, some existing parents in Thailand do not have confirmed their natural origins. Therefore, the aim of this study is to evaluate genetic difference among foreign and Thai varieties by using microsatellite markers. The samples were divided into three groups consisting of 20 samples each of *E. camaldulensis* ssp. *simulata* and *E. camaldulensis* var. *obtusa* from foreign and 5 samples from Thailand. Eighty microsatellite primers developed from *E. grandis*, *E. urophylla* and *E. globulus* were screened. Twelve primers were selected. The data were analyzed by STRUCTURE program. It was found that the samples could be clearly divided into 2 groups. Group 1 consisted of 20 samples belong to *E. camaldulensis* ssp. *simulata*, 18 samples belong to *E. camaldulensis* var. *obtusa* and 1 sample from Thailand. Group 2 consisted of 2 samples of *E. camaldulensis* var. *obtusa* and 4 samples from Thailand. So, controlled pollination between groups can be made with confidence that inbreeding is probably low and this result shows basically that *E. camaldulensis* ssp. *simulata* and *E. camaldulensis* var. *obtusa* can be combined into the same population.



Student's signature



Thesis Advisor's signature

19 / 3 / 08

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคณะอาจารย์ที่ปรึกษาอันประกอบด้วย รศ.ดร. สนธิชัย จันทน์เปรม, ผศ.ดร. เสริมศิริ จันทน์เปรม และ ดร. วิจิตร ใจอารีย์ รวมถึงขอขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับ Dr. Hugo Volkaert, ดร.กุลศิริ ช.กรับส์, พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ของห้องปฏิบัติการ A207, A310 คุณสุบิน หินจันทร์ และน้องเสริมสวัสดิ์ คุลยอนุกิจ จากห้องปฏิบัติการ A610 ในการให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่าง ๆ

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณ บริษัท เอสซีจี เปเปอร์ จำกัด (มหาชน) และบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด ที่ให้โอกาสในการเรียน สนับสนุนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณแม่สมพร ณ.มหาไชย ที่ช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และ ด.ญ.กฤตพร สายมณี ลูกสาวที่เป็นกำลังใจตลอดมา

ฐิติพร สายมณี

มีนาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลและวิจารณ์	21
สรุปและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบผลการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining และ capillary electrophoresis	28
ตารางผนวกที่		หน้า
1	รายละเอียดของตัวอย่างที่ศึกษา	50
2	รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	52
3	สรุปผลการแยกความแตกต่างด้วยวิธี silver staining	57
4	ข้อมูลการให้คะแนนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE	61

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของ <i>E. camaldulensis</i> ในประเทศออสเตรเลีย	5
2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>E. camaldulensis</i> ssp. <i>simulata</i>	7
3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>E. camaldulensis</i> var. <i>obtusa</i>	7
4	การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของตัวอย่างที่ศึกษา	21
5	ลักษณะของใบอ่อนสดบริเวณปลายยอดของต้นตัวอย่างในแปลงทดลอง	23
6	ลักษณะของใบอ่อนสดจากหน่อใหม่ที่เกิดขึ้นในแปลงทดลอง	23
7	ลักษณะของใบอ่อนสดจากกิ่งที่นำมาปักชำในโรงเรือนเพาะชำพร้อมให้น้ำด้วยระบบพ่นฝอย	23
8	กราฟเปรียบเทียบผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ใบอ่อนสดจากแหล่งต่าง ๆ กัน	24
9	ตัวอย่างเจลที่แยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining โดยใช้ไพรเมอร์ EMBRA42	25
10	ตัวอย่างผลการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยวิธี capillary electrophoresis โดยใช้ไพรเมอร์ EMBRA42 กับตัวอย่าง MO13	26
11	เปรียบเทียบผลการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอของตัวอย่าง MS01 – MS20 โดยใช้ไพรเมอร์ EMBRA42 ด้วยวิธี silver staining (ซ้าย) และวิธี capillary electrophoresis (ขวา)	27
12	matrix comparison ระหว่างการคำนวณครั้งแรกด้วย Jaccard และหลังคำนวณ cophenetic correlation	29
13	แผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จากการคำนวณแบบ Jaccard model และจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS	30
14	แผนภูมิต้นไม้จำลองแบบ consensus ที่ได้จากการคำนวณแบบ Jaccard model และค่า bootstrap แสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50% ด้วยโปรแกรม Winboot	32
15	กราฟแสดงการคำนวณค่ากลุ่มย่อยหรือค่า K ที่แท้จริง	33
16	แผนภูมิแท่งประยุทธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มย่อย	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 17 กลุ่มตัวอย่างที่สองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE เมื่อ
วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS (ก) และ โปรแกรม Winboot (ข) พบว่าถูกจัดอยู่
ในกลุ่มเดียวกัน

38

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DBH: diameter at breast height (cm.)

CTAB: cetyltrimethyl ammonium bromide

burnin: burnin length: how long to run the simulation before collecting data to minimize the effect of the starting configuration

MCMC: how long to run the simulation after the burnin to get accurate parameter estimates

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis* โดยใช้ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

Genetic Diversity Analysis of *Eucalyptus camaldulensis* Using Microsatellite Markers

คำนำ

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า อุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษส่วนใหญ่ใช้ไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) เป็นวัตถุดิบหลัก ซึ่งเชื้อที่ผลิตจากยูคาลิปตัส เริ่มมีการซื้อขายกันในตลาดโลก ประมาณปี 2500 และในช่วงเวลาเพียงไม่ถึงหนึ่งทศวรรษ เชื้อยูคาลิปตัสสามารถครองตลาด และ กลายเป็นวัตถุดิบสำคัญของการผลิตกระดาษพิมพ์เขียน (Cotterill and McRae, 1997) เนื่องจากมี คุณภาพดี และสามารถใช้ประโยชน์ในการทำกระดาษได้หลากหลาย

สำหรับประเทศไทย ยูคาลิปตัสเป็นไม้เศรษฐกิจที่มีความสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ สามารถสร้างรายได้จำนวนมาก ดังนั้นจึงมีความต้องการปรับปรุงพันธุ์ ยูคาลิปตัสเพื่อให้มีลักษณะที่เหมาะสม ตอบสนองต่อความต้องการของอุตสาหกรรมนี้ รูปแบบการ ปรับปรุงพันธุ์แบบหนึ่งที่นิยมใช้คือ nucleus breeding strategy เนื่องจากให้คุณค่าของการปรับปรุง พันธุ์ต่อรอบการปรับปรุงพันธุ์สูง หลักสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ในรูปแบบนี้ คือ การคัดเลือก เฉพาะสายต้นที่มีลักษณะดีเด่นเป็นพ่อแม่พันธุ์ สร้างเป็นประชากรขนาดเล็กที่มีลักษณะดีเด่น (nucleus population) ดังนั้นการเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจึงมีความ สำคัญ ซึ่งปัจจุบันมีสายต้นที่ถูกคัดเลือกและพัฒนาในประเทศไทย (land race) ถูกนำมาใช้เป็นพ่อแม่ พันธุ์อยู่แล้ว ปัญหาก็คือ สายต้นเหล่านี้ไม่สามารถตรวจสอบประวัติย้อนกลับไปได้ว่ามาจากถิ่น กำเนิดใดตามธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ใหม่เพิ่มเติม จึงทำให้ไม่ทราบว่าฐาน พันธุกรรมมีความใกล้เคียงกันกับพ่อแม่พันธุ์ปัจจุบันมากน้อยเพียงใด และนอกจากนี้ในประชากร *E. camaldulensis* ยังถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusata* จึงเกิดคำถามว่าในการสร้างประชากรควรสร้างเป็นประชากรเดียว หรือแยกจากกัน

ดังนั้น จึงเป็นที่มาของการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เพื่อใช้ตอบคำถามข้างต้น ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ ควรใช้วิธีที่น่าเชื่อถือ ทำได้ง่าย สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม และมีความเฉพาะเจาะจงกับยูลิปัส ได้แก่ การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite markers)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกคัดเลือกและพัฒนาภายในประเทศไทย และพ่อแม่พันธุ์ที่คัดเลือกใหม่จากประชากรหลักที่ปลูกด้วยเมล็ดที่มาจากถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติ เพื่อจัดแบ่งกลุ่มของกลุ่มที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมสำหรับสร้างเป็นประชากรขนาดเล็กที่คัดเลือกเฉพาะสายต้นที่มีลักษณะดีเด่นใน nucleus breeding strategy

2. เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของประชากรระหว่าง *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusata* เพื่อประกอบการตัดสินใจในเบื้องต้นว่าควรสร้างเป็นประชากรรวมหรือแยกเป็นสองกลุ่มย่อย

การตรวจเอกสาร

1. ยูคาลิปตัส

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น (tree) หรือไม้พุ่ม (shrub) ที่มีความสูงตั้งแต่ 3-70 เมตร พบประมาณ 700 ชนิด ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดในประเทศออสเตรเลีย พบเป็นส่วนน้อยในติมอร์ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ยูคาลิปตัสชนิดที่นิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมเอี้อกระดาษในเขตหนาวและกึ่งหนาวคือ *E. globulus*, *E. grandis*, *E. nitens*, *E. viminalis* และลูกผสมของ *E. grandis* x *E. urophylla* และในเขตร้อนคือ *E. camaldulensis* และ *E. urophylla* (Cotterill and McRae, 1997)

สำหรับในประเทศไทยมีการนำยูคาลิปตัสเข้ามาปลูกตั้งแต่ประมาณปี 2493 และชนิดที่สามารถปลูกได้ดีคือ *E. camaldulensis* มีชื่อสามัญว่า river red gum, murry red gum, red gum หรือ river gum มีการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน ดังนี้

หมวด (division) Magnoliophyta

ชั้น (class) Magnoliopsida

ชั้นย่อย (subclass) Rosidae

อันดับ (order) Myrtales

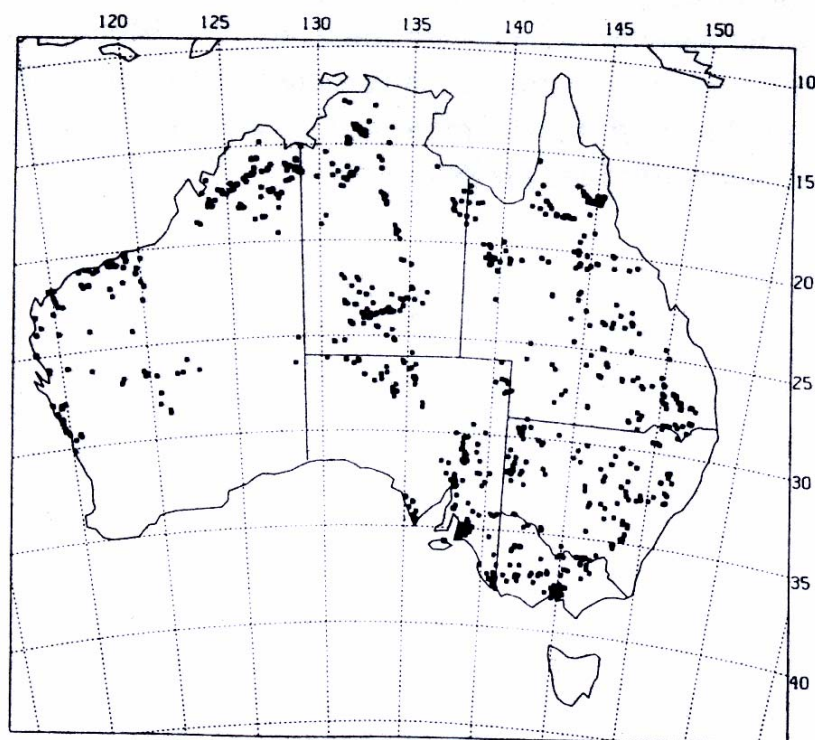
วงศ์ (family) Myrtaceae

สกุล (genus) *Eucalyptus*

ชนิด (species) *E. camaldulensis* Dehnh.

E. camaldulensis เป็นไม้พื้นเมืองของประเทศออสเตรเลีย มีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติกว้างขวางทั่วประเทศ (ดังภาพที่ 1) พบมากตามริมน้ำและที่ราบน้ำท่วมถึงตอนกลางของประเทศ ลักษณะพื้นที่ที่ *E. camaldulensis* กระจายอยู่มีหลายลักษณะ ทั้งพื้นที่แห้งแล้ง กึ่งแห้งแล้งตามริมธารและแม่น้ำ และพื้นที่ลาดชันบนเขา ลักษณะอากาศที่ *E. camaldulensis* กระจายพันธุ์อยู่มีความหลากหลายเช่นเดียวกัน คือสามารถพบได้ทั้งในเขตร้อนซึ่งมีอุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ยรายเดือนของเดือนที่ร้อนอยู่ในช่วง 27 – 40 องศาเซลเซียส จนถึงเขตอบอุ่นที่มีอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ยรายเดือนของเดือนที่หนาวอยู่ในช่วง 3 – 15 องศาเซลเซียส ปกติพบในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนอยู่ในช่วง 250 –

625 มิลลิเมตรต่อปี แต่บางพื้นที่ปริมาณน้ำฝนอาจสูงถึง 1,250 มิลลิเมตรต่อปี หรือบางพื้นที่ปริมาณน้ำฝนอาจต่ำเพียง 150 มิลลิเมตรต่อปี (Eldridge *et al.*, 1993)



ภาพที่ 1 การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของ *E. camaldulensis* ในประเทศออสเตรเลีย
ที่มา: Eldridge *et al.* (1993)

ลักษณะโดยทั่วไปของ *E. camaldulensis* เป็นไม้ยืนต้นสูง 15-30 เมตร แต่ในบางแห่งพบว่าสูงถึง 50 เมตร ลำต้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับอก (DBH) 1 – 2 เมตร เปลือกลำต้นเรียบสีชมพู สีครีม หรือสีขาวปนกัน เปลือกลอกเป็นแผ่นกว้าง ใบมีความผันแปรไปตามช่วงอายุ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงแบบสลับ แต่ในต้นอ่อนใบเรียงแบบตรงกันข้าม ใบรูปรียาวหรือรูปหอก ใบมักจะห้อยลง แต่ในต้นอ่อนใบเป็นรูปไข่หรือรูปหอกกว้าง ๆ ไม่มีหูใบ ใบเป็นรูปสี่เหลี่ยม ดอกเกิดเป็นช่อตามซอกใบ ในแต่ละช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยจำนวน 7 – 11 ดอก ดอกย่อยเป็นรูปกระสวย มีฐานรองดอกเป็นรูปถ้วย กลีบเลี้ยงและกลีบดอกปรับสภาพเป็นฝาปิด (operculum) และมีจำนวนฝาปิดสองชั้น ชั้นนอกเกิดจากกลีบเลี้ยง ส่วนฝาปิดชั้นในเกิดจากการเชื่อมรวมกันของกลีบดอก ในแต่ละดอกมีเกสรเพศผู้จำนวนมาก ก้านชูอับละอองเรณูตั้งตรง รังไข่มี 4 คาร์เพล แต่ละคาร์เพลมีไข่จำนวนมาก ออกดอกเกือบตลอดทั้งปี ผลเป็นรูปถ้วย ผลแห้งแตก เมล็ดสีน้ำตาลหรือสีเหลือง (สุธีร์, 2543)

จากการที่ *E. camaldulensis* มีการแพร่กระจายเป็นวงกว้างและมีลักษณะที่แตกต่างกันตามถิ่นกำเนิด ดังนั้นจึงมีการจำแนก *E. camaldulensis* ออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ 1 ชนิดย่อย (subspecies) ได้แก่ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ 2 วาไรตี้ (varieties) ได้แก่ *E. camaldulensis* var. *obtusa* และ *E. camaldulensis* var. *camaldulensis* ซึ่งในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันหลัก ๆ ได้แก่ การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ สีและลักษณะของเปลือก และลักษณะของฝัก (CSIRO, n.d.) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติ

E. camaldulensis ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* จะพบการแพร่กระจายทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย ส่วน *E. camaldulensis* var. *camaldulensis* จะพบทางตอนใต้ของประเทศในบริเวณที่มีอากาศหนาวกว่า

