รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR สำหรับตรวจสอบลำไยลูกผสม

Development of SCAR marker for verifying progeny of longan (*Dimocarpus longan* Lour.)

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2560

จำนวน 147,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวจันทร์เพ็ญ สะระ

ผู้ร่วมโครงการ นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต

นางฉันทนา วิชรัตน์

นางธีรนุช เจริญกิจ

รายงานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

21 กันยายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

การปรับปรุงพันธุ์ลำไยจะต้องใช้ระยะเวลายาวนานเนื่องจากมีระยะเยาว์วัย (juvenile period) ทำให้การคัดเลือกลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์จากลักษณะทางกายภาพที่เป็นไปได้ช้าและต้องรอระยะเวลาในการออกดอก จึงจำเป็นต้องเลือกใช้เทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลมาช่วยในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมจะช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการดูแลต้นลำไยลูกผสมลงได้

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปี 2560 ที่ได้เล็งเห็นถึงความจำเป็นและความสำคัญในการศึกษาในด้านการการปรับปรุงพันธุ์ลำไย การอนุมัติสนับสนุนทุนวิจัยจึงเป็นสิ่งที่ทำให้นักวิจัยรู้สึกขอบคุณและมีกำลังใจในการทำงานมากขึ้นเนื่องจากเป็นโครงการแรกในชีวิตการทำงานของหัวหน้าโครงการ และหวังว่าเมื่อสิ้นสุดโครงการสามารถสร้างและคัดเลือกพันธุ์ลำไยพันธุ์ใหม่ ๆ ที่ลักษณะทางการเกษตรที่ดีสามารถสร้างชื่อเสียงให้กับมหาวิทยาลัยต่อไป

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์พาวิน มะโนชัย ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการให้แก่นักวิจัยหน้าใหม่ และขอขอบคุณนักวิจัยร่วมโครงการทุกท่านที่คอยสนับสนุนทั้งกำลังกายและกำลังใจที่สำคัญที่ทำให้ผลงานวิจัยออกมาได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
กรอบแนวคิดในการวิจัย	4
การตรวจเอกสาร	5
วิธีการวิจัย	8
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	16
สรุปผลการวิจัย	54
เอกสารอ้างอิง	55

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	11
ตารางที่ 2	แถบดีเอ็นเอทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์ polymorphic ที่ใช้ไพรเมอร์ SRAP ร่วมกับ ITAP	21
ตารางที่ 3	ลำดับเบสของไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบจากโปรแกรม Primer3	38

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ดอกลำไย (a) ดอกเพศผู้ (b) ดอกเพศเมีย (c) ดอกสมบูรณ์เพศ	15
ภาพที่ 2	การผสมข้ามพันธุ์ลำไย	15
ภาพที่ 3	การวิเคราะห์ความเข้มข้นและคุณภาพที่ของดีเอ็นเอลำไยจำนวน 24 พันธุ์ ที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเจล	17
ภาพที่ 4	การวิเคราะห์ความเข้มข้นและคุณภาพที่ของดีเอ็นเอลำไยจำนวน 5 พันธุ์ ที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเจล	17
ภาพที่ 5	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em4-ITPR1	18
ภาพที่ 6	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em4-ITPR2	19
ภาพที่ 7	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em5-ITPR5	19
ภาพที่ 8	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em6-ITPR5	20
ภาพที่ 9	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em8-ITPR3	20
ภาพที่ 10	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em10-ITPR3	21
ภาพที่ 11	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em1	23
ภาพที่ 12	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em2	23
ภาพที่ 13	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em3	24
ภาพที่ 14	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em4	24
ภาพที่ 15	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em5	25
ภาพที่ 16	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em6	25
ภาพที่ 17	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em7	26
ภาพที่ 18	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em8	26
ภาพที่ 19	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em9	27
ภาพที่ 20	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em10	27
ภาพที่ 21	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em11	28
ภาพที่ 22	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR1	28
ภาพที่ 23	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR2	29
ภาพที่ 24	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR3	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 25	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR4	30
ภาพที่ 26	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR5	30
ภาพที่ 27	การแยกบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ITPR3 ของลำไย 3 พันธุ์	31
ภาพที่ 28	ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิสจากการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด	32
ภาพที่ 29	การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	32
ภาพที่ 30	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของลำไยพันธุ์ดอหลวง-2 ที่ได้จากไพรเมอร์ ITPR3	34
ภาพที่ 31	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของลำไยพันธุ์ใบคำ-4 ที่ได้จากไพรเมอร์ ITPR3	35
ภาพที่ 32	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของลำไยพันธุ์พื้นเมือง-72 ที่ได้จากไพรเมอร์ ITPR3	36
ภาพที่ 33	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L3_2	40
ภาพที่ 34	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L11_1	40
ภาพที่ 35	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L11_2	41
ภาพที่ 36	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L19_6	41
ภาพที่ 37	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L11_3	42
ภาพที่ 38	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ LG3_3	42
ภาพที่ 39	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ LG11_3	43
ภาพที่ 40	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L3_3	44
ภาพที่ 41	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L19_1 อุณหภูมิ 58°C	45
ภาพที่ 42	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L19_1 ด้วยเทคนิค touch down PCR	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 43	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วย primer combination ระหว่างไพรเมอร์ L11_3F + L11_3R + L19_1R	47
ภาพที่ 44	การเจริญเติบโตและพัฒนาจนเป็นผลของรังไข่ 1 พู	48
ภาพที่ 45	การเจริญเติบโตและพัฒนาจนเป็นผลของรังไข่ 2 พู	48
ภาพที่ 46	ต้นกล้าลำไยลูกผสมอายุ 1 เดือน	48
ภาพที่ 47	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์พวงทอง x ดอหลวง โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3 (a) และไพรเมอร์ L19_1 (b	49
ภาพที่ 48	ลูกผสมของลำไยพันธุ์พวงทอง x ดอหลวง (a) F_1-1 และ (b) F_1-2	50
ภาพที่ 49	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์สีชมพู x ดอ 27 โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3	50
ภาพที่ 50	ลูกผสมของลำไยพันธุ์สีชมพู x ดอ 27 (a) F_1-1, (b) F_1-2 และ (c) F_1-3	51
ภาพที่ 51	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์ดอก้านแข็ง x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3 (a) ลำไยพันธุ์ดอก้านแข็ง x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ (b)	52
ภาพที่ 52	การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์เพชรสาคร x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3	53
ภาพที่ 53	ลูกผสมของลำไยพันธุ์เพชรสาคร x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ (a) F_1-1, (b) F_1-2, (c) F_1-3 และ (d) F_1-4	53

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR สำหรับตรวจสอบลำไยลูกผสม

Development of SCAR marker for verifying progeny of longan (*Dimocarpus longan* Lour.)

จันทร์เพ็ญ สะระ[1*] ฉันทนา วิชรัตน์[2] ธีรนุช เจริญกิจ[3] และแสงทอง พงษ์เจริญกิต[4]

Junpen Sara[1*], Chantana Witcharat[2], Theeranuch Jaroenkit[3] and Saengtong Pongjaroenkit[4]

[1]ฝ่ายปรับปรุงและพัฒนาพันธุกรรมพืชและสัตว์ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

[2]สาขาวิชาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

[3]สาขาวิชาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

[4]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.) สามารถปลูกได้ในหลากหลายพื้นที่ทั้งเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน แต่ประเทศไทยเป็นประเทศเดียวที่มีระบบการปลูกลำไยเชิงเดี่ยว ซึ่งมีความเสี่ยงต่อระบบการปลูกลำไยในไทย จึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีเกิดพันธุ์ใหม่ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR (Sequence characterized amplified region) จากเทคนิค SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism) และ ITAP (Intron-targeted amplified polymorphism) เพื่อใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไย โดยคัดเลือกแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ที่แสดงความแตกต่างมาแยกบริสุทธิ์ สร้างดีเอ็นเอสายผสม จากนั้นส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอ แล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์ SCAR ได้จำนวน 9 ไพรเมอร์ เมื่อทดสอบปริมาณดีเอ็นเอกับลำไยจำนวน 29 พันธุ์ พบไพรเมอร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ คือ L3_3 และ L19_1 ที่พัฒนาจากลำไยพันธุ์ดอหลวงและพันธุ์พื้นเมือง สามารถใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ จำนวน 3 คู่ผสม ได้แก่ พวงทอง x ดอหลวง สีชมพู x ดอ 27 และดอก้านแข็ง x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่

คำสำคัญ: เครื่องหมาย SCAR การตรวจสอบ ลำไยลูกผสม

Abstract

Longan (*Dimocarpus longan* Lour) can be grown in both of tropical and subtropical locations, while only Thailand country has monoculture of longan. This cause is a risk to the system of planting longan. Thus, breeding program of longan is necessary. In this study, it would develop SCAR (Sequence characterized amplified region) marker from SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism) and ITAP (Intron targeted amplified polymorphism) technique for verification F_1 hybrid of longan. DNA polymorphic bands from 29 cultivars amplification were purified and cloned into the vector. Recombinant clones were sequenced. The DNA sequences were used for designing primer. Nine SCAR primers pair were design and amplified with 29 longan cultivars. L3_3 and L19_1 were successfully developed and can be used to distinguish $3F_1$ hybrid of longan namely: 'Phuangthong X Dow Luang', Sichomphu x Dow 27 and Daw Kan Kaeng x Biaokiao Chiang Mai

Keywords: SCAR marker, detection, longan hybrid

คำนำ

ลำไยเป็นไม้ผลเศรษฐกิจหลักของภาคเหนือ จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2555 พบว่ามีพื้นที่เพาะปลูก ประมาณ 1,172,272 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) โดยพบว่า พันธุ์ลำไยที่ปลูกมากที่สุด คือ พันธุ์อีดอ ประมาณร้อยละ 95 (ธีรนุช, 2559) ทำให้เห็นได้ว่าแม้ประเทศไทยจะมีลำไยหลายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกลับมีเพียงพันธุ์เดียวเท่านั้น นับว่าเป็นความเสี่ยงต่อระบบการปลูกลำไยของไทย เนื่องจากในปัจจุบันประเทศไทยกำลังได้รับผลกระทบต่อสภาวะโลกร้อน ทำให้สภาพที่อากาศเปลี่ยนแปลงส่งผลกระทบต่อระบบการปลูกพืช สำหรับลำไยนั้นได้มีสารโพแทสเซียมคลอเรตช่วยกระตุ้นการออกดอกโดยไม่ต้องการสภาพที่อากาศหนาวเย็นมากระตุ้นการออกดอกอีกต่อไป แต่ทว่าสภาพที่อากาศที่แปรปรวนในปัจจุบันย่อมส่งผลกระทบกับลำไยได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต อาทิ เช่น หากฝนทิ้งช่วงหรือฝนตกหนักเกินไปในระหว่างที่ลำไยกำลังออกดอก ก็จะทำให้ดอกลำไยร่วงได้ ส่งผลให้มีผลผลิตลดลง หรือลำไยติดผลในช่วงแล้งจัด เมื่อได้รับปริมาณน้ำฝนเยอะเกินไปจะทำให้เกิดผลแตกได้ (กนกวรรณ, 2553) เป็นต้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ลำไยเพื่อให้เกิดลำไยพันธุ์ใหม่ๆ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบการปลูกลำไยของไทย

ศูนย์วิจัยและพัฒนาลำไยแม่โจ้ได้เห็นความสำคัญของการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ลำไย จึงได้เริ่มทำการวิจัยและพัฒนางานด้านการปรับปรุงพันธุ์ลำไยมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และ SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) มาช่วยในการตรวจสอบลำไยลูกผสม ซึ่งข้อดีของเครื่องหมาย RAPD คือ ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่ก็มีข้อจำกัดในการทำซ้ำ (สุรินทร์, 2552) ในขณะที่เครื่องหมาย SCAR จะมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น และสามารถทำซ้ำได้ แต่ประสิทธิภาพที่ในการนำมาใช้งานก็ขึ้นอยู่กับการเลือกบริเวณของดีเอ็นเอ (DNA region) ที่นำมาพัฒนาเป็นเทคนิค SCAR

ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จะนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism) และ ITAP (Intron Targeted Amplified Polymorphism) ที่มีการนำมาใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชั้นสูง ได้แก่ กล้วย ลำไย และถั่วลิสง (Xiong et al., 2013) มาพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไย เพราะการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผล ต้องใช้พื้นที่ในการปลูกทดสอบลูกผสม และใช้ระยะเวลาในการคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรเป็นเวลายาวนาน เนื่องจากต้นที่ปลูกจากเมล็ดมีระยะเยาว์วัย (juvenile period) นาน ซึ่งอาจใช้เวลานานถึง 10 ปี ถึงจะเริ่มออกดอกครั้งแรก (พาวิน และคณะ, 2547) ในการปรับปรุงพันธุ์ลำไย จึง

จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการตรวจสอบ เพราะสามารถคัดเลือกลำไยลูกผสมได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้ประหยัดพื้นที่และค่าใช้จ่ายในการดูแล

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR มาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เครื่องหมาย SCAR จะมีประโยชน์ในการตรวจสอบลำไยลูกผสม ซึ่งต่อไปในอนาคตสามารถจดสิทธิบัตรได้
2. ลำไยลูกผสมที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SCAR แล้ว สามารถนำไปขึ้นทะเบียนเป็นพันธุ์ใหม่ได้
3. เทคนิควิธีในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ลำไยนั้น จะเป็นประโยชน์กับนักปรับปรุงพันธุ์ลำไยและไม้ผลอื่นในการประยุกต์ใช้ได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้นำลำไยลูกผสมที่มีการผสมข้ามพันธุ์มาจากชุดโครงการอนุรักษ์และพัฒนาพันธุ์ลำไย โครงการย่อยที่ 1 เรื่อง การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ลำไย ซึ่งดำเนินการสร้างคู่ผสมของลำไย ในฤดู 2557/2558

กรอบแนวคิดในการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลจะต้องใช้พื้นที่และระยะเวลาในการดูแลรักษาต้นลูกผสม ซึ่งจะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย แต่เมื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแล้วจะช่วยประหยัดต้นทุนและพื้นที่

การตรวจเอกสาร

ลำไยเป็นพืชผสมข้าม (เกศิณี, 2546) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus longan* Lour. แบ่งเป็น 2 subspecies คือ *D. longan* ssp. longan และ *D. longan* ssp. malesianus (Yonemoto et al., 2006) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคเหนือมีพื้นที่การปลูกประมาณ 1 ล้านกว่า มีมูลค่าการส่งออกลำไยผลสด ประมาณ 8 พันกว่าล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) โดยพบว่าพันธุ์ลำไยที่ปลูกมากที่สุด คือ พันธุ์อีดอ ประมาณ 95% (ธีรนุช, 2559) เพราะสามารถเก็บเกี่ยวได้ก่อนพันธุ์อื่นๆ และยังจำหน่ายได้ทั้งในรูปผลสดและแปรรูป (พาวิน และคณะ, 2547) และมีพันธุ์อื่นๆ อีกเล็กน้อย ได้แก่ พันธุ์สีชมพู เบี้ยวเขียว แห้ว พวงทอง และเพชรสาคร (ธีรนุช, 2559) ทำให้เห็นได้ว่าแม้ประเทศไทยจะมีลำไยหลายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกลับมีเพียงไม่กี่พันธุ์เท่านั้น นับว่าเป็นความเสี่ยงต่อระบบการปลูกลำไยของไทย เนื่องจากในปัจจุบันประเทศไทยกำลังได้รับผลกระทบต่อสภาวะโลกร้อน ทำให้สภาพที่อากาศเปลี่ยนแปลงส่งผลกระทบต่อระบบการปลูกพืชต่างๆ โดยเฉพาะพืชที่ตอบสนองต่อช่วงแสง เช่น ข้าว พืชผักและไม้ดอก บางชนิด เป็นต้น สำหรับลำไยนั้นได้มีสารโพแทสเซียมครอเรตช่วยกระตุ้นการออกดอก โดยไม่ต้องการสภาพอากาศหนาวเย็นมากระตุ้นการออกดอกอีกต่อไป แต่ทว่าสภาพอากาศที่แปรปรวนในปัจจุบันย่อมส่งผลกระทบกับลำไยได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต อาทิ เช่น หากฝนทิ้งช่วงหรือฝนตกหนักเกินไปในระหว่างที่ลำไยกำลังออกดอก ก็จะทำให้ดอกลำไยร่วงได้ ส่งผลให้มีผลผลิตลดลง หรือลำไยติดผลในช่วงแล้งจัด เมื่อได้รับปริมาณน้ำฝนเยอะเกินไปจะทำให้เกิดผลแตกได้ (กนกวรรณ, 2553) เป็นต้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ลำไยเพื่อให้เกิดลำไยพันธุ์ใหม่ๆ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบการปลูกลำไยของไทย

การปรับปรุงพันธุ์ลำไยของไทยนั้น เริ่มการศึกษาในการผสมพันธุ์ลำไย (เพ็ญแข และคณะ, 2512) ต่อมามีรางานการปรับปรุงพันธุ์ลำไยโดยการการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมม่า (อดิศร และธวัชชัย, 2541) และการปรับปรุงพันธุ์ลำไยโดยการผสมพันธุ์ในปี พ.ศ. 2554 (ทวีสิน, 2554) แต่ยังไม่มีรายงานการขึ้นทะเบียนพันธุ์ใหม่ของพันธุ์ลำไยพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช, 2561) เพราะการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลต้องใช้เวลายาวนาน เนื่องจากต้นที่ปลูกจากเมล็ดมีระยะเยาว์วัย (juvenile period) (พาวิน และคณะ, 2547) จึงยากต่อการคัดเลือกจากลักษณะทางกายภาพที่ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชประสบความสำเร็จ คือ การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพที่ซึ่งวิธีการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการมักจะซับซ้อนและยุ่งยาก เนื่องจากความแปรผันของสภาพที่แวดล้อม ในปัจจุบันจึงมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกในงานปรับปรุงพันธุ์พืช

เพราะทำให้การคัดเลือกพืชมีความถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากเป็นการคัดเลือกในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งอิทธิพลของสภาพที่แวดล้อมไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้ประหยัดทรัพยากรและเวลา (อรรัตน์, 2548)

ในปัจจุบันมีการประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการเกษตรในหลายด้าน ได้แก่ การจำแนกสายพันธุ์พืช (varietal identification) การจำแนกความบริสุทธิ์ของพันธุ์พืช การบอกระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของแต่ละกลุ่มประชากรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (genetic diversity) การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic linkage map construction) การหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ (gene mapping) และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก (marker assisted selection หรือ MAS) เป็นต้น (สุรีพร, 2546) ซึ่งมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของพืชในกลุ่มไม้ผลเป็นจำนวนมาก เช่น การพัฒนาเครื่องหมาย microsatellites ในการจำแนกสายพันธุ์ลิ้นจี่ (Viruel and Hormaza, 2004) การพัฒนาเครื่องหมาย SNP (Single Nucleotide Polymorphism) จาก transcriptome sequences สำหรับการจำแนกแหล่งรวบรวมพันธุกรรมของลำไย (Wang et al., 2015) เป็นต้น โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอส่วนใหญ่ถูกพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) และได้มีการดัดแปลงเทคนิค PCR เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน เช่น เทคนิค Hot start PCR เป็นเทคนิคที่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดหลังจากดีเอ็นเอเสียสภาพที่อย่างสมบูรณ์แล้ว เพื่อป้องกันไม่ให้ไพรเมอร์จับตำแหน่งที่ไม่ถูกต้องในช่วงที่มีการเพิ่มจากอุณหภูมิห้องไปจนถึงอุณหภูมิในขั้นตอน denature เทคนิค touch down PCR เป็นเทคนิคที่ใช้การลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing จากสูงในรอบแรกและลดลงจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ ใช้ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีปริมาณน้อย และมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ด้วย (สุรินทร์, 2552)

จากการรายงานการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านั้น พบว่ามีรายงานการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลให้เชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตรน้อยมาก เนื่องจากต้องมีเงินค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งในไม้ผลยังไม่มีรายงานการหาลำดับเบสในจีโนม จึงทำให้มีฐานข้อมูลลำดับเบสเกี่ยวกับไม้ผลน้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผล เช่น การปรับปรุงพันธุ์มะม่วงไทยโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR (กิตติพัฒน์ และธัญพิศิษฐ์, 2545) การศึกษาของ Sitthiphrom et al. (2005) ที่ใช้เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature RAPD) ในการคัดเลือกลูกผสมของลำไยระหว่างพันธุ์ดอกกับใบดำ, พันธุ์ดอกกับเบี้ยวเขียว และพันธุ์เบี้ยวเขียวกับใบดำ และ Cutler et al. (2006) ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากไพรเมอร์ H-04 ที่มีความจำเพาะกับลำไยพันธุ์เพชรสาคร นราภิรมย์ ปิงปอง และเวียดนามที่สามารถออกดอกได้ โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิต่ำชักนำให้ออกดอก เป็นต้น