สีและลักษณะของเปลือก

E. camaldulensis ssp. *simulata* มีเปลือกสีเทาถึงขาว ลักษณะเรียบ ส่วน *E. camaldulensis* var. *obtusa* จะมีเปลือกสีแดง น้ำตาลอ่อนถึงขาว ลักษณะเรียบ และ *E. camaldulensis* var. *camaldulensis* จะมีเปลือกสีเทาถึงขาว พบเปลือกขรุขระบริเวณโคนต้น

ลักษณะของฝัก

E. camaldulensis ssp. *simulata* มีฝักรูปเขาสัตว์ (horn shaped) หรือรูปกรวยค่อนข้างยาว ส่วน *E. camaldulensis* var. *obtusa* จะมีฝักรูปกลม (rounded) หรือกรวยทู่ (obtuse) และ *E. camaldulensis* var. *camaldulensis* จะมีฝักรูปจะงอย (strongly beaked)

สำหรับประเทศไทยมี 2 กลุ่มย่อย คือ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* ซึ่งมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดคือ สีและลักษณะของเปลือก และรูปร่างของฝัก ดังภาพที่ 2 และ 3



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *E. camaldulensis* ssp. *simulata*
 ที่มา: <http://www.viridans.com/plpics/htm/1322AVDN.HTM>



ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *E. camaldulensis* var. *obtusata*
 ที่มา: <http://www.viridans.com/plpics/htm/1258AVDN.HTM>

2. การปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัส

รูปแบบการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัสมีหลายรูปแบบ แต่รูปแบบที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ nucleus breeding strategy เสนอโดย Cotterill (1989) ซึ่งปรับปรุงมาจากการปรับปรุงพันธุ์แกะในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ หลักการของการปรับปรุงพันธุ์รูปแบบนี้ คือ จะแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มประชากรหลัก (main population) เป็นประชากรที่มีฐานพันธุกรรมกว้าง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และกลุ่มประชากรขนาดเล็กที่มีคัดเลือกเฉพาะสายต้นที่มีลักษณะดีเด่น (nucleus population) เป็นประชากรที่ได้จากการคัดเลือกจากกลุ่มประชากรหลักโดยเลือกเฉพาะต้นที่มีลักษณะดีเด่น (best parents) นำมาผสมกันเอง (best-with-best) แบบควบคุม (control pollination) จะได้ลูกผสมแบบ full-sib progeny นำไปปลูกทดสอบและคัดเลือกต้นที่ให้ลักษณะดีเด่นที่สุด ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (cloning) เพื่อปลูกต่อไป การปรับปรุงพันธุ์ในรูปแบบนี้จะให้ genetic gain สูงประมาณ 20-40% ทั้งนี้ขึ้นกับอัตราการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (heritability) ของลักษณะที่คัดเลือก จุดสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ในรูปแบบนี้คือ การคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการสูงนั้น จะต้องเลือกต้นที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมสูงด้วย เพื่อให้ลูกผสมที่ได้ดีเด่นขึ้น

วิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้สามารถคำนวณได้โดยใช้ข้อมูลทางพันธุศาสตร์เชิงปริมาณ (quantitative genetic data) และการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลที่น่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากกว่า (Dorothy *et al.*, 2006)

3. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในงานปรับปรุงพันธุ์

ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลมีบทบาทช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่าง ๆ มากมาย ซึ่งในทางการเกษตรมีการนำเทคนิคนี้มาใช้และประสบความสำเร็จมากกว่าสองทศวรรษ ในยูคาลิปตัสมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยเสริมโครงการปรับปรุงพันธุ์เช่นกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพลดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์แต่ละรอบ รวมทั้งลดค่าใช้จ่ายในการจัดทำแปลงทดลอง (MacRae and Cotterill, 2000; Poke *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์เพื่อค้นหาและศึกษาขึ้นที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต่าง ๆ ที่มีความสำคัญทางการค้า เช่น ความทนทานต่อความหนาวเย็น ความทนโรค การเพิ่มผลผลิตเนื้อไม้

และความสูง ความสามารถในการสร้างราก การเพิ่มปริมาณเปอร์เซ็นต์เชื้อ การลดปริมาณลิกนิน การเพิ่มคุณภาพเยื่อและคุณภาพกระดาษ (Cotterill and McRae, 1997; Marques *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2002; Poke *et al.*, 2005) มีรายงานการศึกษาการใช้ประโยชน์ดังกล่าวในยูคาลิปตัสหลายชนิดเช่น *E. globulus*, *E. tereticornis*, *E. urophylla*, *E. grandis* (Byrne *et al.*, 1997; Brondani *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 1998; Thamarus *et al.*, 2002; Junghans *et al.*, 2003; Thamarus *et al.*, 2004; Li *et al.*, มปป.) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *E. urophylla* x *E. grandis* (Verhaegen *et al.*, 1997) และ *E. grandis* x *E. globulus* (Myburg *et al.*, 2003) อีกด้วย

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker) เป็นเครื่องหมายที่มีขนาดของชุดซ้ำสั้นมากเพียง 1 – 4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส (สุรินทร์, 2545) มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ simple sequence repeat (SSR), simple sequence length polymorphism (SSLP) และ sequence tagged microsatellite site (STMS) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของลำดับเบสบนจีโนม โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเพื่อให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์เฉพาะตำแหน่งที่สามารถแสดงความแตกต่างได้ ซึ่งโดยทั่วไปเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จะให้จำนวนแถบดีเอ็นเอไม่มากนักเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่ง ข้อดีของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ คือ เป็นเครื่องหมายที่สามารถให้ความแตกต่างได้สูง และแสดงให้เห็นสภาพผสมร่วมกันของยีน (co-dominant) ต้องการปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย พบกระจายทั่วทั้งจีโนม ทั้งระหว่างยีนและภายในยีนและสามารถใช้ได้เพียงทราบลำดับเบสของไพรเมอร์ (จิระ, 2549) มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เพื่อศึกษาการเรียงตัวของดีเอ็นเอส่วนต่าง ๆ ในจีโนม หรือการทำแผนที่ยีน และยังประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของพันธุ์ (Smith *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่และใช้ทดสอบลูกผสม ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต และหาเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบหรือบ่งชี้ลักษณะจำเพาะ เช่น ความต้านทานโรค ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมบางอย่าง การควบคุมการออกดอก (Missiaggia *et al.*, 2005) ซึ่งจะนำไปสู่การโคลนยีนโดยอาศัยแผนที่ยีนได้ด้วย

4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นการวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลและตัวอย่าง (cluster analysis) โดยใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการจำแนก หรือแบ่งข้อมูล หรือ

ตัวอย่างที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มย่อย ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป โดยประเมินความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่งอาศัยค่าความสัมพันธ์ (correlation) และค่าความน่าจะเป็น (probability) ในการจัดกลุ่ม ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ distance function ที่จะคำนวณความเหมือน (similarity) หรือความต่าง (distance) ของตัวอย่างที่ศึกษา แล้วนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าความคล้ายกันมากที่สุด หรือมีค่าความต่างน้อยที่สุดจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนตัวอย่างที่มีค่าความคล้ายกันน้อย หรือมีความต่างกันมากจะจัดให้อยู่ต่างกลุ่มกัน ซึ่งวิธีการนี้จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่างที่ศึกษามีความคล้ายคลึง หรือแตกต่างกันมากน้อยอย่างไร

ข้อมูลที่ใช้ในการนำมาวิเคราะห์โดยวิธีจัดกลุ่มแบบนี้สามารถใช้ข้อมูลที่เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุล ได้แก่ ผลผลิตต่อพื้นที่ จำนวนรวงต่อพื้นที่ จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนักเมล็ด ความสูงต้น ความโตต้น น้ำหนักแห้งของต้น หรือ การต้านทานต่อโรคหรือแมลง และข้อมูลลักษณะการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคต่าง ๆ เช่น RAPD, RFLP, AFLP หรือ SSR เป็นต้น การแสดงผลความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่จัดกลุ่ม สามารถแสดงโดยแผนภูมิต้นไม้จำลองที่จะแสดงค่าความเหมือน (similarity) หรือความต่าง (distance) บอกถึงระดับความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างได้ (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2550)

วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองด้วยวิธี distance method จะอาศัยระยะห่างระหว่างตัวอย่างแต่ละคู่จากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด แผนภูมิต้นไม้จำลองที่สร้างขึ้นจะพิจารณาจากความสัมพันธ์ของค่า distance ที่ได้จากตัวอย่างแต่ละคู่เปรียบเทียบกับคู่อื่น ๆ วิธีการที่นิยมใช้ได้แก่ UPGMA (unweight pair-groups method using arithmetic average) ซึ่งจะสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองโดยการหาคู่ตัวอย่างที่มี pairwise distance น้อยที่สุดจาก distance matrix จากนั้นจัดให้ตัวอย่างคู่นั้นรวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) ในส่วนอื่น ๆ ของ matrix ที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลุ่มดังกล่าวให้คงค่าเดิมไว้ จากนั้นดำเนินการรอบใหม่ โดยเริ่มจากการหาคู่ตัวอย่างที่มี pairwise distance น้อยที่สุดเช่นเดิม แล้วจัดกลุ่ม ดำเนินการเช่นนี้ไปจนทุกตัวอย่างถูกจัดเข้าอยู่ในกลุ่ม วิธีการนี้ใช้ได้ดีในกรณีที่อัตราการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบสคงที่เท่านั้น ถ้าอัตราการแทนที่เบสไม่คงที่แล้ว ลักษณะของแผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จะมีความคลาดเคลื่อนสูง (Nei and Kumar, 2000)

วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองอีกวิธีหนึ่งที่นิยมคือ วิธีการ maximum likelihood ซึ่งเป็นการสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองภายใต้แบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสมโดยพิจารณาความเป็นไปได้ (likelihood) ของแผนภูมิต้นไม้จำลองที่สร้างขึ้นภายใต้ข้อกำหนดที่ว่าลักษณะของ

แผนภูมิต้นไม้จำลองใดที่ให้ค่า likelihood สูงสุดจะเป็นแผนภูมิต้นไม้จำลองที่ดีที่สุด ค่า likelihood ของตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะเท่ากับผลรวมของความน่าจะเป็นที่บรรพบุรุษจะมีนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบต่าง ๆ ที่เป็นไปได้ในทุกรูปแบบภายใต้แบบจำลองการแทนที่เบสที่กำหนด โดยในโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะรายงานค่า likelihood เป็นค่า $-\ln$ ดังนั้นค่า $-\ln$ ที่ได้ยิ่งมีค่าต่ำแสดงว่าค่า likelihood ของแผนภูมิต้นไม้จำลองนั้น ๆ จะมีค่าสูง (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2550)

ค่าที่ใช้ในการตรวจสอบการจัดกลุ่มแผนภูมิต้นไม้จำลอง

1. Cophenetic correlation

เป็นค่าที่บอกถึงว่า การจัดกลุ่มที่ได้ดีเพียงใด ซึ่งคู่ได้จากค่า goodness of fit โดยคำนวณหาค่า cophenetic correlation (r) โดย

$r > 0.9$ หมายถึง จัดกลุ่มได้ดีมาก

$0.9 > r > 0.8$ หมายถึง จัดกลุ่มได้ดี

$0.8 > r > 0.7$ หมายถึง จัดกลุ่มได้ปานกลาง

$0.7 > r$ หมายถึง จัดกลุ่มได้ไม่ดี

2. Bootstrap test

เป็นการทดสอบความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดมีมากน้อยเท่าไร โดยบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิมเท่าไร เมื่อมีการสุ่มเอาตัวแปร (variable) หรือข้อมูลใด ๆ ที่ใช้ในการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ

วิธีการคือ ทำการเลือกข้อมูลในคอลัมน์ใด ๆ โดยสุ่ม แล้วแทนที่ด้วยข้อมูลจากคอลัมน์อื่นที่เลือกมาโดยสุ่มเช่นเดียวกัน ดังนั้นจะมีข้อมูลในบางตำแหน่งที่ปรากฏขึ้นอย่างน้อย 2 ครั้ง ในขณะที่ข้อมูลบางตำแหน่งไม่เปลี่ยนแปลง จากผลของการสุ่มแทนที่ดังกล่าวจะทำให้เกิดลำดับของข้อมูลใหม่ และจะใช้เป็นข้อมูลในการสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองพื้นฐานของแผนภูมิต้นไม้จำลองที่สร้างขึ้นใหม่ จะถูกเปรียบเทียบกับแผนภูมิต้นไม้จำลองที่สร้างไว้โดยไม่มีการแทนที่ข้อมูลใด ๆ (original tree) ถ้า interior branch ของแผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้เหมือนกับ

original ของแผนภูมิต้นไม้จำลองจะให้คะแนนเป็น 1 แต่ถ้า branch ใด พบเฉพาะใน original ของแผนภูมิต้นไม้จำลองจะมีค่าเป็น 0 และ bootstrap จะดำเนินการเช่นนี้หลาย ๆ รอบ แล้วจะคำนวณเปอร์เซ็นต์ของแต่ละ interior branch ของ original ของแผนภูมิต้นไม้จำลองที่พบในแผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จากการสลับข้อมูลทีละรอบ ค่าที่ได้นี้เรียกว่า confidential value หรืออาจเรียกว่า bootstrap value

กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า bootstrap มาก แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือ โอกาสที่การจัดกลุ่มจะเปลี่ยนไปน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดียวจะไม่สามารถคำนวณค่า bootstrap ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างสายต้นยูคาลิปตัสที่คัดเลือกจากแปลงประชากรหลักที่รวบรวมเชื้อพันธุ์ของ *E. camaldulensis* ซึ่งเป็นแปลงทดลองที่ปลูกโดยใช้เมล็ดนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งทราบถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติ และตัวอย่างสายต้นพ่อแม่พันธุ์ที่คัดเลือกจากภายในประเทศไทยเพื่อเป็นสายต้นเปรียบเทียบ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบย้อนกลับว่ามาจากถิ่นกำเนิดใดตามธรรมชาติ
2. วัสดุอุปกรณ์สำหรับสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่น โกร่ง tip ที่นั่งฆ่าเชื้อแล้ว เครื่องปั่นเหวี่ยง เป็นต้น
3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น เครื่องพีซีอาร์, ถาดสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์, สารเคมีต่าง ๆ สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นต้น
4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น เครื่อง electrophoresis กระจก สารเคมีสำหรับเตรียม polyacrylamide gel และสารเคมีที่ใช้สำหรับย้อมด้วยวิธี silver staining เครื่อง capillary electrophoresis เป็นต้น
5. เครื่องคอมพิวเตอร์และโปรแกรมในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ NTSYS, Winboot, STRUCTURE

วิธีการ

1. การคัดเลือกตัวอย่าง

คัดเลือกจากแปลงประชากรหลักที่รวบรวมเชื้อพันธุ์ของ *E. camaldulensis* ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* โดยเลือกจากตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดทั้ง 2 กลุ่ม กลุ่มย่อยละ 20 ตัวอย่าง และเลือกตัวอย่าง *E. camaldulensis* ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ปัจจุบัน เพื่อเป็นตัวอย่างเปรียบเทียบจำนวน 5 ตัวอย่าง

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนสด ด้วยสารละลาย CTAB โดยใช้ใบอ่อนสดจำนวน 1 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ทำให้เซลล์แตกด้วย CTAB buffer และทำการสกัดโปรตีนและแยกเซลล์ฟิซออกด้วย chloroform : isoamyl (24:1) และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลบริสุทธิ์

3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้

การตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยหลักการที่เบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร และสารละลายดีเอ็นเอที่เข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 ซึ่งสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดดีเอ็นเอทำได้โดยเทียบอัตราส่วนของค่า A_{260} / A_{280}

ดังนี้

$A_{260} / A_{280} > 2.0$ หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ

$2.0 > A_{260} / A_{280} > 1.8$ หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง

$1.8 > A_{260} / A_{280} > 1.65$ หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์

$1.65 > A_{260} / A_{280}$ หมายถึง สารสกัดดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล

สารสกัดดีเอ็นเอที่สามารถใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้จะต้องมีความบริสุทธิ์สูง – บริสุทธิ์ หรือมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วง 1.65 – 2.0