เทคนิค SCAR (sequence characterized amplified region) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดย PCR แบบสุ่มหลายตำแหน่ง เช่น RAPD, AFLP และ ISSR เป็นต้น โดยการทำ RAPD มีข้อเสีย คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความเสถียรต่ำและมีข้อจำกัดในการทำซ้ำ สำหรับเทคนิค AFLP มีข้อเสียหลัก คือ มีค่าใช้จ่ายในการทำค่อนข้างสูง และมีวิธีการยุ่งยากหลายขั้นตอน ส่วนเทคนิค ISSR นั้นก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งเหมือนกับเทคนิค RAPD (สุรินทร์, 2552) และเทคนิคเหล่านั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนที่ไม่ใช่ยีน หรือสุ่มจากดีเอ็นเอทั้งจีโนม (Xiong et al., 2011) แต่เมื่อนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR แล้ว จะได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงตำแหน่งเดียว (สุรินทร์, 2552)

จากรายงานของ Xiong et al. (2013) ใช้เทคนิค ITAP ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิดใหม่ ที่ถูกพัฒนามาจากบริเวณบริเวณ intron-exon splice junction ร่วมกับ SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มที่นิยมใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั่วไป (สุรินทร์, 2552) ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชั้นสูง ได้แก่ กล้วย ลำไย และถั่วลิสง ทำให้มีแนวคิดในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SCAR เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ลำไย โดยพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบลูกผสมของลำไยที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ แต่เครื่องหมาย ITAP ก็เป็นไพรเมอร์แบบสุ่มหลายตำแหน่งเช่นเดียวกัน จึงนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR ให้มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น เพื่อให้เหมาะแก่การใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไย

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างลำไยที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างลำไยพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 29 พันธุ์ ได้แก่ ดอก้านแข็ง-2, ดอ 27-1, ดอหลวง-2, ดอยอดแดง-1, ดอแก้วยี่-1, ดอลุ่มน้ำปิง-4, ดอสุขุม-3, ดอ 75-1, ดอ 13-7, ดอ 20-1, ดอก้านอ่อน-1, สีชมพู-7, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่-2, พวงทอง-5, กรอบกะทิ-1, แห้ว-80, ใบดำ-4, ใบหยก-1, จัมโบ-1, บ้านโฮ่ง 60-2, แดงกลม-5, น้ำผึ้งทะวาย, ปู่มาตีนโค้ง-1, ลำไยต้นหมื่น, พื้นเมือง-92, เพชรสาคร-10, ปิงปอง-116, เถา-117 และฉู่เหลียง-64 ซึ่งหมายเลขที่อยู่ข้างหลังชื่อพันธุ์ คือ หมายเลขต้นที่อยู่ในแปลงรวบรวมพันธุ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยทำการเก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่อง Thermal Cycler (BIOER, China)
2. เครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิส
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง
4. ตู้เลี้ยงเชื้อ
5. อ่างน้ำร้อนแบบควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่อง vortex
7. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป My Taq™ Red Mix (Bioline, USA)
8. ชุดแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล TIANgel Midi DNA Purification Kit (Tiangen, China)
9. ชุดโคลนนิ่งสำเร็จรูป pGEM-T Easy kit (Promega, USA)
10. สีย้อมดีเอ็นเอ SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)
11. อะกาโรส (agarose)
12. ไพรเมอร์ ITAP
13. แบคทีเรีย *E. coli* DH5α
14. เอนไซม์ *Eco*RI
15. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (LB broth และ LB agar plate)
16. บัฟเฟอร์ 1X TBE
17. คลอโรฟอร์ม
18. เอทานอลบริสุทธิ์
19. เอทานอล 75 %

20. Lysis buffer (5 mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.25% w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05 w/v bromophenol blue)

21. สารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

22. สาร X-gal (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside) ความเข้มข้น 20 mg/ml

23. IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside ความเข้มข้น 20 mg/ml

24. modified CTAB buffer (2% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 0.50 M EDTA, 1% (w/v) PVP-40 (PVP = polyvinylpyrrolidone), 0.5% (w/v) sodium metabisulfite)

วิธีการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอ

1. นำใบอ่อนของลำไยปริมาณ 100 g. ใส่ในโกร่ง เติมสารสะลาย mCTAB ซึ่งมี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 µl หรือปรับปริมาตรตามความเหมาะสมของปริมาณใบจากนั้นบดใบลำไยให้ละเอียด เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 300 µl

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ºC เป็นเวลา 40 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 20 นาที

3. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4. ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ โดยห้ามเอาตะกอนมา จากนั้น เติมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10 µlต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC อย่างน้อยเป็นเวลา 30 นาที

5. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 µl แล้วกลับหลอดไปมา

6. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

7. ย้ายชั้นน้ำด้านบนใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมเอทานอลบริสุทธิ์เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย (จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่น) แล้วผสมให้เข้ากัน

9. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 ºC ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

10. เทเอทานอลทิ้ง แล้วเติมเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 75 % เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอนจำนวน 2 ครั้ง)

11. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 ºC ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

12. ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 µl (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติม 10 mM Tris-HCl เพิ่ม เป็น 50-100 µl)

13. วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 90 นาที

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

2.1 การใช้ SRAP ร่วมกับ ITAP combination

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SRAP และ ITAP (ตารางที่ 1) จากรายงานของ Xiong et al. (2013) คือ em4-ITPR1, em4-ITPR2, em8-ITPR3, em10-ITPR3, em5-ITPR5 และ em6-ITPR5 โดยมีขั้นตอน ดังนี้

การเตรียมปฏิกิริยา PCR

- ดีเอ็นเอ (20 ng/µl)	4 µl
- บัฟเฟอร์สำเร็จรูป My Taq ™ HS Red Mix (2x)	10 µl
- ไพรเมอร์ SRAP (5 pmol/µl)	1 µl
- ไพรเมอร์ ITAP (5 pmol/µl)	1 µl
- น้ำกลั่น	4 µl
รวม	20 µl

จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง PCR โดยใช้เวลาและอุณหภูมิ ดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C 4 นาที
ขั้นที่ 2	94 °C 1 นาที (สำหรับ denature)
	35 °C 1 นาที (สำหรับ annealing)
	72 °C 1 นาที (สำหรับ primer extension)
	ทำซ้ำ 5 รอบ
ขั้นที่ 3	94 °C 1 นาที (สำหรับ denature)
	50 °C 1 นาที (สำหรับ annealing)
	72 °C 1 นาที (สำหรับ primer extension)
	ทำซ้ำ 35 รอบ
ขั้นที่ 4	72 °C 5 นาที

นำผลของ PCR มาวิเคราะห์ด้วยการทำ 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส

2.2 การใช้ SRAP และ ITAP primer

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SRAP และ ITAP โดยมีขั้นตอน ดังนี้

การเตรียมปฏิกิริยา PCR

- ดีเอ็นเอ (20 ng/µl)	4 µl
- บัฟเฟอร์สำเร็จรูป My Taq ™ HS Red Mix (2x)	10 µl

- ไพรเมอร์ SRAP หรือ ITAP (5 pmol/µl) 1 µl
- น้ำกลั่น 5 µl

รวม 20 µl

จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง PCR โดยใช้เวลาและอุณหภูมิ ดังนี้

ขั้นที่ 1 94 ºC 4 นาที

ขั้นที่ 2 94 ºC 1 นาที (สำหรับ denature)
35 ºC 1 นาที (สำหรับ annealing)
72 ºC 1 นาที (สำหรับ primer extension)
ทำซ้ำ 5 รอบ

ขั้นที่ 3 94 ºC 1 นาที (สำหรับ denature)
50 ºC 1 นาที (สำหรับ annealing)
72 ºC 1 นาที (สำหรับ primer extension)
ทำซ้ำ 35 รอบ

ขั้นที่ 4 72 ºC 5 นาที

นำผลของ PCR มาวิเคราะห์ด้วยการทำ 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Primer	Primer sequence 5'---3'	Primer	Primer sequence 5'---3'
em1	GACTGCGTACGAATTAAT	em10	GACTGCGTACGAATTTAG
em2	GACTGCGTACGAATTTGC	em11	GACTGCGTACGAATTTCC
em3	GACTGCGTACGAATTGAC	ITPR1	GACTGCGTACCTGCAAAT
em4	GACTGCGTACGAATTTGA	ITPR2	GACTGCGTACCTGCATGC
em5	GACTGCGTACGAATTAAC	ITPR3	GACTGCGTACCTGCAGAC
em6	GACTGCGTACGAATTGCA	ITPR4	GACTGCGTACCTGCAATG
em8	GACTGCGTACGAATTAGC	ITPR5	GACTGCGTACCTGCAGCT
em9	GACTGCGTACGAATTACG		

3. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิค SCAR

3.1 การแยกบริสุทธิ์เจล

นำผลจากเทคนิค RAPD เลือกตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย TIANgel Midi Purification Kit (Tiangen) นำดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้ปริมาตร 2 µl วิเคราะห์ด้วย 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิสเพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 ºC

3.2 การสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) และการถ่ายฝาก (transformation)

การสร้างดีเอ็นเอสายผสม จะใช้ชุดสำเร็จรูป pGEM-T Easy kit (Promega, USA) โดยเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

2X Rapid Ligation buffer	5.0 µl
pGEM-T Easy Vector (50 ng)	0.5 µl
ดีเอ็นที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์	3.5 µl
เอนไซม์ T4 DNA ligase	1.0 µl
รวม	10.0 µl

3.2.1 นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปบ่มที่ 4 ºC ข้ามคืน

3.2.2 ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5α โดยนำดีเอ็นเอสายผสมที่เตรียมไว้มา 10 µl ใส่ในหลอดที่มีเซลล์ competent ปริมาตร 200 µl

3.2.3 บ่มไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ออกมาจากตู้เย็น เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง แล้วทาด้วยสาร X-gal และ IPTG ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.4 เมื่อบ่มหลอดบนน้ำแข็งจนครบเวลาแล้ว ย้ายหลอดไปบ่มในอุณหภูมิ 42 ºC เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 µl นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 30-60 นาที

3.2.5 จากนั้นนำเซลล์มาทาบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่ 37 ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ตู้เย็นประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เห็นสีของโคโลนีชัดเจนมากขึ้น โดยโคโลนีสีขาวเป็นโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม

3.3 การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดของดีเอ็นเอ

ในการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม มีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 นำโคโลนีสีฟ้า (ตัวควบคุม) และโคโลนีสีขาวที่ต้องการคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ข้ามคืน

3.3.2 ดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้ง

3.3.3 เติม lysis buffer ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปบ่มที่ 37 ºC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที

3.3.4 ดูดของเหลวด้านบนมา 20 µl มาวิเคราะห์ขนาดด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใส่โคโลนีสีฟ้าในช่องแรกและช่องสุดท้ายของเจล จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่าโคโลนีสีฟ้ามาสกัดพลาสมิดสายผสม โดยดีเอ็นเอสายผสมจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้า จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป TIANgel Midi Purifiaction Kit

3.4 การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

การวิเคราะห์จะใช้การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้เอนไซม์ *Eco*RI ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

น้ำกลั่น	7.5 µl
10X buffer	2.0 µl
ดีเอ็นเอ	10.0 µl
เอนไซม์ *Eco*RI	0.5 µl
รวม	20.0 µl

3.4.1 นำปฏิกิริยาทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 0.2 ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC ข้ามคืน

3.4.2 วิเคราะห์ผลการตัดด้วยการทำ 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส แล้วคัดเลือกพลาสมิดที่เอนไซม์ *Eco*RI ตัดแล้วให้แถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ITAP ที่แยกบริสุทธิ์ได้

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ส่งดีเอ็นเอสายผสมไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ดังนี้

3.5.1 นำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากบริษัท 1st BASE (Malaysia) มาตัดลำดับเบสที่เป็นของ pGEM-T ออก แล้วบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .txt ด้วยโปรแกรม notepad

3.5.2 นำลำดับเบสไปเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalX แล้วบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .msf แล้วนำไฟล์ไปเปิดดูผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม GeneDoc

3.5.3 คัดเลือกลำดับเบสที่แตกต่าง แล้วนำไปออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพันธุ์ลำไย โดยใช้โปรแกรม Primer3 แล้ว นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ มาทดสอบกับพันธุ์ลำไยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สภาวะเป็น 94 ºC เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำ 45 รอบของ 94 ºC เป็นเวลา 30 วินาที 55 หรือ 65 ºC เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 ºC เป็นเวลา 30 วินาที แล้ว 72 ºC นาน 7 นาที วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยการทำ 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส

4. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไย

4.1 การผสมพันธุ์ลำไย

ดอกลำไยมีขนาดเล็กสีขาวอมเหลือง ในหนึ่งช่อดอก อาจมีดอก 3 ชนิด คือ ดอกเพศผู้ มีเกสรเพศผู้ 6-8 อัน เรียงเป็นชั้นเดียวอยู่บนจานรองดอก (disc) มีสีน้ำตาลอ่อน ก้านชูเกสรเพศผู้มีขน ยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร อับเรณูมี 2 หยัก เมื่อแตกจะแตกตามยาว (longitudinal dehiscence) (พาวินและคณะ, 2547) ดอกเพศผู้จะบานเต็มที่เมื่อมีอายุ 18-20 วัน (อนันต์, 2547) (ภาพที่ 1a) ดอกเพศเมียมีเกสรเพศเมียซึ่งประกอบด้วยรังไข่ที่มี 2 พู ตั้งอยู่ตรงกลางจานรองดอกเป็นแบบรังไข่อยู่เหนือส่วนต่าง ๆ ของดอก ด้านนอกของรังไข่มีขนปกคลุมอยู่ แต่ละพูจะมีเพียง 1 ช่อง (locule) เท่านั้น ที่จะเจริญเติบโตและพัฒนาจนเป็นผล ส่วนอีกพูจะค่อย ๆ ฝ่อ ในบางกรณีอาจพบไข่ในพูทั้งสองเจริญจนเป็นผลได้ เกสรเพศเมียอยู่ตรงกลางระหว่างพู ก้านชูเกสรเพศเมีย (style) ยาวประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ตั้งตรงอยู่ระหว่าง carpel ตรงปลายยอดเกสรเพศเมีย (stigma) แยกออกเป็น 2 แฉก เมื่อเริ่มบานปลายแฉกมีสีขาว (พาวิน และคณะ, 2547) (ภาพที่ 1b) และดอกสมบูรณ์เพศ พบว่า มีทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียในดอกเดียวกัน รังไข่พองเป็นกระเปาะค่อนข้างกลมขนาดเล็กกว่ารังไข่ของดอกเพศเมีย ยอดเกสรเพศเมียจะสั้นกว่าและตรงปลายจะแยกเพียงเล็กน้อยเมื่อดอกบาน ก้านชูอับละอองเกสรของดอกสมบูรณ์เพศจะมีความยาวไม่สม่ำเสมอกัน ดอกสมบูรณ์เพศสามารถติดผลได้เช่นเดียวกับดอกเพศเมีย โดยปกติจะพบดอกสมบูรณ์เพศน้อย อาจพบเพียง 1-2 ดอกต่อช่อ (พาวิน และคณะ, 2547 ; อนันต์, 2547) (ภาพที่ 1c)

ก่อนที่จะทำการผสมพันธุ์ลำไยหนึ่งวันจะต้องเลือกช่อดอกเพศเมียที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง และเป็นช่อดอกที่มีดอกเพศเมียบาน ทำการเด็ดดอกเพศเมียทิ้งให้เหลือไว้ช่อละ 15-20 ดอก แล้วคลุมด้วยถุงตาข่ายมัดปากถุงให้แน่น เพื่อป้องกันการผสมข้ามโดยแมลง จากนั้น

เลือกช่อดอกตัวผู้ ที่มีความแข็งแรงแล้วคลุมด้วยถุงตาข่ายไว้ หลังจากนั้นในวันถัดมาทำการเก็บเกสรเพศผู้ที่บานจากต้นในตอนเช้าเวลาประมาณ 07.00-9.00 น. ถ้าดอกเพศผู้ไม่บาน ให้นำไปบ่มด้วยความร้อนจากหลอดไฟขนาด 40 วัตต์ เมื่อละอองเกสรเริ่มแตกก็นำไปใช้ผสมได้ โดยมีวิธีการผสมข้าม คือ นำละอองเกสรเพศผู้ที่แตกแล้วไปแตะบนยอดเกสรตัวเมีย (ภาพที่ 2) ซึ่งเกสรเพศเมียที่พร้อมจะได้รับการผสมจะมีน้ำหวานเหนียวๆ ไหลออกมาบริเวณฐานรองดอก เมื่อผสมเกสรเสร็จแล้ว ให้ใช้ถุงตาข่ายคลุมไว้เหมือนเดิม มัดปากถุงให้แน่น พร้อมกับเขียนป้าย โดยระบุชื่อพ่อและแม่พันธุ์ วันที่ผสม

ภาพที่ 1 ดอกลำไย (a) ดอกเพศผู้ (b) ดอกเพศเมีย (c) ดอกสมบูรณ์เพศ

ภาพที่ 2 การผสมข้ามพันธุ์ลำไย

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การสกัดดีเอ็นเอลำไย

เมื่อนำใบอ่อนลำไยมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี mCTAB โดยเพิ่มเวลาในบ่มที่อุณหภูมิ 65°C จาก 20 นาที เป็น 40 นาที แล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นและคุณภาพที่ของดีเอ็นเอด้วยการทำ 1% เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 3 และ 4) จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ พบว่าลำไยจำนวน 29 พันธุ์ มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ดังนี้

1. พันธุ์คอก้านแข็ง-2	มีความเข้มข้น 30 ng/µl
2. คอ 27-1	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
3. คอหลวง-2	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
4. คอยอดแดง-1	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
5. คอแก้วยี่-1	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
6. สีชมพู-7	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
7. เบี้ยวเขียวเชียงใหม่-2	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
8. พวงทอง-5	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
9. กรอบกะทิ-1	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
10. แห้ว-80	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
11. ใบดำ-4	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
12. ใบหยก-1	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
13. จัมโบ-1	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
14. บ้านโฮ่ง 60-2	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
15. แดงกลม-5	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
16. น้ำผึ้งทะวาย	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
17. ปู่มาตีนโค้ง-1	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
18. ลำไยต้นหมื่น	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
19. พื้นเมือง-92	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
20. เพชรสาคร-10	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
21. ปิงปอง-116	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
22. เถา-117	มีความเข้มข้น 25 ng/µl
23. ฉู่เหลียง-64	มีความเข้มข้น 25 ng/µl

24. ดอลุ่มน้ำปิง-4 มีความเข้มข้น 25 ng/µl

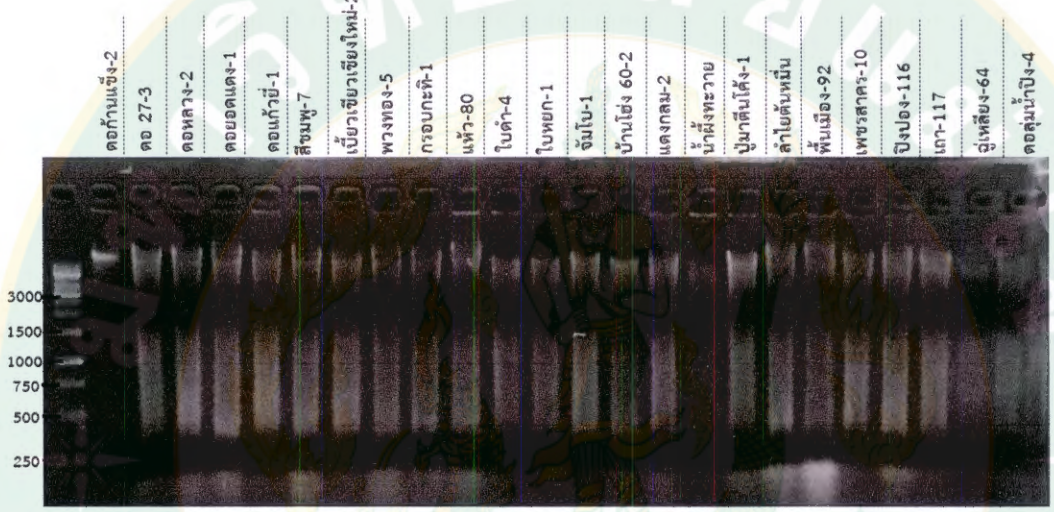
25. ดอสุขุม-3 มีความเข้มข้น 30 ng/µl

26. ดอ 75-1 มีความเข้มข้น 30 ng/µl

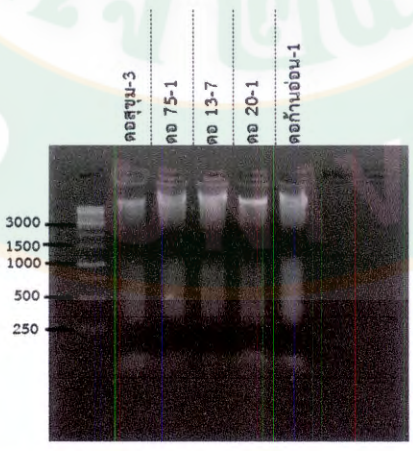
27. ดอ 13-7 มีความเข้มข้น 30 ng/µl

28. ดอ 20-1 มีความเข้มข้น 30 ng/µl

29. ดอก้านอ่อน-1 มีความเข้มข้น 30 ng/µl



ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นและคุณภาพที่ของดีเอ็นเอลำไยจำนวน 24 พันธุ์ ที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสเจล

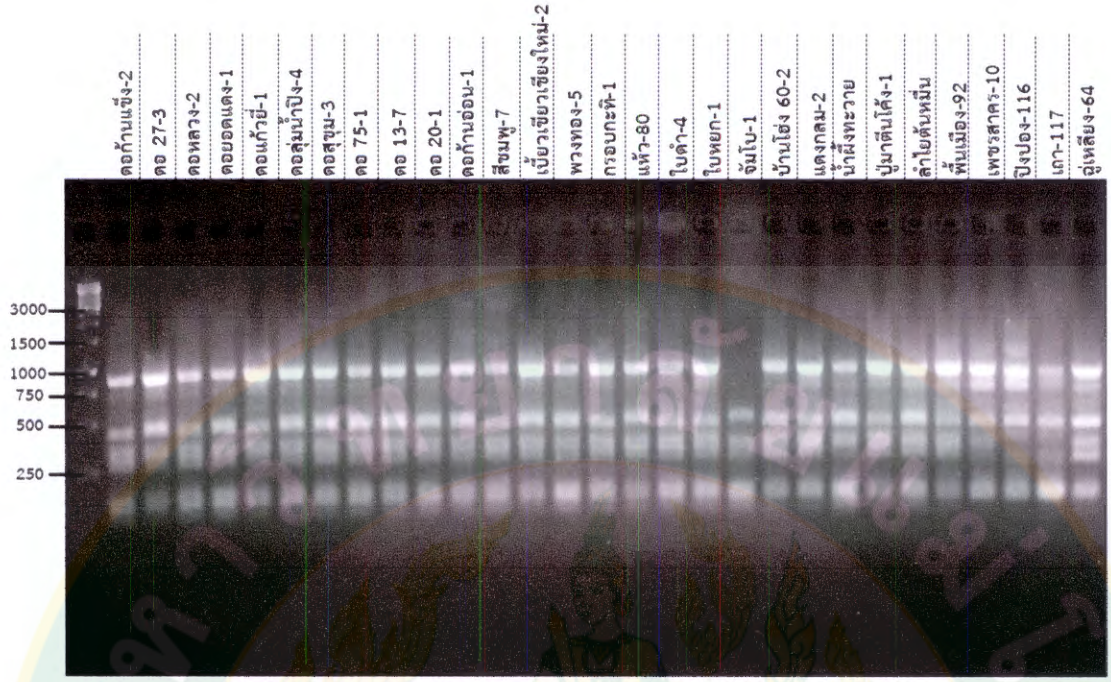


ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นและคุณภาพที่ของดีเอ็นเอลำไยจำนวน 5 พันธุ์ ที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสเจล

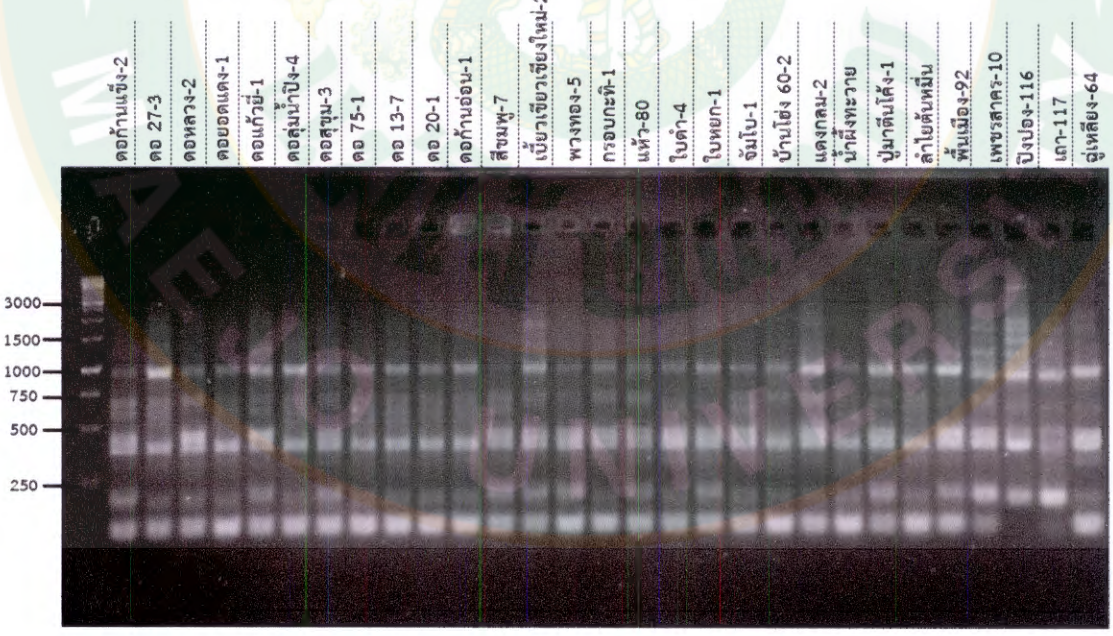
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ร่วมกับ ITAP

จากการใช้ไพรเมอร์ SRAP ร่วมกับไพรเมอร์ ITAP จำนวน 6 คู่ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยทั้ง 29 พันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ em4-ITPR1 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 5 แถบ มีขนาด 180-800 bp และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic จำนวน 3 แถบ คิดเป็น 60 % (ภาพที่ 5) ไพรเมอร์ em4-ITPR2 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ ขนาด 200-900 bp และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic จำนวน 4 แถบ คิดเป็น 66.67 % (ภาพที่ 6) ไพรเมอร์ em5-ITPR5 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ ขนาด 100-1,500 bp และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic จำนวน 4 แถบ คิดเป็น 87.50 % (ภาพที่ 7) ไพรเมอร์ em6-ITPR5 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ ขนาด 250-1,000 bp และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic จำนวน 9 แถบ คิดเป็น 90 % (ภาพที่ 8) ไพรเมอร์ em8-ITPR3 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ ขนาด 100-1,400 bp และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic จำนวน 8 แถบ คิดเป็น 100 % (ภาพที่ 9) ไพรเมอร์ em10-ITPR3 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ ขนาด 100-3,000 bp และมีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic จำนวน 12 แถบ คิดเป็น 100 % (ภาพที่ 10) ซึ่งแสดงข้อมูลในตารางที่ 2

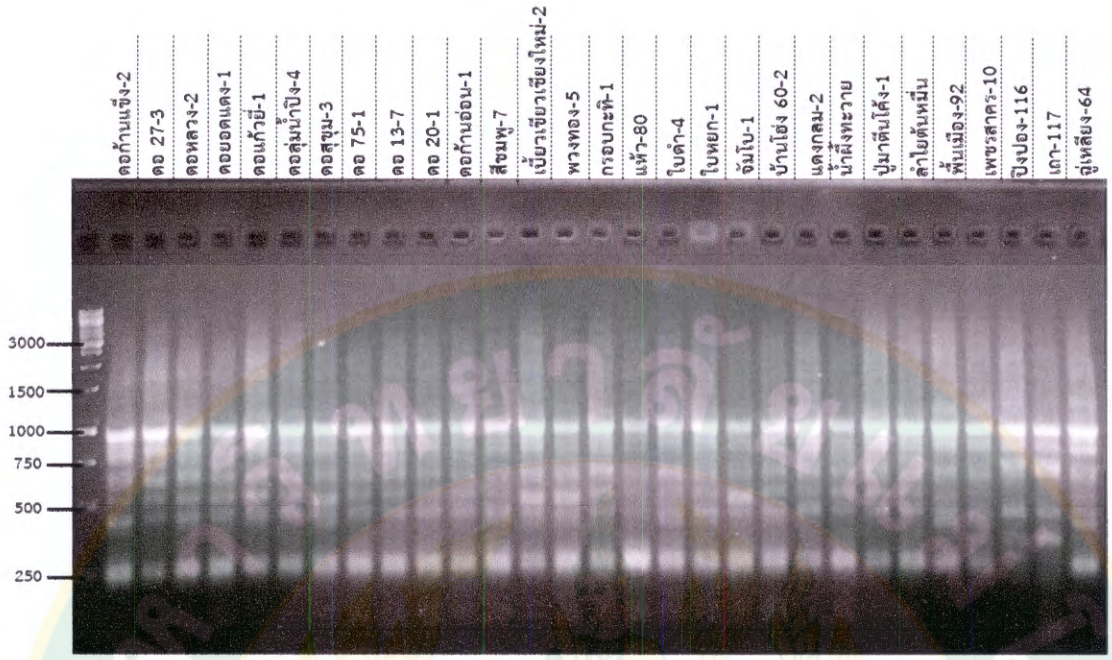
ภาพที่ 5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em4-ITPR1