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาจาก *E. grandis* และ *E. urophylla* โดยมีรายละเอียดของแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามตารางผนวกที่ 1 และความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประยุกต์อ้างอิงตามวิธีการของ Brondani *et al.* (1998), Brondani *et al.* (2002) และ Steane *et al.* (2001) ดังนี้

<u>สาร</u>	<u>ความเข้มข้นสุดท้าย</u>
dNTP	0.2 mM
buffer	1 X
MgCl ₂	1.5 mM
forward ไพรเมอร์	0.2 μ M
reverse ไพรเมอร์	0.2 μ M
Taq DNA polymerase	1 U
DNA	20 ng

และใช้โปรแกรมการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นที่ 1	pre-denaturing	96 องศาเซลเซียส	2 นาที
ขั้นที่ 2	denaturing	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 3	annealing	(*) องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 4	extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 5	ย้อนกลับ ขั้นที่ 2 – 4	จำนวน 29 รอบ	
ขั้นที่ 6	final extension	72 องศาเซลเซียส	7 นาที
ขั้นที่ 7	end		

หมายเหตุ ขั้นตอนที่ 3 annealing (*) อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนไปในแต่ละไพรเมอร์

5. การแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

5.1 วิธี silver staining

นำผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้มาแยกความแตกต่างด้วย electrophoresis บน 5% polyacrylamide gel กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate โดยการนำแผ่นกระจกเจลมาแช่ในสารละลายกรดอะซิติก 10% เขย่านาน 30 นาที เพื่อกำจัดยูเรียซึ่งเป็นส่วนผสมใน polyacrylamide gel ออก แล้วเขย่าล้างด้วยน้ำกลั่น (หรือน้ำ deionize) ครั้งละ 2 นาที 3 ครั้ง ย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate (1% silver nitrate, 0.56% formaldehyde) นาน 30 นาที ล้าง silver nitrate ที่เป็นส่วนเกินทิ้งด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3 – 5 วินาที เติม developer (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulphate, 0.56% formaldehyde) โดยเขย่าช้า ๆ จนแถบดีเอ็นเอปรากฏชัด หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติก 10% นานประมาณ 1 นาที ล้างกระจกเจลด้วยการเขย่าในน้ำกลั่นนาน 5 นาที ยกไปวางผึ่งให้แห้งสำหรับอ่านผลต่อไป

5.2 วิธี capillary electrophoresis

คัดเลือกไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ดี ได้ดีจากข้อ 5.1 มาแยกความแตกต่างโดยใช้เครื่อง eGene's HDA-GT12™ genetic analyzer ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ได้ละเอียด (eGene inc., 2006) เพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์น้อย

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

6.1 การให้คะแนนแถบดีเอ็นเอ

6.1.1 สำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS และ โปรแกรม Winboot ให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอในขนาดเดียวกันของแต่ละไพรเมอร์ (สำหรับวิธี capillary

electrophoresis วิเคราะห์จากขนาดที่แตกต่างกันไม่เกิน 3 bp) หากมีแถบดีเอ็นเอให้ตัวเลข 1 หากไม่มีแถบดีเอ็นเอให้ตัวเลข 0 ถ้าหากไม่มีผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ตัวเลข -9

6.1.2 สำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอในขนาดเดียวกันเป็นตัวเลขเดียวกัน เรียงกัน เช่น 1, 2, 3, ... ตั้งแต่ขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ หากไม่มีผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ตัวเลข -9

6.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

6.2.1 ใช้โปรแกรม NTSYS จำนวนค่าความเหมือนกันของตัวอย่างทั้งหมด 45 ตัวอย่าง แล้วสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้จำลองโดยใช้การคำนวณแบบ Jaccard และจัดกลุ่มแบบ UPGMA จำนวนค่า cophenetic ตามขั้นตอนดังนี้

ก. จัดรูปแบบคะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอโดยให้แนว column เป็นตัวอย่าง และแนว row เป็นอัลลีลแถวด้านบนสุดเซลล์แรกกำหนดค่าสำหรับโปรแกรม NTSYS โดยให้ 1 แทนข้อมูลแบบ rectangular เซลล์ที่สองกำหนดจำนวนตัวอย่าง เซลล์ที่สามกำหนดจำนวนอัลลีล เซลล์ที่สี่กำหนด ค่า error แทนด้วย -9 เปิดข้อมูลโดยใช้โปรแกรม NTSYS และบันทึกไฟล์ในนามสกุล nts

ข. วิเคราะห์ค่าความเหมือนกันโดยเลือก dis/similarity เลือก quantitative data เลือก input file ที่บันทึกไว้จากข้อ ก. และตั้งชื่อ output file ในนามสกุล nts เลือกการคำนวณ coefficient แบบ Jaccard กำหนด positive code เป็น 1 และ negative code เป็น 0

ค. สร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองโดยเลือก cluster เลือก SAHN เลือก input file ที่บันทึกไว้จากข้อ ข. และตั้งชื่อ output tree file ในนามสกุล nts เลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ดูผลแผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จากการวิเคราะห์

ง. จำนวนค่า cophenetic โดยเลือก input tree file ที่บันทึกไว้จากข้อ ค. และตั้งชื่อ output cophenetic file ในนามสกุล nts

จ. นำ file ที่ได้จากการคำนวณไปเปิดดูผลใน matrix comp. plot โดยเลือก input file 1 (X) คือ matrix ที่คำนวณจากข้อ ข. และ input file 2 (Y) คือ matrix ที่คำนวณจากข้อ ง. โปรแกรมจะเปรียบเทียบผลที่ได้เป็นกราฟระหว่าง 2 matrixes และ พิจารณาค่า cophenetic ได้จาก report listing

6.2.2 ใช้โปรแกรม Winboot เพื่อคำนวณค่า bootstrap โดยใช้การคำนวณแบบ Jaccard จำนวน 1,000 รอบ ตามขั้นตอนดังนี้

ก. จัดรูปแบบคะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอโดยให้แนว column เป็นอัลลีล และแนว row เป็นตัวอย่าง แถวด้านบนสุด เซลล์แรกกำหนดจำนวนตัวอย่าง เซลล์ที่สองกำหนดจำนวน allele กำหนดให้ค่า error เป็น 0 และบันทึกไฟล์ในนามสกุล txt ที่มีแท็บเป็นตัวคั่น

ข. วิเคราะห์ค่า bootstrap โดยเลือก input file ที่บันทึกไว้จากข้อ ก. และตั้งชื่อ output file ในนามสกุล txt ใช้การคำนวณ coefficient แบบ Jaccard เช่นเดียวกับการใช้โปรแกรม NTSYS โดยกำหนดจำนวนรอบเป็น 1,000 รอบ

ค. พิจารณาค่า bootstrap จากค่าที่ปรากฏในแผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จากการวิเคราะห์ของโปรแกรม

6.2.3 ใช้โปรแกรม STRUCTURE ที่พัฒนาโดย Pritchard *et al.* (2000) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของประชากรว่ามีกลุ่มย่อย (subgroup) หรือไม่ ตามขั้นตอนดังนี้

ก. จัดรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอโดยให้แนว column เป็นไพรเมอร์ (=locus) และแนว row เป็นตัวอย่าง ที่มีการแบ่งกลุ่มของประชากรโดยกลุ่ม 1 แทนตัวอย่างของ *E. camaldulensis* ssp. *simulata*, กลุ่ม 2 แทนตัวอย่างของ *E. camaldulensis* var. *obtusata* และกลุ่ม 3 แทนตัวอย่างที่คัดเลือกในประเทศไทย และตัวอย่างหนึ่งจะใช้สองแถว แถวแรกคือ อัลลีลที่หนึ่ง และแถวที่สองคือ อัลลีลที่สอง ถ้ามีแค่เพียงหนึ่งอัลลีล ให้ถือว่าอีกอัลลีลคืออัลลีลเดียวกัน (Pritchard *et al.*, 2007) และบันทึกไฟล์ในนามสกุล txt ที่มีแท็บเป็นตัวคั่น โดยที่แถวแรกจะใส่เฉพาะชื่อไพรเมอร์ เท่านั้น

ข. สร้าง project ใหม่ ตั้งชื่อ และใช้ input file ที่บันทึกไว้จากข้อ ก.

ค. คำนวณหาค่ากลุ่มย่อย K ที่เหมาะสม ตามวิธีการของ Evanno *et al.* (2005) ตามขั้นตอนดังนี้

1. กำหนดค่า K ที่คาดว่าจะเป็น และเริ่ม run ตั้งแต่ $K = 1$ หรือ 2 จนถึงค่า K ที่คาดว่าจะเป็น และ run เพิ่มอีก 3 K ในที่นี้คาดว่าจะมีค่า $K = 3$ นั่นคือ 1: *E. camaldulensis* ssp. *simulata*, 2: *E. camaldulensis* var. *obtusata* และ 3: *E. camaldulensis* ในประเทศไทย ดังนั้นจำนวน K ที่ต้อง run คือ 1 – 6 และ run ประมาณ 20 ครั้งต่อ K โดยกำหนดค่า burn in และ MCMC เท่ากับ 10,000

2. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean likelihood $L(K)$ กับค่า K โดยให้แกนเอ็กซ์เป็นค่า K และแกนวายเป็นค่า $L(K)$

3. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean difference between successive likelihood value of K คำนวณจาก $L'(K) = L(K) - L(K-1)$ ซึ่งค่าความแตกต่างนี้มีลักษณะเช่นเดียวกันกับขนาดการเปลี่ยนแปลงของค่า likelihood function ที่เกี่ยวข้องกับค่า K โดยให้แกนเอ็กซ์เป็นค่า K และแกนวายเป็นค่า $L'(K)$

4. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absolute value of the difference between successive value of $L'(K)$ คำนวณจาก $[L''(K)] = [L'(K+1) - L'(K)]$ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกันกับอัตราการเปลี่ยนแปลงครั้งที่สองของค่า $L(K)$ ที่เกี่ยวข้องกับค่า K โดยให้แกนเอ็กซ์เป็นค่า K และแกนวายเป็นค่า $[L''(K)]$

5. ประมาณค่า ΔK จากค่า absolute value of $L''(K)$ เฉลี่ยจากการ run ทั้งหมด 20 ครั้ง หาค่าด้วยค่า standard deviation of $L(K)$

6. ค่า K ที่แท้จริงคือค่า ΔK ใน K ที่มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดจากค่า ΔK ใน K อื่น ๆ

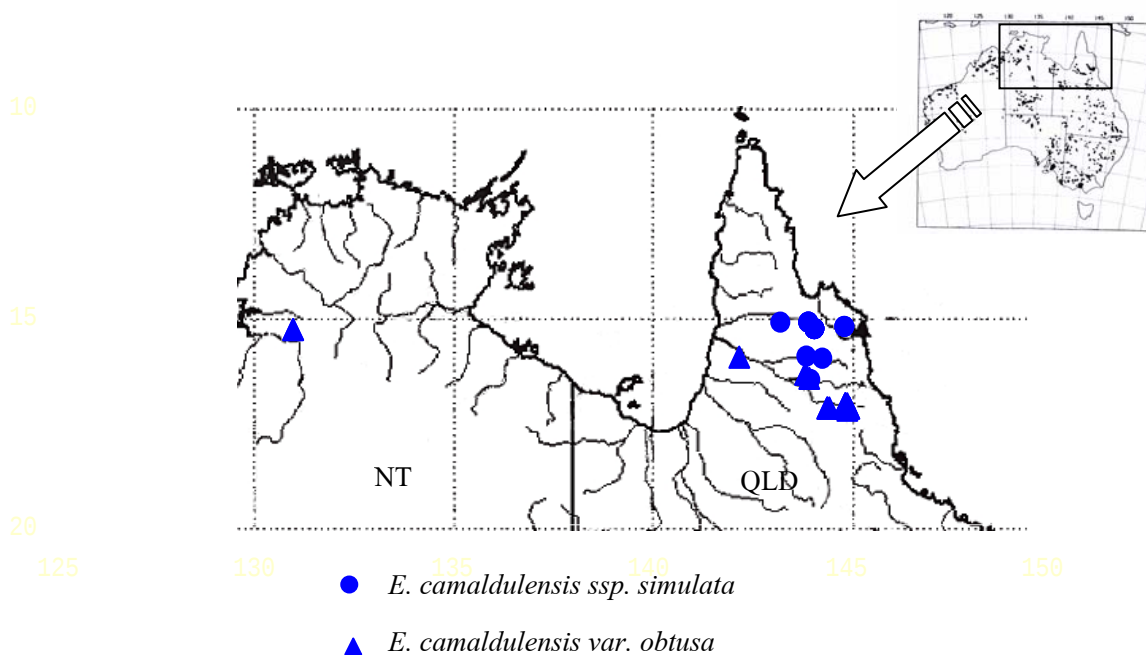
ง. วิเคราะห์ผลโครงสร้างของประชากรโดยวิเคราะห์จากแผนภูมิแท่งหรือ triangle plot ที่ได้จากโปรแกรมใน K ที่แท้จริงที่คำนวณได้จากข้อ ค. โดย run โปรแกรมใหม่ที่มีค่า burn in เท่ากับ 100,000 และ MCMC เท่ากับ 500,000

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการคัดเลือกตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่าง *E. camaldulensis* โดยแบ่งเป็นคัดเลือกจาก *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* กลุ่มละ 20 ตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งได้จากข้อมูลผลการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับอก (DBH : diameter at breast height) ในแปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ โดยที่ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* ที่ศึกษามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.85 – 9.99 เซนติเมตร และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* ที่ศึกษามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.09 – 9.14 เซนติเมตร ถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติ (provenances) เกือบทั้งหมดมาจาก Queensland (QLD) มีเพียงตัวอย่างเดียวที่มาจาก Northern territory (NT) การกระจายของตัวอย่างที่เลือกตามถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติในประเทศออสเตรเลียเป็นดังภาพที่ 4 และคัดเลือกตัวอย่าง *E. camaldulensis* ซึ่งเป็นสายต้นพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกคัดเลือกและพัฒนาภายในประเทศไทย จำนวน 5 ตัวอย่าง รายละเอียดของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและถิ่นกำเนิดของแต่ละตัวอย่าง ดังตารางผนวกที่ 1



ภาพที่ 4 การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของตัวอย่างที่ศึกษา

2. ผลการสกัด วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยเก็บใบอ่อนสดบริเวณปลายยอดของต้นตัวอย่างที่คัดเลือกจากแปลงทดลองดังภาพที่ 5 ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 260 – 9,715 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วง 1.0 – 1.85 แต่มีตัวอย่าง 4.13% ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง และ 24.79% ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ หรืออาจกล่าวได้ว่ามีตัวอย่างที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้เพียง 29.92% จึงแก้ปัญหาด้วยการทดลองคัดเลือกตัวอย่างที่มีค่า A_{260} / A_{280} ต่ำกว่า 1.65 มาทดลองสกัดซ้ำด้วย phenol : chloroform : isoamyl อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ chloroform : isoamyl อัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พบว่าส่วนใหญ่มีผลไม่แตกต่างจากเดิม นอกจากนี้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอยังลดลงเหลือเพียง 20 – 30 % จากเดิม จึงไม่สามารถใช้วิธีการสกัดซ้ำในการแก้ปัญหาได้

ดังนั้นจึงแก้ปัญหาด้วยการทดลองเตรียมตัวอย่างใบอ่อนใหม่ 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 ตัดต้นตัวอย่างที่โคนต้นปล่อยให้แตกหน่อขึ้นมาใหม่ แล้วเก็บใบอ่อนจากหน่อใหม่ที่แตกใหม่นั้นมาทำการสกัดดีเอ็นเอ ดังภาพที่ 6 และวิธีที่ 2 คือ ใช้ต้นตัวอย่างที่ถูกตัดจากแปลง นำมาตัดทอนเป็นท่อนสั้นๆ ท่อนละประมาณหนึ่งเมตรปักชำในโรงเรือนเพาะชำ (greenhouse) พร้อมให้น้ำด้วยระบบพ่นฝอยปล่อยให้แตกยอดขึ้นมาใหม่ แล้วเก็บใบอ่อนจากยอดที่แตกใหม่นั้นมาทำการสกัดดีเอ็นเอ ดังภาพที่ 7 พบว่า