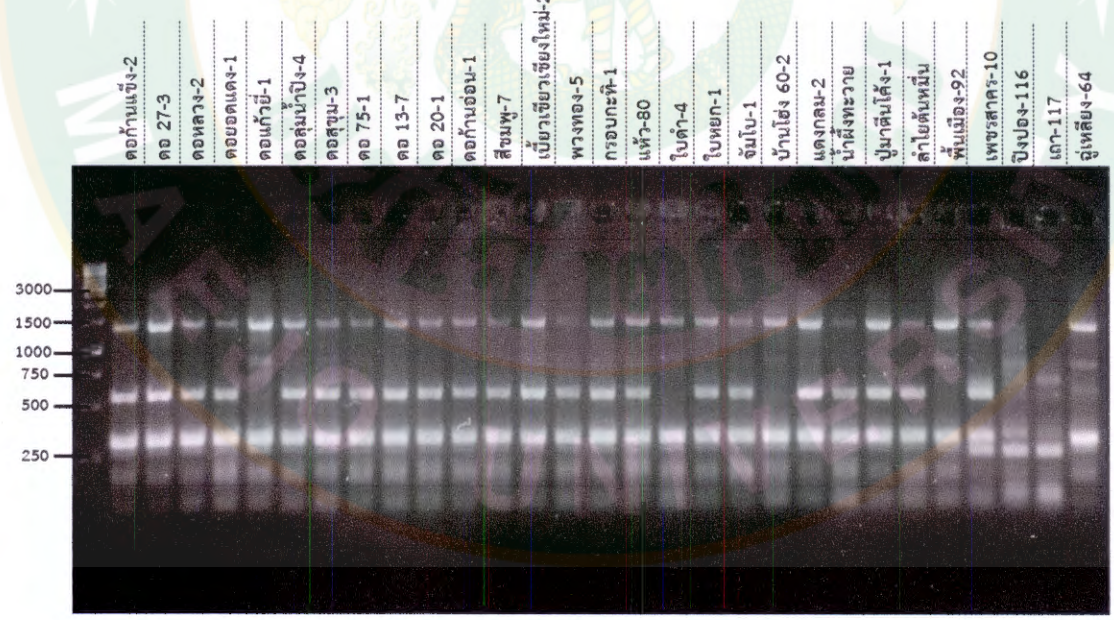
ภาพที่ 6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em4-ITPR2



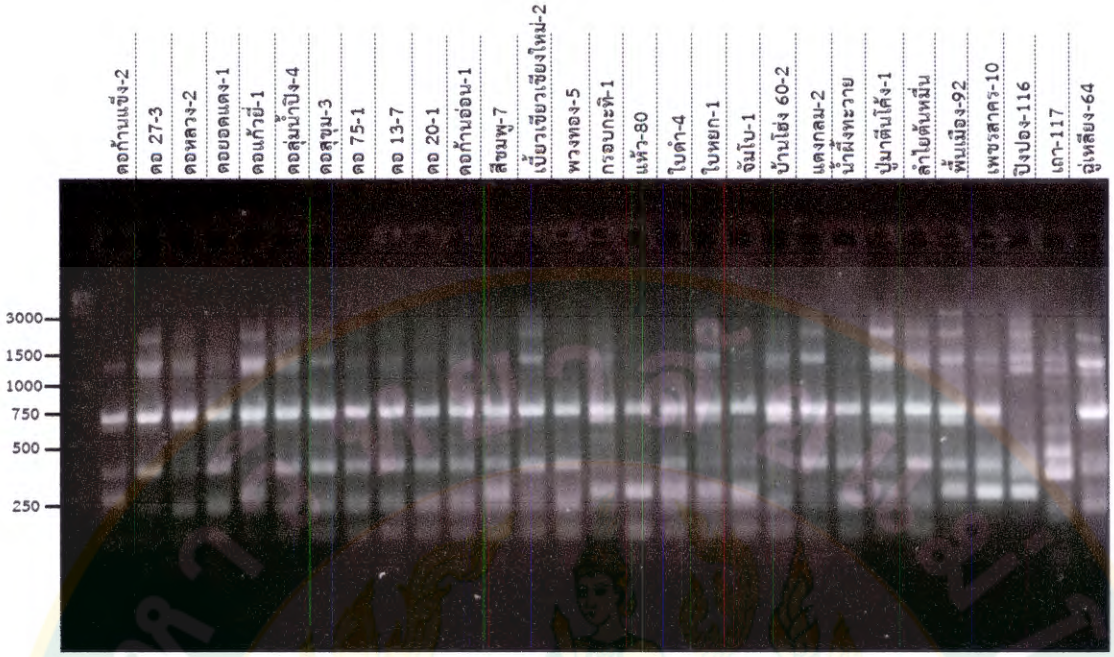
ภาพที่ 7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em5-ITPR5



ภาพที่ 8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em6-ITPR5



ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em8-ITPR3



ภาพที่ 10 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em10-ITPR3

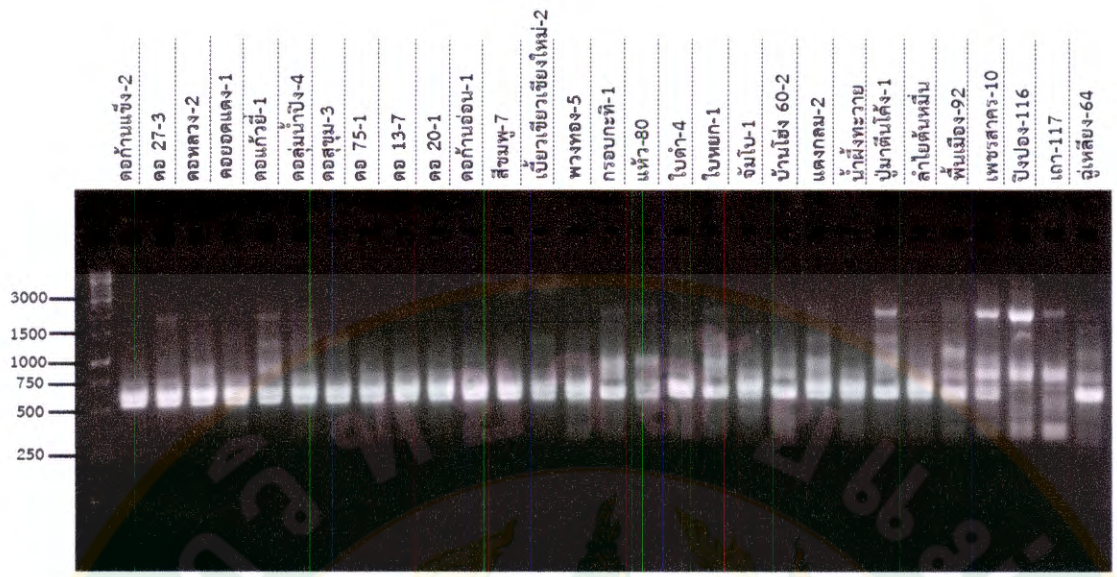
ตารางที่ 2 แถบดีเอ็นเอทั้งหมดและ% polymorphic ที่ใช้ไพรเมอร์ SRAP ร่วมกับ ITAP

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	% polymorphic	ขนาด
em4-ITPR1	5	60%	180-800 bp
em4- ITPR2	6	66.67%	200-900 bp
em5- ITPR5	8	87.50%	100-1,000 bp
em6- ITPR5	10	90%	250-1,000 bp
em8- ITPR3	8	100%	100-1,400 bp
em10- ITPR3	12	100%	100-3,000 bp

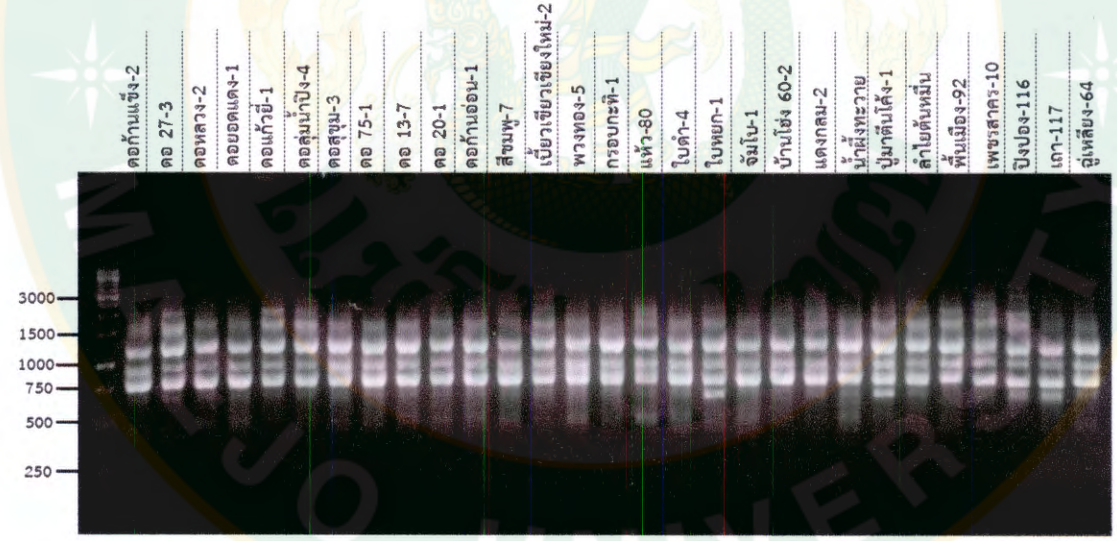
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไย จำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ SRAP ร่วมกับ ITAP ข้างต้น มีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic ตั้งแต่ 60-100% ในขณะที่ Xiong et al. (2013) ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 8 พันธุ์ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphic ตั้งแต่ 44.44-100 % อาจเป็นเพราะจำนวนพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาและฐานพันธุกรรมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าจากการจับคู่กันของไพรเมอร์ จำนวน 6 คู่ ยังไม่พบแถบดีเอ็นเอที่สามารถนำมาพัฒนาเป็น

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR ได้ เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ลำไย จึงนำไพรเมอร์ SRAP จำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ em1, em2, em3, em4, em5, em6, em7, em8, em9, em10 และ em11 และ ITPR จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ ITPR1, ITPR2, ITPR3, ITPR4 และ ITPR5 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยทั้ง 29 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์เพียงเส้นเดียวในการทำหน้าที่ทั้ง forward และ reverse พบว่า ไพรเมอร์ em1 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ มีขนาดประมาณ 300-2,000 bp ไพรเมอร์ em2 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ มีขนาดประมาณ 600-2,000 bp ไพรเมอร์ em3 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ มีขนาดประมาณ 500-2,500 bp ไพรเมอร์ em4 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ มีขนาดประมาณ 600-1,400 bp ไพรเมอร์ em5 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ มีขนาดประมาณ 260-3,000 bp ไพรเมอร์ em6 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ มีขนาดประมาณ 500-1,500 bp ไพรเมอร์ em7 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ มีขนาดประมาณ 250-1,700 bp ไพรเมอร์ em8 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ มีขนาดประมาณ 250-2,000 bp ไพรเมอร์ em9 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ มีขนาดประมาณ 300-1,500 bp ไพรเมอร์ em10 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ มีขนาดประมาณ 250-2,000 bp ไพรเมอร์ em11 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 9 แถบ มีขนาดประมาณ 700-1,600 bp ไพรเมอร์ ITPR1 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ มีขนาดประมาณ 200-1,700 bp ไพรเมอร์ ITPR2 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 9 แถบ มีขนาดประมาณ 400-2,500 bp ไพรเมอร์ ITPR3 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 13 แถบ มีขนาดประมาณ 750-3,000 bp ไพรเมอร์ ITPR4 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ มีขนาดประมาณ 400-1,600 bp ไพรเมอร์ ITPR5 มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 9 แถบ มีขนาดประมาณ 800-3,000 bp (ภาพที่ 11-26)