วิธีที่ 1 ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1,165 – 5,960 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วง 1.07 – 1.98 มีตัวอย่าง 26.47% ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง และ 23.53% ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ หรือมีตัวอย่างที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 50%

วิธีที่ 2 ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 180 – 5,195 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วง 1.16 – 3.27 มีตัวอย่าง 64.44% ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง และ 17.78% ได้สารสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ หรือมีตัวอย่างที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 82.22%

ผลการวัดค่า A_{260} / A_{280} ของสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากใบอ่อนจากวิธีการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 8



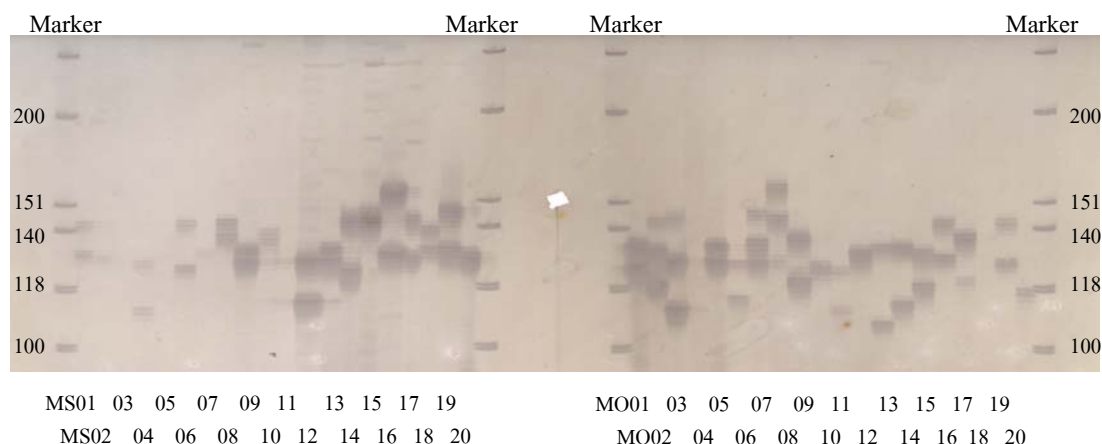
ภาพที่ 5 ลักษณะของใบอ่อนสดบริเวณปลายยอดของต้นตัวอย่างในแปลงทดลอง



ภาพที่ 6 ลักษณะของใบอ่อนสดจากหน่อใหม่ที่แตกในแปลงทดลอง



ภาพที่ 7 ลักษณะของใบอ่อนสดจากกิ่งที่นำมาปักในโรงเรือนเพาะชำ พร้อมให้น้ำด้วยระบบพ่นฝอย

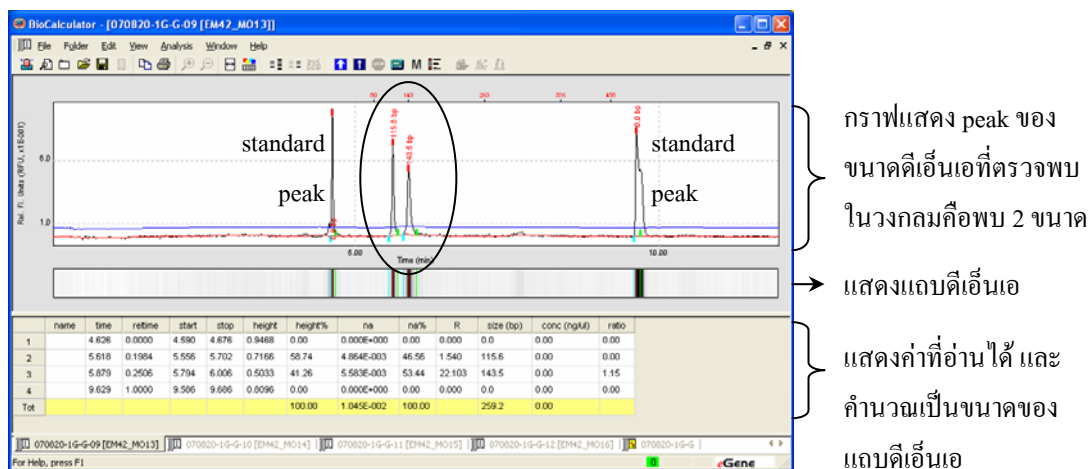


ภาพที่ 9 ตัวอย่างเจลที่แยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

โดยใช้ ไพรมเมอร์ EMBRA42

3.2 วิธี capillary electrophoresis

จากข้อมูลผลการแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining ข้างต้น คัดเลือกเฉพาะไพรมเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้จำนวนตัวอย่างมากกว่า 20 ตัวอย่าง หรือให้แถบดีเอ็นเอที่เห็นชัดเจน จำนวน 17 ไพรมเมอร์ ได้แก่ EMBRA04, EMBRA05, EMBRA06, EMBRA07, EMBRA08, EMBRA09, EMBRA10, EMBRA16, EMBRA17, EMBRA21, EMBRA26, EMBRA27, EMBRA36, EMBRA42, EMBRA53, EMBRA58 และ EMBRA60 นำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง capillary electrophoresis (eGene) พบว่า ในแต่ละไพรมเมอร์มีจำนวนตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากขึ้น โดยสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ต่ำสุด 35 ตัวอย่าง สูงสุดครบทั้ง 40 ตัวอย่าง เฉลี่ย 38.70 ตัวอย่างต่อไพรมเมอร์ (ไม่รวมตัวอย่างในประเทศไทย) จำนวนอัลลีลในแต่ละไพรมเมอร์ตั้งแต่ 13 – 35 อัลลีล เฉลี่ยเท่ากับ 19.7 อัลลีลต่อไพรมเมอร์ ตัวอย่างของ peak ที่ใช้ไพรมเมอร์ EMBRA42 กับ MO13 ดังภาพที่ 10



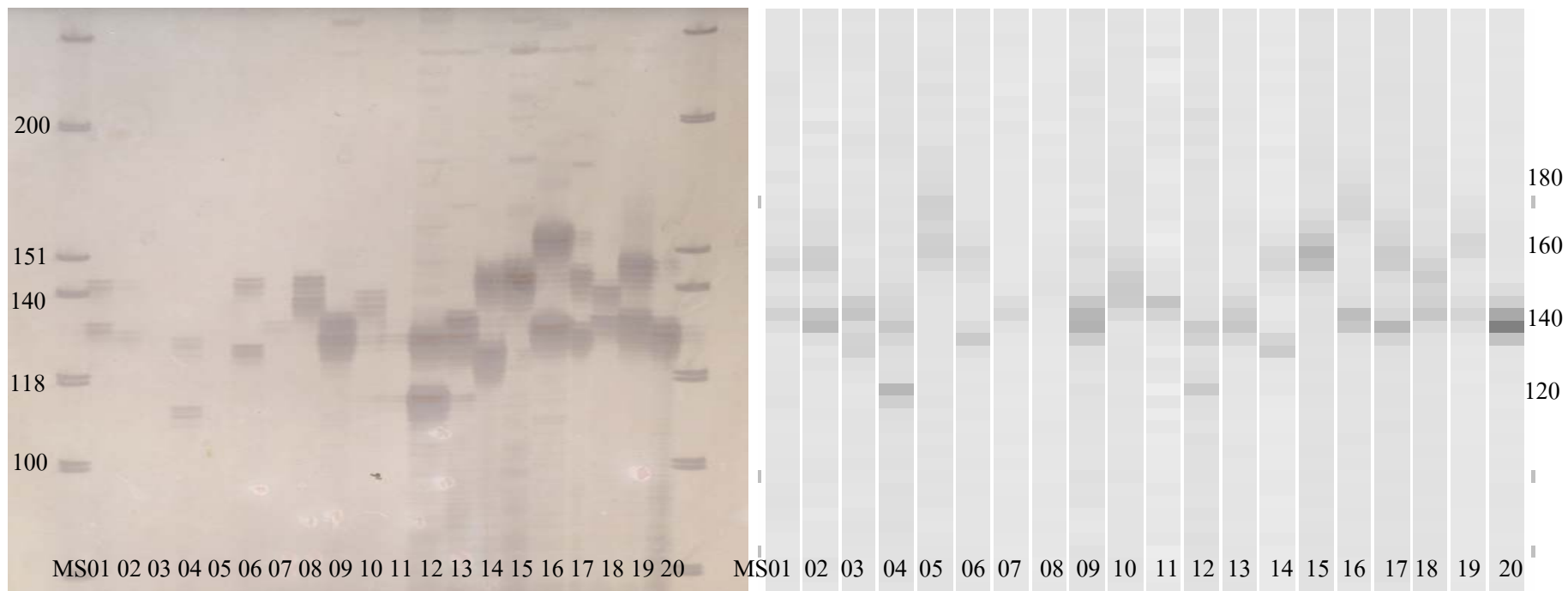
ภาพที่ 10 ตัวอย่างผลการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยวิธี capillary electrophoresis

โดยใช้ ไพรเมอร์ EMBRA42 กับตัวอย่าง MO13

3.3 เปรียบเทียบความแตกต่างของสองวิธี

การปรากฏของแถบดีเอ็นเอและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองวิธีมีความใกล้เคียงกัน ตัวอย่างดังภาพที่ 11 เป็นผลการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ EMBRA42 เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากทั้งสองวิธี

เปอร์เซ็นต์ผลต่างของจำนวนตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ของวิธี capillary electrophoresis เทียบกับวิธี silver staining เพิ่มขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 107.9% และเปอร์เซ็นต์ผลต่างของจำนวนอัลลีล ของวิธี capillary electrophoresis เมื่อเทียบกับวิธี silver staining เพิ่มขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ 50.5% ดังตารางที่ 1



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบผลการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอของตัวอย่าง MS01 – MS20 โดยใช้ไพรเมอร์ EMBRA42 ด้วยวิธี silver staining (ซ้าย) และวิธี capillary electrophoresis (ขวา)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining และ capillary electrophoresis

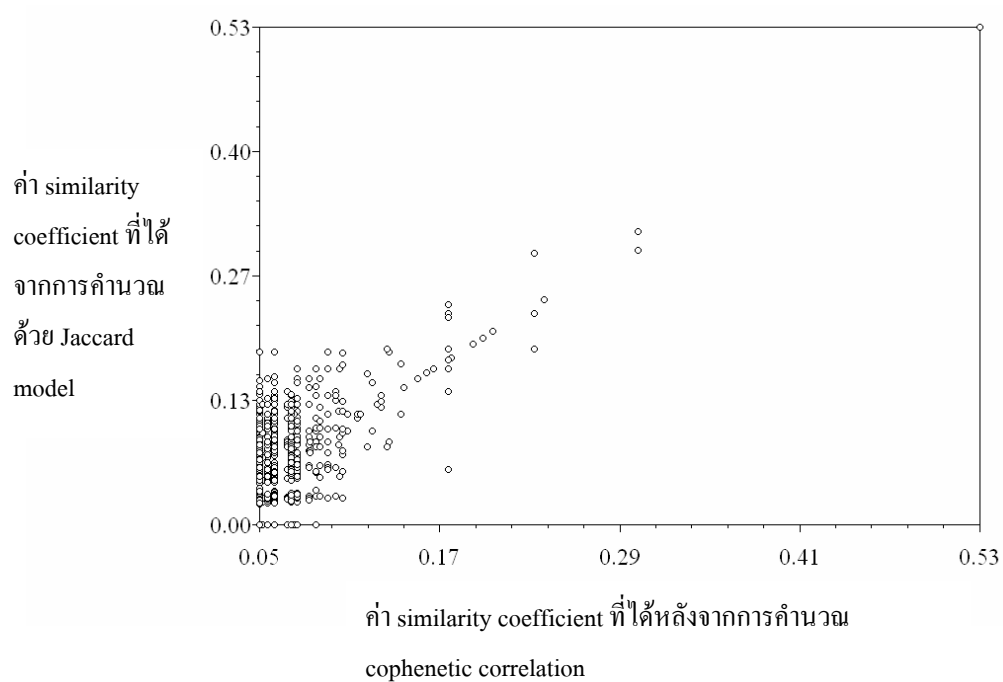
ลำดับ ที่	primer	วิธี silver staining		วิธี capillary electrophoresis		ผลต่าง (%) เมื่อเทียบ กับวิธี silver staining	
		ตัวอย่างที่ เพิ่ม		ตัวอย่างที่ เพิ่ม		ตัวอย่างที่ เพิ่ม	
		จำนวนดีเอ็นเอได้	อัล ลีล	จำนวนดีเอ็นเอได้	อัล ลีล	จำนวนดีเอ็นเอได้	อัล ลีล
1	EMBRA04	25	17	38	18	52.0	5.9
2	EMBRA05	22	20	40	22	81.8	10.0
3	EMBRA06	18	17	40	19	122.2	11.8
4	EMBRA07	10	17	37	18	270.0	5.9
5	EMBRA08	8	9	40	17	400.0	88.9
6	EMBRA09	28	18	40	13	42.9	-27.8
7	EMBRA10	18	20	40	18	122.2	-10.0
8	EMBRA16	25	12	36	24	44.0	100.0
9	EMBRA17	35	19	40	33	14.3	73.7
10	EMBRA21	22	10	40	13	81.8	30.0
11	EMBRA26	21	17	39	17	85.7	0.0
12	EMBRA27	21	17	39	14	85.7	-17.6
13	EMBRA36	23	16	39	18	69.6	12.5
14	EMBRA42	35	26	40	19	14.3	-26.9
15	EMBRA53	33	11	38	15	15.2	36.4
16	EMBRA58	29	12	35	22	20.7	83.3
17	EMBRA60	9	6	37	35	311.1	483.3

เลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่มีจำนวนอัลลีล 1 – 2 อัลลีลต่อตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูล
ได้จำนวน 12 ไพรเมอร์ คือ EMBRA04, EMBRA05, EMBRA06, EMBRA07, EMBRA08,
EMBRA10, EMBRA16, EMBRA21, EMBRA26, EMBRA27, EMBRA36 และ EMBRA42

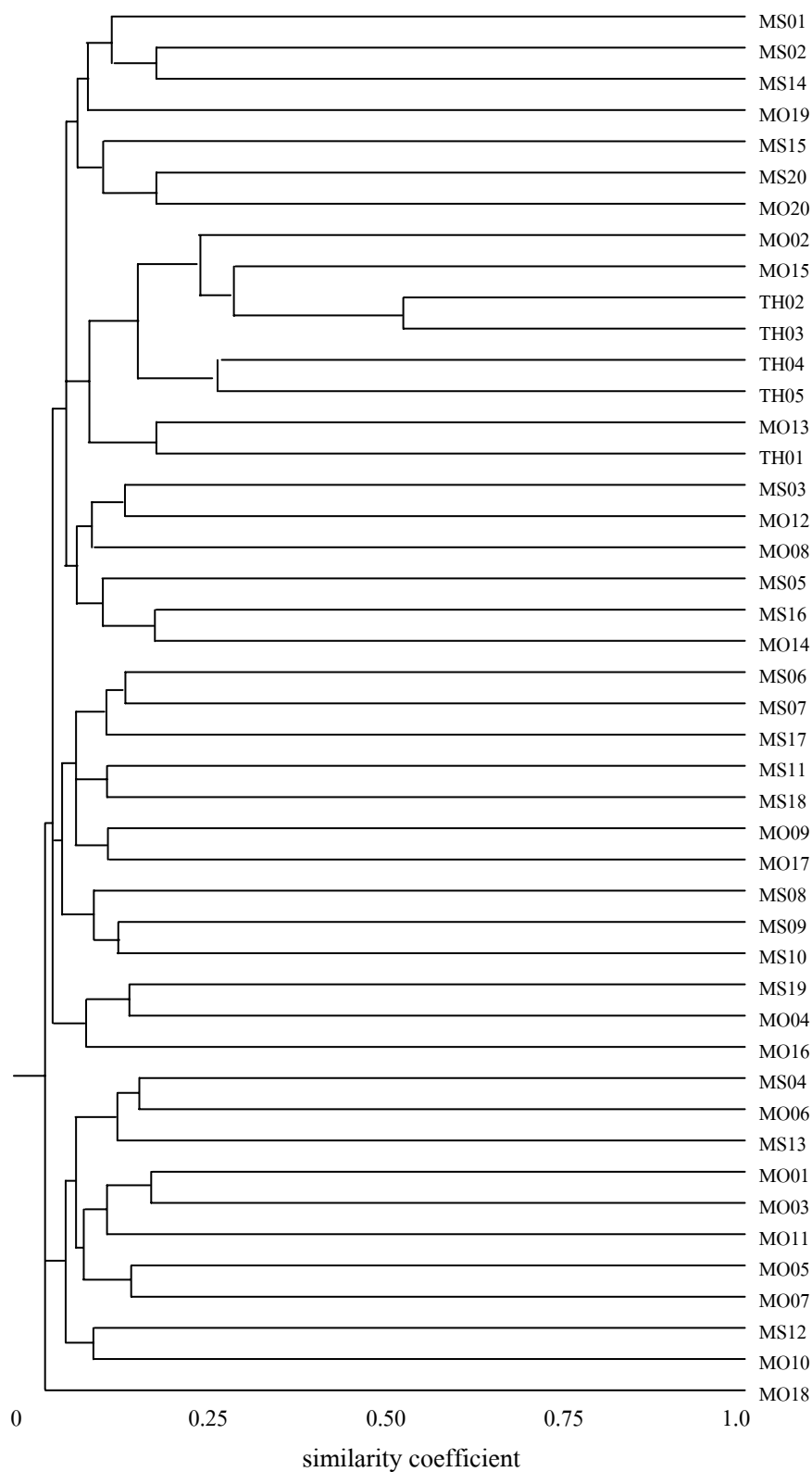
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYS