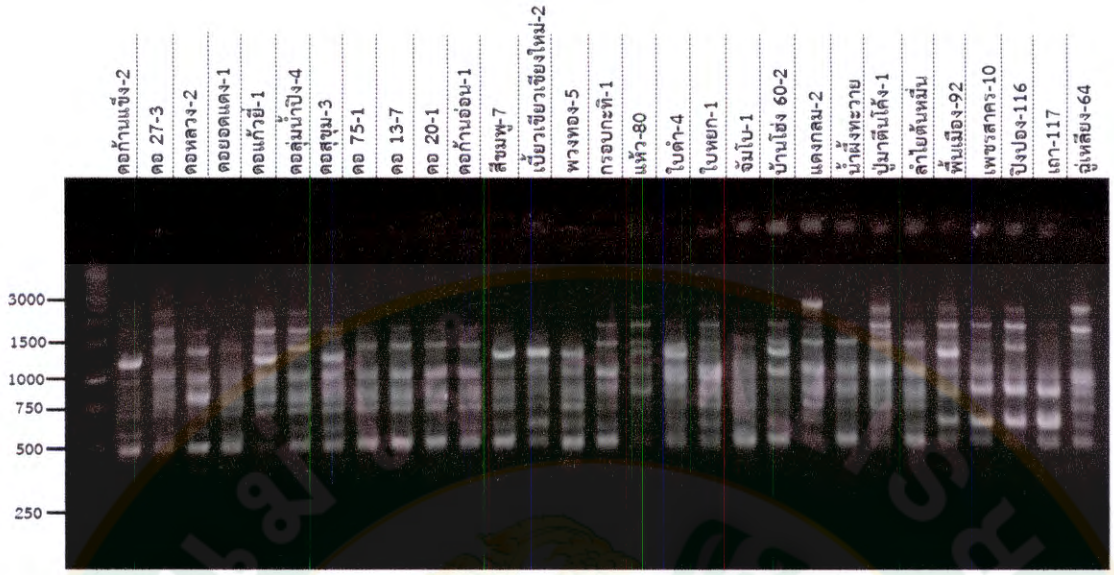
แต่ทั้งไพรเมอร์ SRAP และ ITAP เมื่อทำซ้ำแล้วเกิดแถบดีเอ็นเอไม่เหมือนเดิม ซึ่งไพรเมอร์แบบสุ่มจะมีข้อจำกัดในการทำซ้ำ และการใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ต่ำ ทำให้ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง ส่งผลให้เกิดแถบดีเอ็นเอได้หลายแถบ (สุรินทร์, 2552) แต่พบว่า ไพรเมอร์ ITPR3 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 bp เกิดขึ้นในลำไยพันธุ์ดอหลวง ใบคำ และพื้นเมือง ในขณะที่ลำไยพันธุ์อื่นๆ ไม่มี เมื่อทำซ้ำพบว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 bp ในลำไยทั้ง 3 พันธุ์ ยังสามารถเกิดขึ้นได้เหมือนเดิม ซึ่งจะนำแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 bp ที่มีสัญลักษณ์→ จากไพรเมอร์ ITPR3 (ภาพที่ 24) ไปพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR ต่อไป



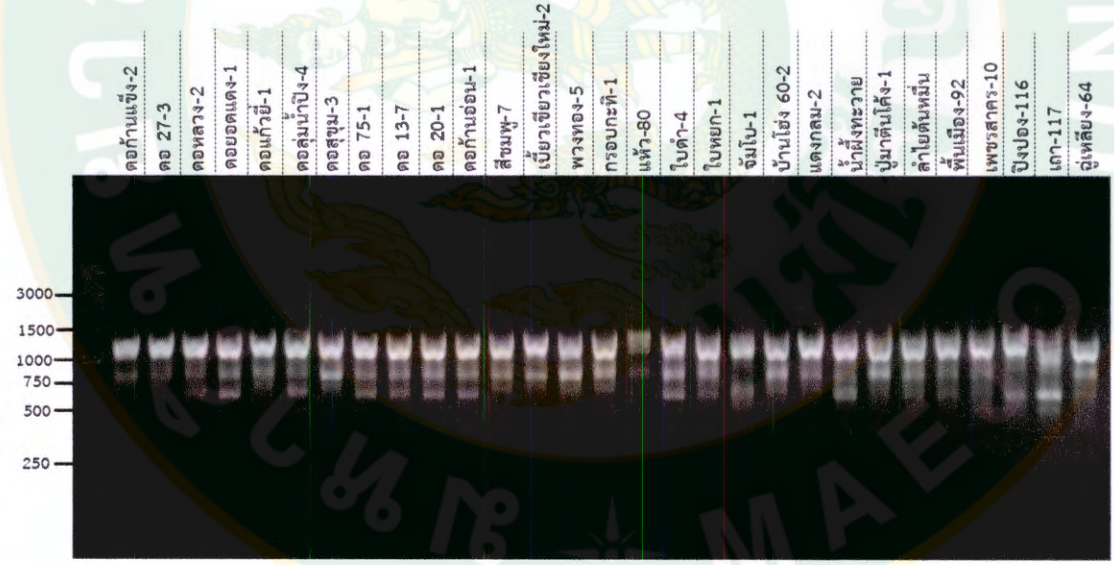
ภาพที่ 11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em1



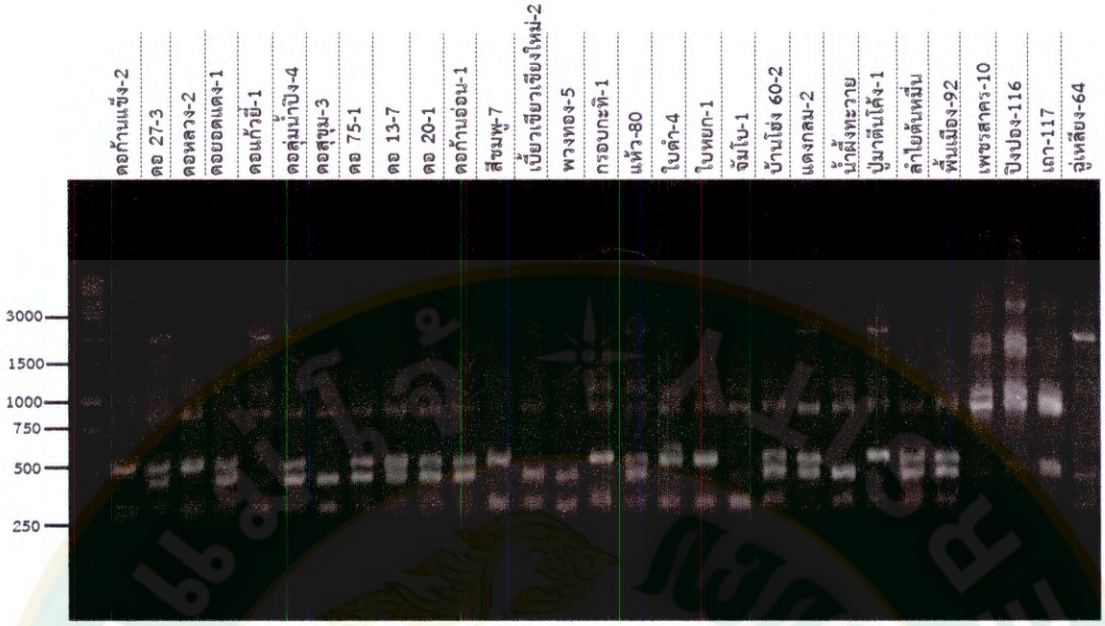
ภาพที่ 12 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em2



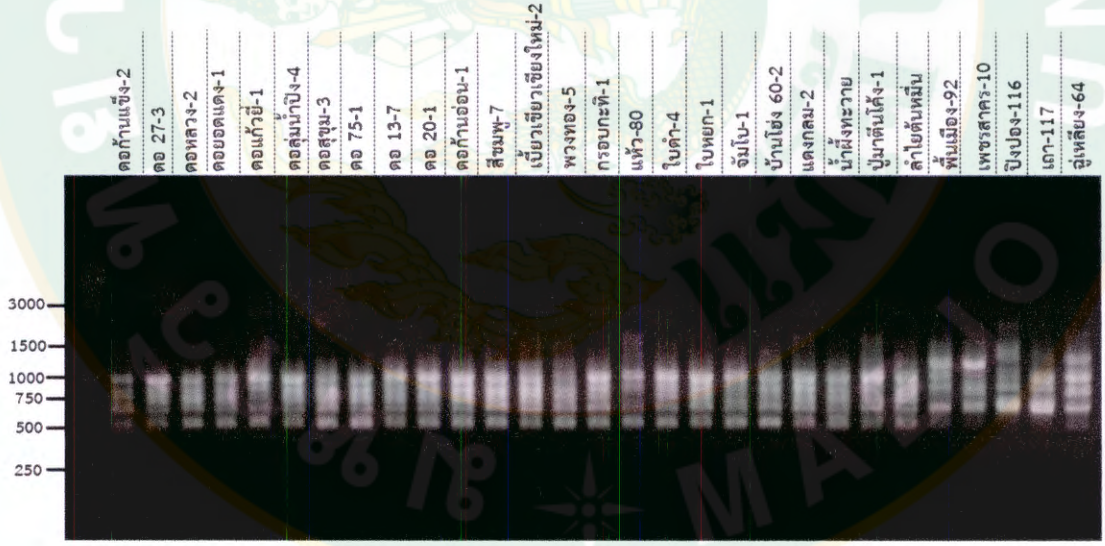
ภาพที่ 13 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em3