จากการคำนวณค่าความเหมือนกันของตัวอย่างทั้งหมด 45 ตัวอย่าง โดยใช้การคำนวณแบบ Jaccard model และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA และสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้จำลองและคำนวณค่า cophenetic correlation พบว่ามีค่า 0.64 ซึ่งต่ำมาก ดังภาพที่ 12 แสดงว่าจัดกลุ่มได้ไม่ดี แต่ค่า similarity coefficient อยู่ในช่วง 0.05 – 0.53 แสดงว่าตัวอย่างมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก ดังภาพที่ 13



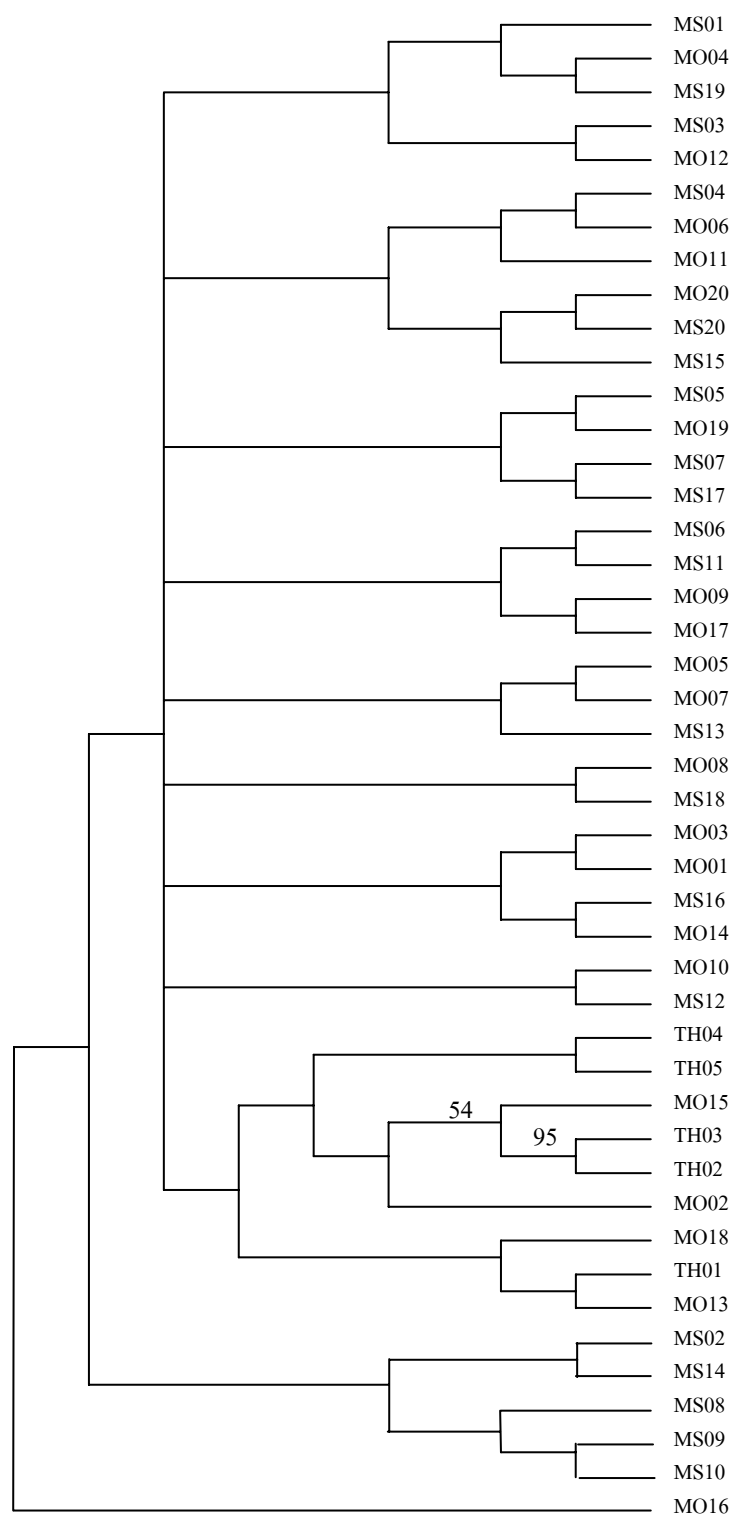
ภาพที่ 12 matrix comparison ระหว่างการคำนวณครั้งแรกด้วย Jaccard และหลังการคำนวณ cophenetic correlation



ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้จำลองที่ได้จากการคำนวณแบบ Jaccard model และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS

4.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Winboot

คำนวณค่า bootstrap โดยใช้การคำนวณแบบ Jaccard จำนวน 1,000 รอบ แล้วสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้จำลองแบบ consensus พบว่า ส่วนใหญ่มีค่า bootstrap ต่ำกว่า 50% มีเพียงสองกลุ่มที่มีค่า bootstrap สูงกว่า 50% ได้แก่ กลุ่มของ CT03 และ CT04 ที่มีค่า bootstrap 95% และ (CT03, CT04) และ MO15 ที่มีค่า bootstrap 54% ดังภาพที่ 12

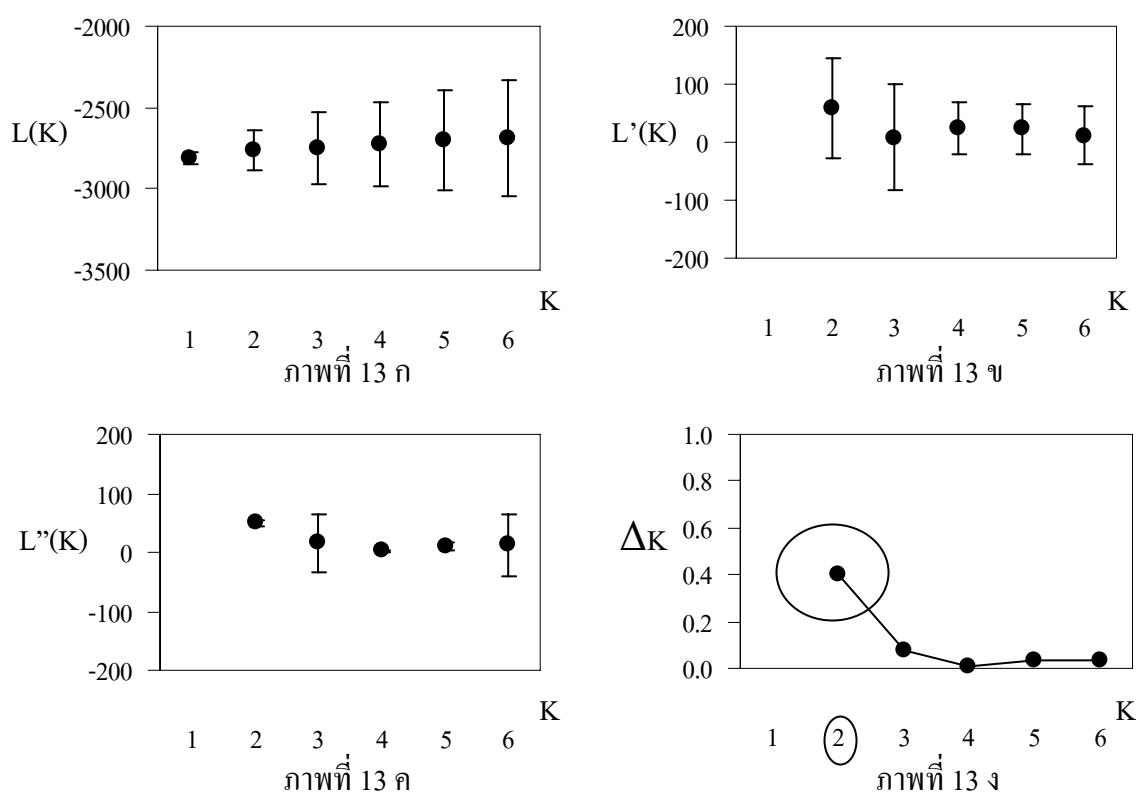


ภาพที่ 14 แผนภูมิต้นไม้จำลองแบบ consensus ที่ได้จากการคำนวณแบบ Jaccard model และค่า bootstrap แสดงเฉพาะค่าที่มากกว่า 50% ด้วยโปรแกรม Winboot

4.3 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE

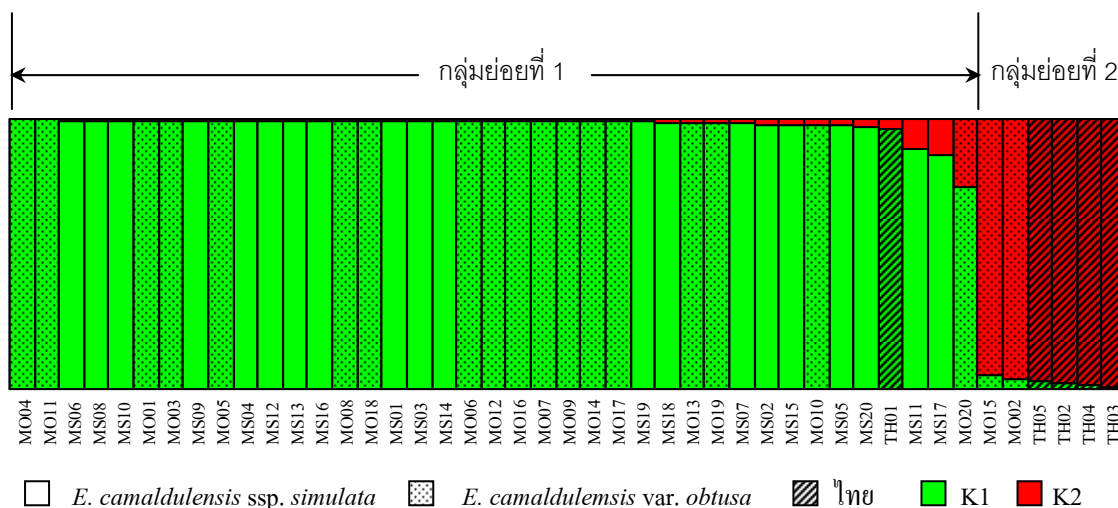
4.3.1 วิเคราะห์จำนวนกลุ่มย่อย (ซึ่งแทนด้วย K) ที่แท้จริง

คำนวณค่า K ที่แท้จริงโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า K ในแกน X และค่า mean likelihood $L(K)$ ในแกน Y (ภาพที่ 15 ก) แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean difference between successive likelihood value of K ที่คำนวณจาก $L'(K) = L(K) - L(K-1)$ ซึ่งค่าความแตกต่างนี้มีลักษณะเช่นเดียวกันกับขนาดการเปลี่ยนแปลงของค่า likelihood function ที่เกี่ยวข้องกับค่า K (ภาพที่ 15 ข) แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absolute value of the difference between successive value of $L'(K)$ คำนวณจาก $[L''(K)] = [L'(K+1) - L'(K)]$ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกันกับอัตราการเปลี่ยนแปลงครั้งที่สองของค่า $L(K)$ ที่เกี่ยวข้องกับค่า K (ภาพที่ 15 ค) ประมาณค่า ΔK จากค่า absolute value of $L''(K)$ เฉลี่ยจากการทำงานของโปรแกรมทั้งหมด 20 ครั้ง หาค่าด้วยค่า standard deviation of $L(K)$ และค่า K ที่แท้จริงคือค่า ΔK ใน K ที่มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดจากค่า ΔK ใน K อื่น ๆ ในที่นี้คือ $K = 2$ (ดังแสดงในวงกลมภาพที่ 15 ง)



ภาพที่ 15 กราฟแสดงการคำนวณค่ากลุ่มย่อยหรือค่า K ที่แท้จริง

4.3.2 ผลการวิเคราะห์โดยใช้ค่า K ที่แท้จริง คือ K = 2 ใช้ burn in เท่ากับ 100,000 และ MCMC เท่ากับ 500,000 แสดงด้วยแผนภูมิแท่ง ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แผนภูมิแท่งประยุกต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มย่อย

ก. สามารถแบ่งแยกประชากรออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมและสามารถจับคู่ผสมระหว่างกลุ่มกันสำหรับใช้ใน nucleus breeding strategy ได้คือ

กลุ่มย่อยที่ 1 กลุ่มที่มีแถบสีเขียวเป็นหลัก ซึ่งประกอบด้วย

E. camaldulensis ssp. simulata จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่ MS01, MS02, MS03, MS04, MS05, MS06, MS07, MS08, MS09, MS10, MS11, MS12, MS13, MS14, MS15, MS16, MS17, MS18, MS19 และ MS20

E. camaldulensis var. obtusa จำนวน 18 ตัวอย่าง ได้แก่ MO01, MO03, MO04, MO05, MO06, MO07, MO08, MO09, MO10, MO11, MO12, MO13, MO14, MO16, MO17, MO18, MO19 และ MO20

สายต้นจากประเทศไทย จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ TH01

โดยที่กลุ่มที่ 1 นี้มีค่า expected heterozygosity ระหว่างแต่ละต้นภายในกลุ่ม ประมาณ 68%

กลุ่มย่อยที่ 2 กลุ่มที่มีแถบสีแดงเป็นหลัก ซึ่งประกอบด้วย

E. camaldulensis var. *obtusa* จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ MO02 และ MO15

สายต้นจากประเทศไทย จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ TH02, TH03, TH04

และ TH05

โดยที่กลุ่มที่ 2 นี้มีค่า expected heterozygosity ระหว่างแต่ละต้นภายในกลุ่ม ประมาณ 22%

ข. สำหรับ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* มีโครงสร้างของประชากรคล้ายคลึงกัน จึงเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในเบื้องต้นได้ว่า สามารถสร้างเป็นประชากรเดียวได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในตัวอย่างต่างชนิดกัน เช่น การจัดแบ่งกลุ่มระหว่าง *E. grandis* และ *E. urophylla* สามารถแบ่งกลุ่มตามชนิดได้อย่างชัดเจน (Muro-Abad *et al.*, 2005)

4.3.3 ไพรมอร์ที่บ่งชี้ได้อย่างชัดเจนถึงการแยกกลุ่ม โดยพิจารณาจากค่าความแตกต่างของ allele frequency ระหว่างสองกลุ่ม ได้แก่

	allele frequency	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2
EMBRA04	อัลลีลที่ 12	0.610	0.077
EMBRA05	อัลลีลที่ 5	0.415	0.070
	อัลลีลที่ 10	0.140	0.039
	อัลลีลที่ 11	0.135	0.039
EMBRA07	อัลลีลที่ 3	0.358	0.096
	อัลลีลที่ 8	0.152	0.040
EMBRA08	อัลลีลที่ 12	0.268	0.062
	อัลลีลที่ 14	0.229	0.036
EMBRA09	อัลลีลที่ 10	0.323	0.075
EMBRA10	อัลลีลที่ 5	0.353	0.069
	อัลลีลที่ 13	0.131	0.030
	อัลลีลที่ 15	0.140	0.060
EMBRA16	อัลลีลที่ 3	0.166	0.026

EMBRA21	อัลลีลที่ 10	0.240	0.082
	อัลลีลที่ 11	0.517	0.044
EMBRA26	อัลลีลที่ 9	0.520	0.122
	อัลลีลที่ 8	0.266	0.031
EMBRA27	อัลลีลที่ 7	0.271	0.066
	อัลลีลที่ 8	0.346	0.041

วิจารณ์

1. การคัดเลือกตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่างโดยคัดต้นที่มีการเจริญเติบโตมากที่สุดของประชากรหลัก เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับ nucleus population ดังนั้นจึงมีหลายตัวอย่างที่มาจากถิ่นกำเนิดเดียวกัน ต่างกันที่ตระกูลของตัวอย่าง แต่ผลการวิเคราะห์ก็ยังพบว่า ตัวอย่างที่มาจากถิ่นกำเนิดเดียวกัน ยังมีค่า similarity coefficient ต่ำมาก นั่นคือ มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมสูงมาก (Butcher *et al.*, 2001) ดังนั้น จึงพอจะประเมินในเบื้องต้นว่า ในแต่ละตระกูลมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก จนสามารถปล่อยให้เกิดการผสมพันธุ์โดยสุ่มได้

2. การสกัด วัดความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างที่มาของตัวอย่างใบอ่อนที่แตกต่างกัน จากภาพที่ 8 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ที่สามารถใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ของตัวอย่างที่สกัดจากใบอ่อนสดบริเวณปลายยอดของต้นตัวอย่างที่คัดเลือกจากแปลง จะน้อยกว่าใบอ่อนจากหน่อใหม่ที่แตกในแปลง ทดลอง และน้อยกว่าใบอ่อนจากกิ่งที่นำมาปักชำในโรงเรือนเพาะชำพร้อมให้น้ำด้วยระบบพ่นฝอยตามลำดับ ซึ่งทั้งนี้เนื่องจากใบอ่อนที่แตกออกมาจากกิ่งที่นำมาปักชำในโรงเรือนจะอยู่ในที่ร่ม มีแสงรำไร มีความอวบน้ำสูง ใบจะนิ่ม เหนียวง่าย ดังนั้นการสะสมสารพวกฟีนอลิก คอมปาวด์ ยังน่าจะน้อยอยู่ ผลการสกัดดีเอ็นเอจึงดีที่สุด

ผลการทดลองจากการสกัดซ้ำพบว่าไม่ได้ช่วยให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากขึ้น และยังลดความเข้มข้นของดีเอ็นเอลงอีกด้วย ดังนั้นควรเตรียมตัวอย่างไบออนโดยใช้วิธีปักชำกิ่งในโรงเรือนและให้น้ำด้วยระบบฟ้นฝอยจะให้ผลดีกว่า

3. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ

3.1 วิธี silver staining

พบปัญหาว่าบางตัวอย่างมีแถบเกิดขึ้นแต่จางมาก จนบางครั้งไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นแถบดีเอ็นเอของผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์หรือไม่ ทำให้ไม่สามารถให้คะแนนได้ จึงทำให้ข้อมูลสูญหายจำนวนมาก และตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ บางครั้งตัดสินใจได้ยากว่าอยู่ในตำแหน่งเดียวกันหรือไม่ ทำให้ค่าจำนวนอัลลีลที่อ่านได้คลาดเคลื่อนไป วิธีนี้จึงไม่เหมาะกับการศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนอัลลีลมากและมีอัลลีลขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้เทคนิคและความชำนาญในการปฏิบัติมาก และมีสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติ (eGene. inc., 2007)

3.2 วิธี capillary electrophoresis

เป็นวิธีที่สะดวกเร็ว ได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ สามารถแยกความแตกต่างได้ประมาณ 1 – 5 คู่เบส สามารถวิเคราะห์ผลได้แม้ว่าจะมีผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์น้อยมากก็ตาม ประมาณ 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

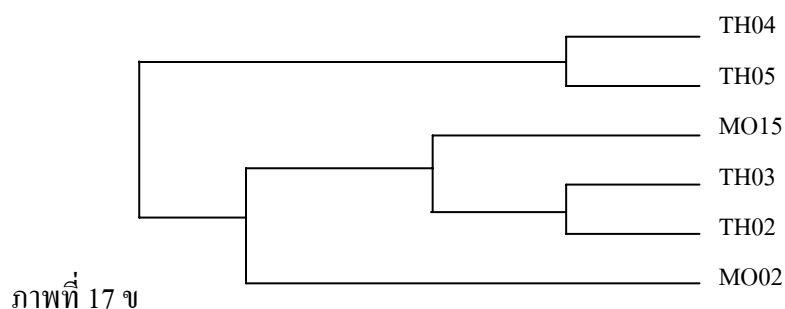
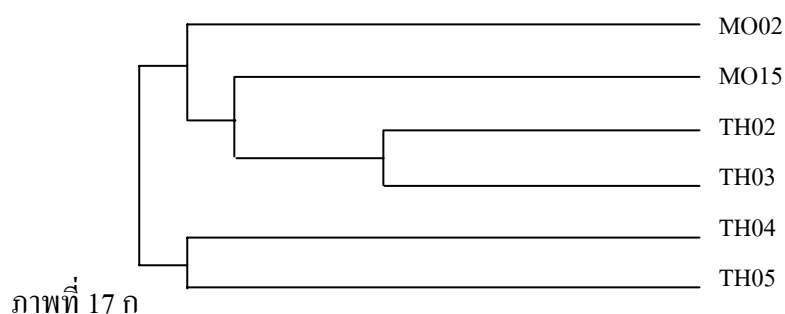
ดังนั้นจึงเหมาะกับสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนอัลลีลมากและในแต่ละอัลลีลมีขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก ไม่ต้องใช้เทคนิคและความชำนาญของผู้ปฏิบัติ ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติ เนื่องจากสารเคมีต่าง ๆ เช่น เจล สีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ ถูกบรรจุอยู่ใน capillary tube ซึ่งอยู่ใน cartridge อีกทีหนึ่ง นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยมากประมาณ 0.5 – 2 ชั่วโมงต่อ 96 ตัวอย่าง (eGene. inc., 2007)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS และ Winboot

การสร้างแผนภูมิต้นไม้จำลองด้วยโปรแกรม NTSYS และ Winboot จะมีลักษณะการให้คะแนนแบบ 1,0 (binary data) เหมือนกันทั้งสองโปรแกรม ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYS สามารถบอกได้ว่าตัวอย่างที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก (ค่า similarity coefficient อยู่ในช่วง 0.05 – 0.53) แต่ทั้งสองโปรแกรมแสดงผลการจัดกลุ่มจัดได้ไม่ดี เช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การให้คะแนนแบบ 1,0 เป็นการให้คะแนนแบบที่เหมาะสมกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น dominant markers เช่น RAPD (Yap and Nelson, 1996) มากกว่า co-dominant markers เช่น เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

แต่อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันจากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE โดยเฉพาะในกลุ่มที่ 2 ซึ่งมี 6 ตัวอย่าง ได้แก่ MO02, MO15, TH02, TH03, TH04 และ TH04 ก็ยังคงถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความใกล้เคียงกันเมื่อสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้จำลองด้วยทั้งสองโปรแกรม (ภาพที่ 17) แต่ตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้จำลองของตัวอย่างอื่นๆ มีความแตกต่างกันระหว่างสองโปรแกรม ดังนั้น จึงไม่เหมาะที่จะใช้ข้อมูลแบบ binary data ในการอธิบายความหลากหลายทางพันธุกรรมของยุคาลิปดัสที่ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์



ภาพที่ 17 กลุ่มตัวอย่างที่สองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS (ก) และ โปรแกรม Winboot (ข) พบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

4.2 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE

ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE จะมีการให้คะแนนแบบแยกเป็นสองอัลลีล ซึ่งน่าจะเหมาะสมสำหรับการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Pritchard *et al.*, 2007) สำหรับยูคาลิปตัส เนื่องจากยูคาลิปตัสเป็นพืชที่มีจำนวนโครโมโซมสองชุด (diploid) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ co-dominant marker ดังนั้นการให้คะแนนเป็นสองอัลลีล แสดงความเป็น co-dominant ได้ดี และสามารถอธิบายได้ดีที่สุดสำหรับยูคาลิปตัสที่ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ นอกจากนี้โปรแกรม STRUCTURE แสดงผลออกมาเป็นแผนภูมิแท่งซึ่งสามารถมองเห็นได้ชัดเจนถึงกลุ่มที่มีความแตกต่างกัน

5. ประโยชน์ที่ได้รับอื่นๆ

นอกจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยูคาลิปตัส ยังนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ได้ เช่น

5.1 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแต่ละไพรเมอร์ในแต่ละตัวอย่างสามารถใช้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่งนั้นๆ ได้ ซึ่งจะสามารถใช้ประกอบการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืชได้ (Rocha *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบย้อนกลับไปถึงพ่อแม่พันธุ์ได้ด้วย (Grattapaglia *et al.*, 2004; Kirst *et al.*, 2005)

5.2 สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสร้างแผนที่ดีเอ็นเอและจีโนม การติดตามและค้นหา ยีน ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้ เช่น EMBRA05 และ EMBRA09 เป็นไพรเมอร์ที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการออกดอก ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์และการถ่ายยีน EMBRA07 เป็นไพรเมอร์ที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็น

ลักษณะที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับเปอร์เซ็นต์เยื่อ (Brondani *et al.*, 2006; Myburg *et al.*, 2007; Pijut *et al.*, 2007) นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับยูคาลิปตัสยังคงมีการเผยแพร่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ ดีเอ็นเอที่มีความละเอียดมากขึ้น (Steane *et al.*, 2005)

5.3 สามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ป่าไม้ เพื่อการอนุรักษ์ หรือการปรับปรุงพันธุ์ได้อีก อาทิเช่น การติดตาม gene flow ในประชากรตามธรรมชาติและแปลงปลูก ผลของการปลูกเลี้ยงโดยมนุษย์ (domestication) ที่มีต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม (Jones *et al.*, 2006) การจัดการแปลงเก็บเมล็ดพันธุ์ การกำหนดคู่ผสมสำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ขั้นสูง (Liewlaksaneeyanawin, 2006)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *E. camaldulensis* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ สรุปได้ดังนี้

1. เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยโปรแกรม STRUCTURE สามารถแบ่งแยกประชากรออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม และสามารถจับคู่ผสมระหว่างกลุ่มย่อยกัน สำหรับใช้ใน nucleus breeding strategy ได้ คือ

กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย

E. camaldulensis ssp. *simulata* ได้แก่ MS01, MS02, MS03, MS04, MS05, MS06, MS07, MS08, MS09, MS10, MS11, MS12, MS13, MS14, MS15, MS16, MS17, MS18, MS19 และ MS20

E. camaldulensis var. *obtusa* ได้แก่ MO01, MO03, MO04, MO05, MO06, MO07, MO08, MO09, MO10, MO11, MO12, MO13, MO14, MO16, MO17, MO18, MO19 และ MO20

สายต้นจากประเทศไทย ได้แก่ TH01

กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย

E. camaldulensis var. *obtusa* ได้แก่ MO02 และ MO15

และสายต้นจากประเทศไทย ได้แก่ TH02, TH03, TH04, TH05

2. สำหรับ *E. camaldulensis* ssp. *simulata* และ *E. camaldulensis* var. *obtusa* มีโครงสร้างของประชากรส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน จึงเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจเบื้องต้นได้ว่า สามารถสร้างเป็นประชากรเดียวได้ ซึ่งจะสามารถปลูกในพื้นที่เดียวกันได้โดยไม่ต้องมี buffer zone

ข้อเสนอแนะ

1. ในการสกัดดีเอ็นเอของยูคาลิปตัสควรใช้วิธีการเตรียมใบอ่อนด้วยการเก็บกิ่งมาปักชำในโรงเรือนเพาะชำพร้อมให้น้ำด้วยระบบพ่นฝอยเพื่อให้แตกยอดใหม่ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอจะให้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง

2. การแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยใช้วิธี capillary electrophoresis จะให้ผลที่มีความแม่นยำถูกต้อง สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องใช้เทคนิคและความชำนาญ และไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติ เหมาะกับผู้ที่ศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนอัลลีลมาก และมีความแตกต่างของแต่ละอัลลีลไม่มากนัก

3. สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE จะเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมที่สุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2549. พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วหรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภาควิชาพันธุศาสตร์. 2550. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากข้อมูลทางโมเลกุล. (เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ). ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุธีร์ ดวงใจ. 2543. การตรวจสอบพันธุกรรมของยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส (*EUCALYPTUS CAMALDULENSIS* DEHNH.) ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอลพี. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Anonymous. n.d. viridans images plant. Available Source: <http://www.viridans.com/plpics/htm/>, September 5, 2006.
- 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.
- _____, _____, R. Tarchini á and D. Grattapaglia. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *E. grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet.** 97: 816-827.

- _____, E.M. Williams, 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 Biology**. 20 (6): 16 p.
- Butcher P.A., A. Otero, M.W. McDonald and G.F. Moran. 2002. Nuclear RFLP variation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from northern Australia. **Heredity**. 88: 402-412.
- Byrne, M. á, J.C. Murrell á, J.V. Owen, E.R. Williams á. and G.F. Moran. 1997. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. **Theor. Appl. Genet.** 95: 975-979.
- Cotterill, P.P. 1989. Nucleus breeding system. General session: Advanced generation breeding strategy, pp. 36-42. *In* **Southern Forest Tree Improvement Conference 20. ed.**
- _____ and S. McRae. 1997. Improving *Eucalyptus* pulp and paper quality using genetic selection and good organization. **TAPPI** 80 (6): 82-89.
- CSIRO. n.d. *Eucalyptus camaldulensis* var. *camaldulensis*. Factsheet - *Eucalyptus camaldulensis* var. *camaldulensis*. Available Source:
http://www.publish.csiro.au/samples/euclidsample/html/Eucalyptus_camaldulensis_var._camaldulensis.htm, June 27, 2007.
- 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. Genomic**. 2: 30-38.
- eGene. inc. 2006. **HDA-GT12™ system user's guide**. (Manual). eGene. inc., USA.
- Eldridge, K., J. Davidson, C. Harwood and G.V. Wyk. 1993. ***Eucalyptus* domestication and breeding**. 1 ed. Oxford University Press inc., New York.

- Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol. Ecol.** 14: 2611-2620.
- 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.
- Jones, T.H., D.A. Steane, R.C. Jones, D. Pilbeam, R.E. Vaillancourt and B.M. Potts. 2006. Effects of domestication on genetic diversity in *Eucalyptus globulus*. **For. Ecol. Manage.** 234: 78-84.
- Junghans, D.T., A.C. Alfenas, S.H. Brommonschenkel, S. Oda, E.J. Mello and D. Grattapaglia. 2003. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of major gene with RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.** 108: 175-180.
- Kirst, M., C.M. Cordeiro, G.D.S.P. Rezende and D. Grattapaglia. 2005. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **J. Heredity.** 96 (2): 161-166.
- Li, Y., J. Chagarro and R. Teasdale. n.d. Detection of QTL for wood production in *Eucalyptus globulus* using maternal half-sib families and RAPD markers. **For Bio. Research Pty. Ltd.** 4 p.
- Liewlaksaneyanawin, C. 2006. **Genetic evaluation of natural and domesticated Logepole pine populations using molecular markers.** Ph.D. thesis, The University of British Columbia.

- MacRae, S. and P.P. Cotterill. 2000. Application of biotechnology in hybrid breeding, pp. 48-52. *In* H.S Dungey., M.J. Dieters and D.G. Nikles, eds. **QFRI/CRC-SPF Symposium**. Department of Primary Industries Brisbane, Noosa Queensland Australia.
- Marques, C.M., J.A. Araújo, J.G. Ferreira, R. Whetten, D.M. Omalley, B.H. Liu and R. Sederoff. 1998. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theor. Appl. Genet.** 96: 727-737.
- _____, R.P.V. Brondani, D. Grattapaglia and R. Sederoff. 2002. Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. **Theor Appl Genet.** 105: 474-478.
- Missiaggia, A.A., A.L. Piacuzzi and D. Grattapaglia. 2005. Genetic mapping of *Eef1*, a major QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. **Tree Genet. Genomic.** 1: 79-84.
- Moran, G.F., K.A. Thamarus, C.A. Raymond, D. Qiu, T. Uren and S.G. Southerton. 2002. Genomics of *Eucalyptus* wood traits. **Ann. For. Sci.** 59: 645-650.
- Muro-Abad, J.I., R.B. Rocha, C.D. Cruz and E.F. Araújo. 2005. Obtainment of *Eucalyptus* spp. hybrids aided by molecular markers - SSR analysis. **Scientia Forestalis.** 67: 53-63.
- Myburg, A.A., A.R. Griffin, R.R. Sederoff and R.W. Whetten. 2003. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theor. Appl. Genet.** 107: 1028-1042.
- _____, B.M. Potts, C.M. Marques, M. Kirst, J.M. Gion, D. Grattapaglia and J.G. Pettenatti. 2007. Eucalypts, pp. 115-160. *In* C. Kole, ed. **Genome mapping and molecular breeding in plants, volume 7**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Nei, M. and S. Kumar. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. 1 ed. Oxford university press.
- Pijut, P.M., K.E. Woeste, G. Vengadesan and C.H. Michler. 2007. Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**. 43: 283-303.
- Poke, F.S., R.E. Vaillancourt, B.M. Potts and J.B. Reid. 2005. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica** 125: 79-101.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genet. Soc. Amer.** 155: 945-959.
- _____, X. Wen and D. Falush. 2007. **Documentation for STRUCTURE software: version 2.2**. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>. 36 p.
- Rocha, R.B., J.I. Muro-Abad, I.E. Pires and E.F. Araújo. 2002. Fingerprint and genetic diversity analysis of *Eucalyptus* spp. genotypes using RAPD and SSR markers. **Scientia Forestalis** 62: 24-31.
- Smith, S., J. Hughes and G. Wardell-Johnson. 2003. High population differentiation and extensive clonality in a rare mallee eucalypt: *Eucalyptus curtisii*. **Conservation Genet.** 4: 289-300.
- Steane, D.A., 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): 89-91.
- _____, R.C. Jones and R.E. Vaillancourt. 2005. A set of chloroplast microsatellite primers for *Eucalyptus* (Myrtaceae). **Mol. Ecol. Notes**. 5: 538-541.

- Thamarus, K., K. Groom, A. Bradley, C.A. Raymond, L.R. Schimleck, E.R. Williams and G.F. Moran. 2004. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. **Theor. Appl. Genet.** 109: 856-864.
- _____, K. Groom, J. Murrell, M. Byrne and G.F. Moran. 2002. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre and floral traits. **Theor. Appl. Genet.** 104: 379-387.
- Verhaegen, á D., C. Plomion á, J.M. Gion, M. Poitel á, P. Costa á and A. Kremer. 1997. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. **Theor. Appl. Genet.** 95: 597-608.
- Yap, I.V. and R.J. Nelson. 1996. **Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogram.** (Manual). IRRI International Rice Research Institute, Philippines.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 รายละเอียดของตัวอย่างที่ศึกษา

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ถิ่นกำเนิด (provenances)	DBH* (cm)	latitude		longitude		altitude (m)
				deg.	min.	deg.	min.	
<i>E. camaldulensis</i> ssp. <i>simulata</i>								
1	MS01	LAURA RIVER QLD	9.99	15	34	144	28	100
2	MS02	LAURA RIVER QLD	9.99	15	34	144	28	100
3	MS03	LAURA RIVER QLD	9.87	15	34	144	28	100
4	MS04	MOREHEAD RIVER QLD	9.84	15	2	143	40	50
5	MS05	LAURA RIVER QLD	9.68	15	34	144	28	100
6	MS06	KENNEDY RIVER QLD	9.61	15	22	144	10	100
7	MS07	LAURA RIVER QLD	9.45	15	34	144	28	100
8	MS08	KENNEDY RIVER QLD	9.39	15	22	144	10	100
9	MS09	LAURA RIVER QLD	9.33	15	34	144	28	100
10	MS10	LAURA RIVER QLD	9.29	15	34	144	28	100
11	MS11	KENNEDY RIVER QLD	9.23	15	22	144	10	100
12	MS12	WALSH R NR ROOKWOOD QLD	9.17	16	59	144	18	240
13	MS13	LAURA RIVER QLD	9.17	15	34	144	28	100
14	MS14	LAURA RIVER QLD	9.14	15	34	144	28	100
15	MS15	NORMANBY RIVER QLD	9.14	15	31	145	0	80
16	MS16	NORMANBY RIVER QLD	9.10	15	31	145	0	80
17	MS17	LAURA RIVER QLD	9.01	15	34	144	28	100
18	MS18	PALMER R, PALMERVILLE QLD	8.91	16	0	144	5	400
19	MS19	PALMER RIVER QLD	8.91	16	6	144	46	110
20	MS20	LAURA RIVER QLD	8.85	15	34	144	28	100
<i>E. camaldulensis</i> var. <i>obtusata</i>								
21	MO01	WLEAFGOLD NE PETFORD QLD	9.14	17	12	145	1	460
22	MO02	HALES SIDING E PETFORD QLD	9.10	17	22	145	12	780
23	MO03	E'BETHCK E WROTHAM PK QLD	9.10	16	40	144	1	175
24	MO04	PETFORD AREA QLD	9.04	17	24	145	2	590
25	MO05	MURPHYSCK NE PETFORD QLD	8.98	17	17	145	3	500
26	MO06	EMU CK E PETFORD QLD	8.98	17	21	144	57	460
27	MO07	E'BETHCK E WROTHAM PK QLD	8.75	16	40	144	1	175
28	MO08	SW OF DIMBULAH QLD	8.69	17	11	145	3	460

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ถิ่นกำเนิด (provenances)	DBH* (cm)	latitude		longitude		altitude (m)
				deg.	min.	deg.	min.	
29	MO09	EMU CK E PETFORD QLD	8.66	17	21	144	57	460
30	MO10	CHINAMANS CK ESE PETFORD QLD	8.66	17	24	145	10	680
31	MO11	CARBONATE CK NE PETFORD QLD	8.63	17	12	145	4	480
32	MO12	OAKY CK ESE PETFORD QLD	8.37	17	25	145	6	560
33	MO13	EMU CK SE PETFORD QLD	8.28	17	24	144	59	500
34	MO14	NOLANCK SE WROTHAM PK QLD	8.28	16	49	144	10	240
35	MO15	MITCHELL R, HEALEYSYD QLD	8.21	16	1	142	34	150
36	MO16	ECCLES CK NE PETFORD QLD	8.18	17	17	145	3	500
37	MO17	MISHAP CK NE PETFORD QLD	8.18	17	11	145	7	520
38	MO18	VICTORIA RIVER NT	8.15	15	35	131	2	35
39	MO19	GIBBS CK ESE PETFORD QLD	8.12	17	24	145	9	680
40	MO20	VICTORIA RIVER NT	8.09	15	35	131	2	35
<i>E. camaldulensis</i> ที่คัดเลือกในประเทศไทย								
41	TH01	สายต้นที่คัดเลือกจากจังหวัดกำแพงเพชร						
42	TH02	สายต้นที่คัดเลือกจากจังหวัดพิจิตร						
43	TH03	สายต้นที่คัดเลือกจากจังหวัดกาญจนบุรี						
44	TH04	สายต้นที่คัดเลือกจากจังหวัดราชบุรี						
45	TH05	สายต้นที่คัดเลือกจากจังหวัดหนองคาย						

หมายเหตุ * เป็น DBH (ซม.) ที่วัดเมื่ออายุ 2 ปี

ตารางผนวกที่ 2 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ไพรเมอร์	ชุดซ้ำ	ลำดับเบส	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)	ขนาด (bp)
EMBRA01	(AG)33	gATAgAACTTTCCTATTTgATCg gTAaggATTTgATgTCTgCAA	56	127
EMBRA02	(AG)15	CgTgACACCAggACATTAC ACAAATgCAAATTCAAATgA	56	121
EMBRA03	(AG)19	gATCggATTggAggAgAC AATTCAATTCATCCAAAgC	56	123
EMBRA04	(AG)23	ATACAATgATTTgAAAggggg gAgTTgTTTgTTTTgTCgAA	56	64
EMBRA05	(AG)22	ATgCTggTCCAACTAAgATT TgAgCCTAAAAgCCCAAC	56	88
EMBRA06	(AG)19	AgAgAATTgCTCTTCATggA gAAAAgTCTgCAAAgTCTgC	56	98
EMBRA07	(AG)15	CACACCgTgTCAgTTAgC AATAAggAggATTCCATgg	56	115
EMBRA08	(AG)21	CACAATAAAAAATCAAAACCC AAAgAgCAgATTATTACAgAAgC	56	127
EMBRA09	(AGA)3(AG)28	AgTgAgAgAgATATTCgCgT CCAATACAATCATCAATCCA	56	94
EMBRA10	(CCT)3(AG)14	gTAAAgACATAgTgAAgACATTCC AgACAgTACgTTCTCTAgCTC	56	95
EMBRA11	(AG)4GG(AG)13	gCTTAgAATTTgCCTAAACC gTAAAATCCATgggCAAg	56	97
EMBRA12	(AG)22	AggATTTgTggggCAAgT gTTCCCCATTTTCATgTCC	56	98
EMBRA13	(AG)27	ATTTCCCTAggTTTgACATg TCCAACATCTTACTCAACCA	56	130
EMBRA14	(AG)8AAC(AG)25	gCCTCAAACCAATTCAAAT CATgATTCATCCCACTCCTC	56	109
EMBRA15	(AG)21	TTTgTTggATgAggACTT CAACATgTTCTCCgAAAAg	56	66

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ชุดซ้ำ	ลำดับเบส	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)	ขนาด (bp)
EMBRA16	(AG)21	CAACgTCCCCCTTCTTC ATgTTAggCCAAACCAg	56	98
EMBRA17	(AG)18	AggATACTCgTgAgAaAgC gTAgATCTgTTCTgCATgTTg	56	184
EMBRA18	(AG)3GG(AG)19	CAGCTAggATgTTAgACTTgg gCACACCTAgAATTTTCAAACATA	56	87
EMBRA19	(AG)23	gACggTTgATTTCTCTgATT gTggTgCTCCTCTCCTCT	56	124
EMBRA20	(AG)19	gTgAgTgggTATCCATCg gCTggAACTggTCTTgAg	56	97
EMBRA21	(AC)16TT(AC)12	ACAAGggAAACTTgATCg ggAACCgAACATAgCAAg	56	92
EMBRA22	(AG)17(AC)14	gCACATgCACACACggTTg AAggCCAgTggTCgTgAgTC	56	126
EMBRA23	(AG)16	ggTTgTTTCATCTTTTCCATg AgCgAAggCAATgTgTTT	56	118
EMBRA24	(GAA)5C(GA)6	CgCTATAATTCTATgCCg TgAgAgAgATATTCgCgT	56	162
EMBRA25	(AG)27TAG...(AG)4	TCATCAGgTTCgCTCgTT AgTTgAgTgAACACgCgg	56	315
EMBRA26	(AG)19	CCCACAACAAAaggAAAg AgAggTgTTCgATTCAATTC	56	120
EMBRA27	(AG)24	ATAACCACACCAATCTgCA TATAgCTCgAACgCTCAAC	56	135
EMBRA28	(AG)25	CAAgACATgCATTTCTgTAgt ACTCTTgATgTgACgAgACA	56	178
EMBRA29	(AG)18AGA...(AG)18	CTTCgCTCACATCagTCTC CAATCgAgTCAATAACATTC	56	204
EMBRA30	(AG)22	TTAgTTgAATCCAACCATTg TATATAaggTgCAAAATAATAAACg	58	138

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ชุดซ้ำ	ลำดับเบส	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)	ขนาด (bp)
EMBRA31	(AG)6TTTCCC(AG)19	AATTgCCCgAgTCAAAATAC ggAACAATgTggTTTggg	58	148
EMBRA32	(AG)22	ATCAgCCTCCACgTTCTA ggAgAAggAAgTgTATCAA	56	65
EMBRA33	(AG)19	CAATTTgCATgTCCAgTTTg gCAgAAgTTgATTgAAAgCA	58	122
EMBRA34	(AG)21	TCAAAACCTCTCTCTCAT AATAAACATTTCTTTgAACAgA	56	104
EMBRA35	(AG)24(TCC)9	ATTTTTgAgAgAAAAATCTTATCC gTggTgTgAACgAACgAT	56	205
EMBRA36	(AG)29	TTATCgTCAATTCTTgCTTg AATTCAgCTCAAgATTgTgT	56	155
EMBRA37	(AG)16	CACCTCTCCAACTACACAA CTCCTCTCTTCCACCATTC	56	124
EMBRA38	(AG)11(TA)4	ggTTCTCTAgTgAAAATgTCg ATACATCCATCAAAgCACAA	56	126
EMBRA39	(AG)9(CA)11	gCATTCgTACTCATTTTCAA gCATCgAgAgTggATTAgTT	54	146
EMBRA40	(AG)19(CA)4	AAAgTATCTTCACgCTTCAT TCCCAATCATgATCTCAg	56	141
EMBRA41	(AG)13	ATgATTTTgTgCgTggAC TCAggTgAAAggATggAg	56	198
EMBRA42	(AG)15	gAgTAAAAATTggTTTTgAgTg CCCTCTTTTCATTTgTCTT	56	127
EMBRA43	(AG)14	TCCAggTTCATATTCACATC CATCTCAAgTTCCTCCCT	56	145
EMBRA44	(AG)16	ggggTTTgTTCTgCTTA CAAAAgAgTTCAgCTgTg	50	208
EMBRA45	(AG)18	gTCATTTgCACACgTTTTTC AgTTCATAgAATgCAGAAAATg	56	102

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ชุดซ้ำ	ลำดับเบส	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)	ขนาด (bp)
EMBRA46	(AG)20	gAAgTCATCATCTgTAgATTgC ACCCATTATCTTTgTgAgC	56	168
EMBRA47	(AG)24	AgAACCCTCTATAAAACCCC gggCTAgACATgATggAg	56	106
EMBRA48	(AG)26	ATTTgATTCTTCCCAA ATTgTAATgAgCCTCTCAC	54	123
EMBRA49	(AG)20	ATTATTggTTCATATTgAAAACC AgATAgAgATTgAgTgAgACCC	54	132
EMBRA50	(AG)10AA(AG)17(AGG)6	TggATgCTgTTCTCATCCT gggTTTCTTTgTgAAACgA	58	123
EMBRA51	(AG)20	gATgCATTCCTTTTTTCC CATTCTCTgCATCTggAC	58	115
EMBRA52	(AG)2T(AG)26	TAATCAgCATTAgCgAAAgA CgTATATgTTCAgAgTCAATCC	58	103
EMBRA53	(AG)17GT(AG)5	ATTAgCTTTCTgTAACCCg gAATggACAAGCTCTgATg	60	130
EMBRA54	(AG)17	TgTATgAggTACATCCgg AAAgTTATCAgCgAgAgTTC	50	144
EMBRA55	(AG)26	ATATTgACCCCTTCAAAG TgTCATCACCAATAATTgTT	50	178
EMBRA56	(AG)23(CA)8	TCATTgACATgCTgACTgT ACTAACAgTTgAAAAggTAAAgC	58	149
EMBRA57	(AG)28	CCTTCTCTCTTggAATAC ATAgCCAgTgAAAgTgAgg	56	115
EMBRA58	(AG)20	CACCAACTggTACTATgAggAT TTggCTTAaggTAgAACACT	56	143
EMBRA59	(GA)6GG(GA)3AA(GA)9	gTTgTgCATgggCCTCTTg CgACggCCAgtgAATTgTAA	52	106
EMBRA60	(AG)23	AACAgCAgTTgCTACACCAC gAgCgAAAAggAgAACACC	60	114

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ชุดซ้ำ	ลำดับเบส	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)	ขนาด (bp)
EMBRA61	(AG)22	ggCATAACgAgTTgTTCT AgAgTATAATCAgCgCCT	58	186
EMBRA62	(AG)18	TAggACCTACAggACCAT gAACCCACAgTTATTTCC	55	139
EMBRA63	(AG)21	CATCTggAgATCgAggAA gAgAgAAggATCATgCCA	58	201
EMBRA64	(AG)21	gCTTCACTTTCAgAACACTC AgCTCCCTTCACAgTgTA	56	270
EMBRA65	(AG)18	gACATCTCCTCCTCAAgC CgATATgCTACgTCTTCC	58	173
EMBRA66	(AG)18A(AG)4	ACTTCTTAaggCTACAgCA gAAggATCACgAgACATA	56	155
EMBRA67	(AG)17	ggAAgAATCTAAgCgTCA gAAgAAgATgAATgTAggTg	58	218
EMBRA68	(AG)20	gATgACTTCTCCTTCCgT TggCTTACggTAgAACAC	58	108
EMBRA69	(AG)5TT(AG)19	ACCTTgTgATggATgAAgC CCCgACAaggATgAgAAA	56	121
EMBRA70	(CATA)9CAT(AC)17	gTCACTgTgTTCAAAGAgTA TTgTTgCTgATACCAATCC	56	169
EMCRC01a	(CA)16	gCATggACACCCTTTTTC ATTgAgAATgCTgAACCAAAC	50	151-203
EMCRC01b	(CA)16	ATgCCgCACTTggAAgC ggACTgAAAgCCCATTgAgAA	55	295-342
EMCRC02	(CT)9--(CA)10	gCCACTgTgTggCTTTC CCCAATCATTTTTCATTTTgA	55	157-189
EMCRC03	(CA)10	AgATggggTTTCTCATggTTT ACCgTACTATgCAgCTggAAC	55	109-145
EMCRC04	(AC)17	gTAATCTTTTCATTCTCCgACC CTCgAggACATgTTgAgTg	55	178-268

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ชุดซ้ำ	ลำดับเบส	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)	ขนาด (bp)
EMCRC05	(CT)19(CA)13	gTTTCTTCCTCTgCTTgTTgC gATgggTTCggATTTAggC	60	202-248
EMCRC06	(CT)11(CA)23	CTTCAAaggTTCACAGATgg TCTTCATAAgTCCCCTAATCA	50	151-193
EMCRC07	(TG)15(AG)8	CgAATCAAgTCgACATgTgTg CCGTCgACCGCCCTAT	60	271-309
EMCRC08	(CT)13(CA)24	CCAgATTGTAgCCCTTATgTg CATCCCAATCAATCAAACgAAC	55	231-265
EMCRC09	(TG)14	CTgggCTgTgCATCTCTgAAA gACCCggTCAACTCCTCAAgA	55	286-342

ตารางผนวกที่ 3 สรุปผลการแยกความแตกต่างด้วยวิธี silver staining

ลำดับ ที่	ไพรเมอร์	จำนวนตัวอย่างที่เพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอได้			จำนวน อัลลีล	หมายเหตุ
		MS ^{1/}	MO ^{2/}	รวม		
1	EMBRA01	3	0	3	5	
2	EMBRA02	5	10	15	7	
3	EMBRA03	5	8	13	19	
4	EMBRA04	10	15	25	17	
5	EMBRA05	10	12	22	20	
6	EMBRA06	8	10	18	17	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
7	EMBRA07	1	9	10	17	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
8	EMBRA08	2	6	8	9	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
9	EMBRA09	11	17	28	18	
10	EMBRA10	6	12	18	20	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
11	EMBRA11	7	8	15	7	
12	EMBRA12	9	7	16	7	
13	EMBRA13	8	9	17	13	

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ ที่	โปรแกรม	จำนวนตัวอย่างที่เพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอได้			จำนวน อัลลีล	หมายเหตุ
		MS ^{1/}	MO ^{2/}	รวม		
14	EMBRA14	4	11	15	14	
15	EMBRA15	8	9	17	10	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
16	EMBRA16	13	12	25	12	
17	EMBRA17	17	18	35	19	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
18	EMBRA18	3	0	3	3	
19	EMBRA19	4	11	15	9	
20	EMBRA20	5	5	10	7	
21	EMBRA21	12	10	22	10	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
22	EMBRA22	0	5	5	6	
23	EMBRA23	6	4	10	8	
24	EMBRA24	9	9	18	12	
25	EMBRA25					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
26	EMBRA26	9	12	21	17	
27	EMBRA27	7	14	21	17	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
28	EMBRA28					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
29	EMBRA29	1	5	6	9	
30	EMBRA30					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
31	EMBRA31					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
32	EMBRA32					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
33	EMBRA33					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
34	EMBRA34	2	0	2	2	
35	EMBRA35	3	5	8	11	
36	EMBRA36	7	16	23	16	
37	EMBRA37					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
38	EMBRA38					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
39	EMBRA39	4	6	10	8	
40	EMBRA40					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ ที่	โปรแกรม	จำนวนตัวอย่างที่เพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอได้			จำนวน อัลลีล	หมายเหตุ
		MS ^{1/}	MO ^{2/}	รวม		
41	EMBRA41	0	5	5	6	
42	EMBRA42	17	18	35	26	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
43	EMBRA43	2	10	12	12	
44	EMBRA44	2	9	11	9	
45	EMBRA45					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
46	EMBRA46	4	3	7	4	
47	EMBRA47					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
48	EMBRA48					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
49	EMBRA49					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
50	EMBRA50					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
51	EMBRA51	7	4	11	9	
52	EMBRA52	2	4	6	4	
53	EMBRA53	17	16	33	11	
54	EMBRA54	2	2	4	4	
55	EMBRA55					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
56	EMBRA56					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
57	EMBRA57	0	4	4	11	
58	EMBRA58	10	19	29	12	
59	EMBRA59	3	4	7	9	
60	EMBRA60	3	6	9	6	
61	EMBRA61	5	3	8	9	
62	EMBRA62					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
63	EMBRA63	2	1	3	4	
64	EMBRA64	0	1	1	2	
65	EMBRA65					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
66	EMBRA66	1	9	10	11	
67	EMBRA67	2	0	2	3	

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ ที่	โปรแกรม	จำนวนตัวอย่างที่เพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอได้			จำนวน อัลลีล	หมายเหตุ
		MS ^{1/}	MO ^{2/}	รวม		
68	EMBRA68	5	5	10	8	
69	EMBRA69	2	4	6	6	
70	EMBRA70	1	1	2	4	
71	EMCRC01a					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
72	EMCRC01b	0	4	4	10	
73	EMCRC02	8	9	17	13	
74	EMCRC03	14	7	21	18	
75	EMCRC04	7	6	13	16	
76	EMCRC05					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
77	EMCRC06	6	3	9	13	แถบดีเอ็นเอชัดเจน
78	EMCRC07					ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้
79	EMCRC08	1	3	4	4	
80	EMCRC09	0	1	1	2	

หมายเหตุ ^{1/} MS คือ ตัวอย่างที่คัดเลือกจาก *E. camaldulensis* ssp. *simulata*

^{2/} MO คือ ตัวอย่างที่คัดเลือกจาก *E. camaldulensis* var. *obtus*

ตารางผนวกที่ 4 ข้อมูลการให้คะแนนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE

ตัวอย่าง	population	อัล ลีล	EMBRA04	EMBRA05	EMBRA07	EMBRA08	EMBRA09	EMBRA10	EMBRA16	EMBRA21	EMBRA26	EMBRA27	EMBRA36	EMBRA42
	ID*													
MS01	1	a1	8	9	11	7	4	7	12	3	4	5	-9	9
MS01	1	a2	12	15	11	11	5	11	12	3	4	5	-9	13
MS02	1	a1	6	8	3	5	2	4	7	3	10	5	12	8
MS02	1	a2	6	22	9	12	2	18	7	10	17	12	12	13
MS03	1	a1	6	7	6	4	7	7	17	9	2	5	7	6
MS03	1	a2	6	11	6	9	7	11	17	9	2	7	7	9
MS04	1	a1	8	12	11	8	8	5	8	7	-9	4	13	2
MS04	1	a2	8	19	13	8	8	5	17	7	-9	4	13	8
MS05	1	a1	2	9	5	5	4	3	17	5	9	9	4	15
MS05	1	a2	17	18	12	9	4	7	17	9	9	9	4	18
MS06	1	a1	9	13	5	6	3	6	8	3	6	1	6	7
MS06	1	a2	13	15	10	10	3	6	17	6	6	13	6	14
MS07	1	a1	3	6	6	7	3	10	17	3	9	1	2	9
MS07	1	a2	3	15	13	12	3	10	17	9	9	2	2	9
MS08	1	a1	5	12	2	9	11	4	7	4	6	4	2	11
MS08	1	a2	13	12	10	16	11	8	7	6	6	12	2	11
MS09	1	a1	13	3	7	4	3	10	15	6	11	5	10	8
MS09	1	a2	13	8	7	8	11	10	17	13	11	12	14	8
MS10	1	a1	16	6	2	6	3	10	13	6	10	5	5	10
MS10	1	a2	16	20	15	9	3	16	13	6	16	12	5	10

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	population	อัล ลีล	EMBRA04	EMBRA05	EMBRA07	EMBRA08	EMBRA09	EMBRA10	EMBRA16	EMBRA21	EMBRA26	EMBRA27	EMBRA36	EMBRA42
	ID*													
MS11	1	a1	13	8	16	10	13	5	6	3	8	5	8	9
MS11	1	a2	15	13	16	10	13	5	8	10	10	5	8	9
MS12	1	a1	6	4	9	8	6	4	18	4	7	2	9	2
MS12	1	a2	6	14	9	10	11	12	18	4	12	2	9	7
MS13	1	a1	8	5	10	7	6	6	16	7	4	3	7	8
MS13	1	a2	8	14	13	12	6	8	20	9	4	4	7	8
MS14	1	a1	5	2	14	5	4	7	-9	3	6	5	11	6
MS14	1	a2	5	2	14	5	10	10	-9	6	10	5	11	13
MS15	1	a1	6	8	7	5	5	9	-9	2	3	2	10	13
MS15	1	a2	6	12	13	9	8	12	-9	2	9	8	10	13
MS16	1	a1	1	9	7	4	3	6	5	1	9	4	4	9
MS16	1	a2	1	9	12	7	3	6	5	1	17	4	8	18
MS17	1	a1	3	4	8	10	4	10	12	3	9	8	4	8
MS17	1	a2	3	4	16	10	4	10	12	13	9	13	4	14
MS18	1	a1	12	4	4	9	2	6	8	7	2	1	5	9
MS18	1	a2	12	21	4	9	2	9	8	12	2	5	8	12
MS19	1	a1	4	8	6	6	2	5	17	11	5	6	2	9
MS19	1	a2	4	13	11	11	7	14	17	13	5	13	2	15
MS20	1	a1	-9	5	10	7	5	7	-9	6	3	3	9	8
MS20	1	a2	-9	10	10	7	10	12	-9	12	3	5	11	8

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	population	อัล ลีล	EMBRA04	EMBRA05	EMBRA07	EMBRA08	EMBRA09	EMBRA10	EMBRA16	EMBRA21	EMBRA26	EMBRA27	EMBRA36	EMBRA42
	ID*													
MO01	2	a1	2	2	12	4	12	8	10	5	5	5	4	7
MO01	2	a2	2	12	12	12	12	15	15	8	5	5	14	10
MO02	2	a1	12	5	3	14	-9	7	4	10	9	9	4	4
MO02	2	a2	12	5	7	14	-9	7	9	10	17	9	10	8
MO03	2	a1	6	2	12	6	6	6	22	5	4	6	6	2
MO03	2	a2	6	12	12	6	8	9	22	8	4	6	11	7
MO04	2	a1	9	8	2	6	5	4	19	8	5	5	6	6
MO04	2	a2	9	14	11	11	8	11	19	12	5	5	6	18
MO05	2	a1	14	9	-9	4	3	3	-9	2	4	3	7	7
MO05	2	a2	14	9	-9	9	12	6	-9	2	4	7	12	10
MO06	2	a1	18	5	4	4	8	4	8	7	3	3	8	3
MO06	2	a2	18	5	4	11	10	4	11	7	12	4	8	7
MO07	2	a1	3	5	10	6	4	3	20	8	3	-9	7	7
MO07	2	a2	3	12	10	10	4	3	20	8	9	-9	7	10
MO08	2	a1	10	7	-9	6	4	6	11	13	2	2	8	14
MO08	2	a2	10	10	-9	6	7	6	18	13	2	4	11	19
MO09	2	a1	9	4	5	3	3	3	8	8	11	4	8	5
MO09	2	a2	9	4	8	10	3	8	16	8	11	4	10	11
MO10	2	a1	11	3	1	6	6	4	14	3	3	7	4	7
MO10	2	a2	11	8	6	14	6	13	19	8	3	7	10	7

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	population	อัล ลีล	EMBRA04	EMBRA05	EMBRA07	EMBRA08	EMBRA09	EMBRA10	EMBRA16	EMBRA21	EMBRA26	EMBRA27	EMBRA36	EMBRA42
	ID*													
MO11	2	a1	4	12	7	2	1	8	13	7	10	2	6	2
MO11	2	a2	9	18	7	11	8	10	13	7	10	2	13	7
MO12	2	a1	-9	4	10	7	4	3	17	2	5	2	4	9
MO12	2	a2	-9	11	10	15	7	11	24	7	6	2	10	17
MO13	2	a1	18	8	3	4	4	7	16	5	4	2	7	1
MO13	2	a2	18	14	3	4	10	10	24	7	4	6	7	9
MO14	2	a1	7	9	6	4	2	7	8	10	5	4	11	2
MO14	2	a2	7	16	12	6	2	7	16	10	7	5	13	9
MO15	2	a1	12	5	2	12	3	5	9	11	9	7	5	4
MO15	2	a2	12	11	7	17	11	5	16	11	9	7	11	9
MO16	2	a1	4	14	3	6	3	1	10	8	5	9	9	8
MO16	2	a2	4	14	3	15	3	2	10	8	10	9	9	12
MO17	2	a1	10	3	5	4	3	2	10	4	12	1	11	11
MO17	2	a2	12	15	14	10	3	2	16	10	13	5	18	11
MO18	2	a1	9	3	3	2	1	8	10	3	1	3	4	3
MO18	2	a2	12	7	15	8	1	15	15	12	1	6	8	16
MO19	2	a1	3	1	5	1	4	8	9	9	7	10	11	8
MO19	2	a2	3	7	14	7	10	15	17	9	7	10	15	13
MO20	2	a1	6	1	4	2	3	7	3	10	3	5	11	4
MO20	2	a2	6	8	18	14	3	7	17	12	9	5	14	4

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่าง	population	อัล ลีล	EMBRA04	EMBRA05	EMBRA07	EMBRA08	EMBRA09	EMBRA10	EMBRA16	EMBRA21	EMBRA26	EMBRA27	EMBRA36	EMBRA42
	ID*													
TH01	3	a1	8	8	3	9	3	8	16	3	2	2	3	5
TH01	3	a2	8	8	12	16	3	15	21	11	2	6	9	9
TH02	3	a1	12	5	3	12	9	6	3	10	9	8	4	5
TH02	3	a2	12	10	5	14	9	15	24	11	9	8	9	9
TH03	3	a1	12	5	3	12	10	5	3	11	9	8	4	5
TH03	3	a2	12	10	9	12	10	15	9	11	9	11	10	9
TH04	3	a1	-9	5	3	10	10	13	7	11	8	7	11	4
TH04	3	a2	-9	8	8	10	10	13	9	13	8	7	11	9
TH05	3	a1	6	6	3	9	4	5	6	11	8	8	11	5
TH05	3	a2	6	11	8	11	4	5	9	11	8	8	11	9

หมายเหตุ population ID* หมายถึง กลุ่มของประชากรที่คาดว่าจะเป็น โดย

1 หมายถึง *E. camaldulensis ssp. simulata*

2 หมายถึง *E. camaldulensis var. obtusa*

3 หมายถึง ตัวอย่างของประเทศไทย

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	จิตติพร สายมณี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	2 มกราคม 2515
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(วิทยาศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัทเอสซีจี เปเปอร์ จำกัด (มหาชน)
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยี ชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