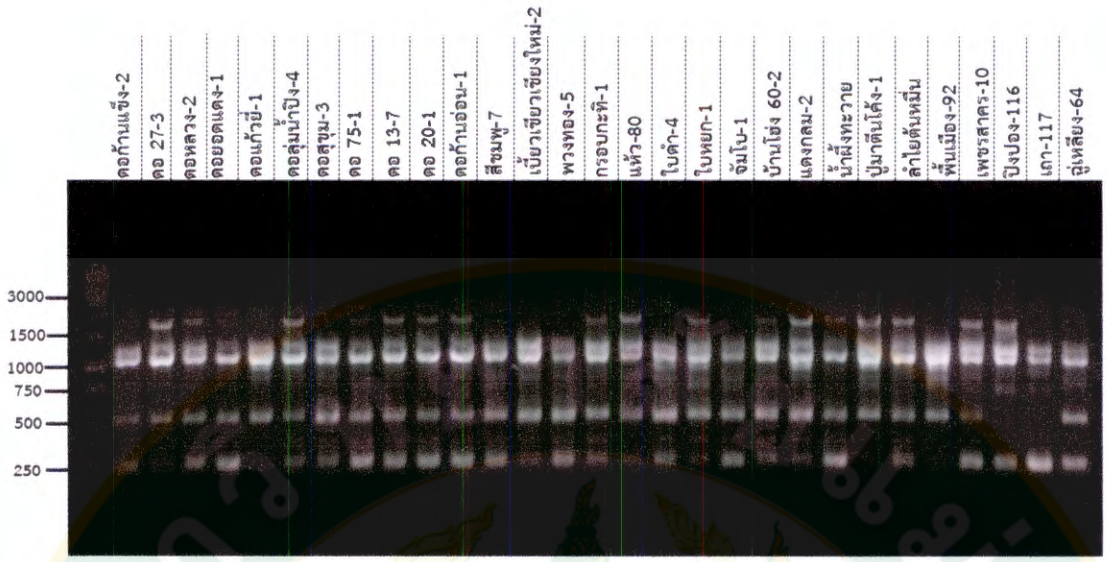
ภาพที่ 14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em4



ภาพที่ 15 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em5



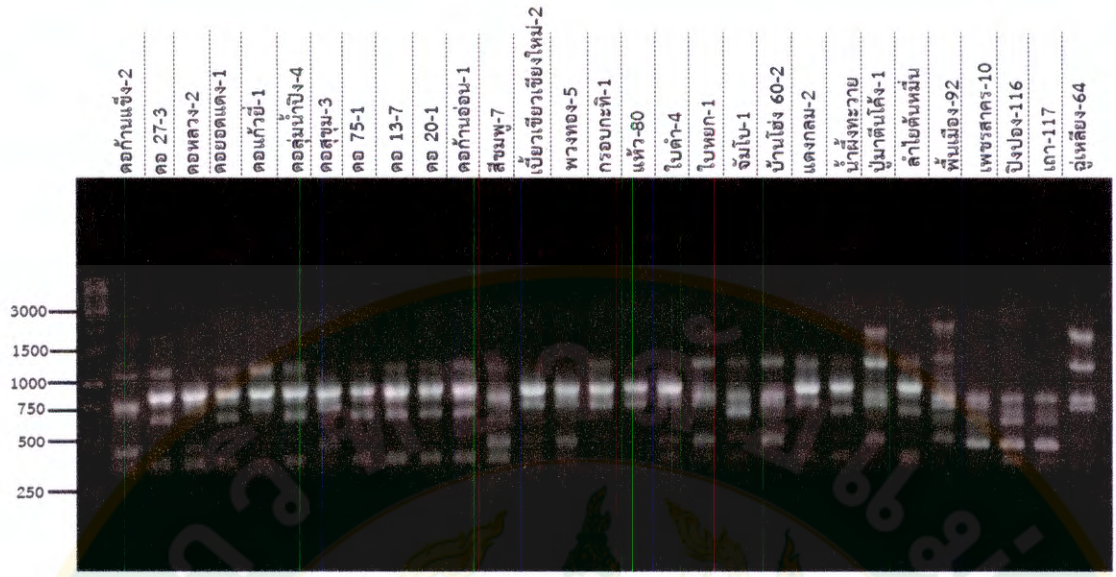
ภาพที่ 16 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em6



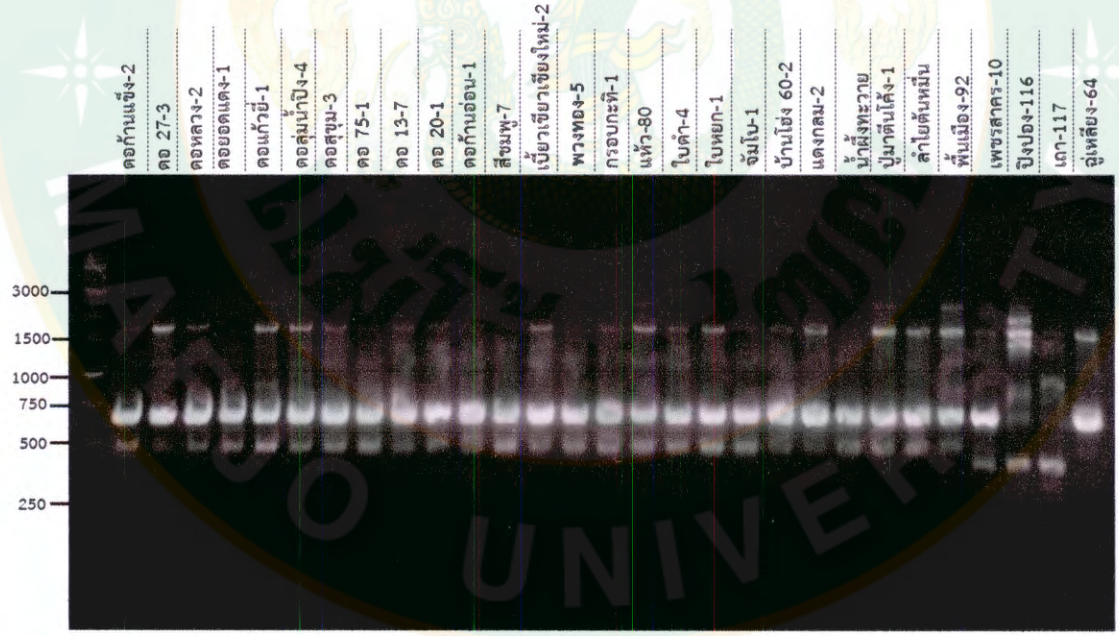
ภาพที่ 17 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em7

ภาพที่ 18 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em8

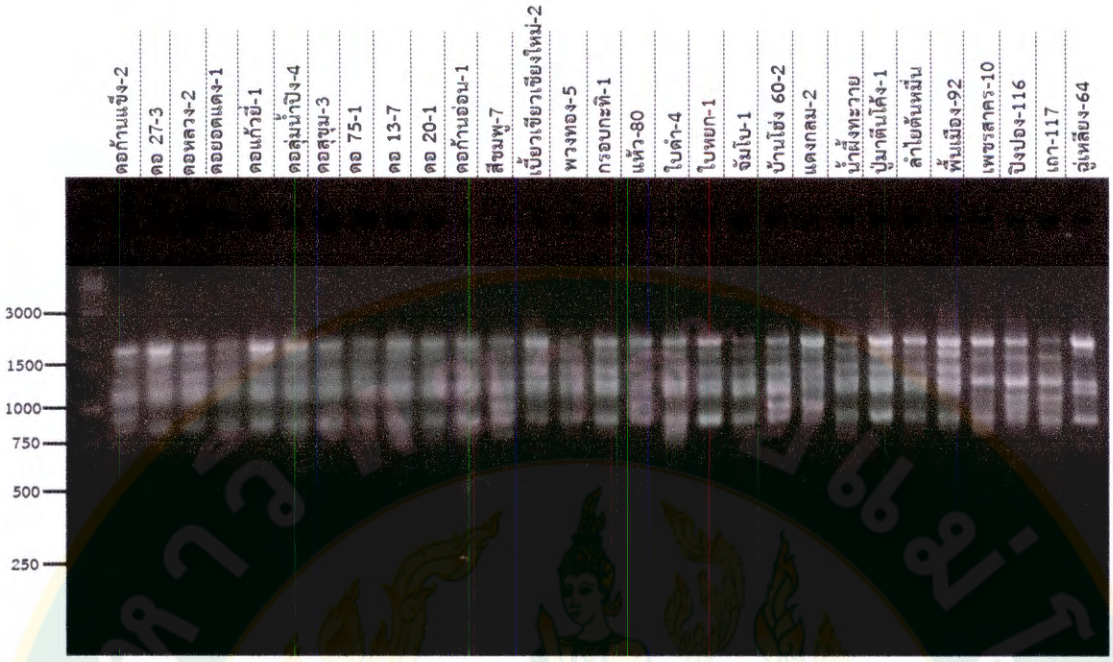
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้



ภาพที่ 19 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em9

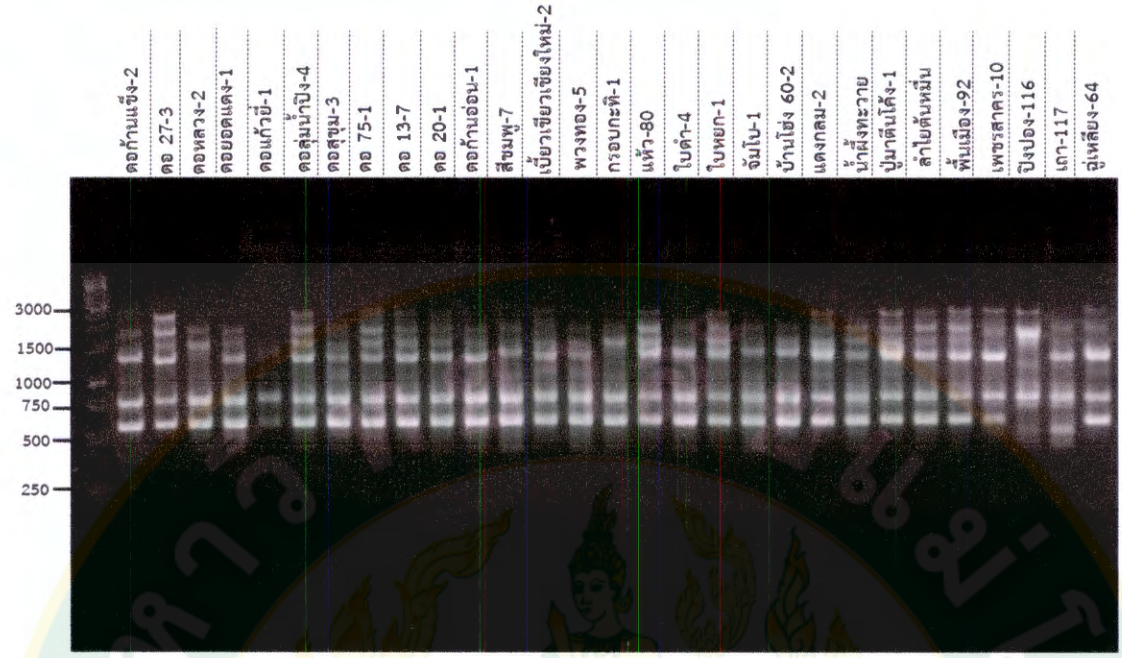


ภาพที่ 20 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em10

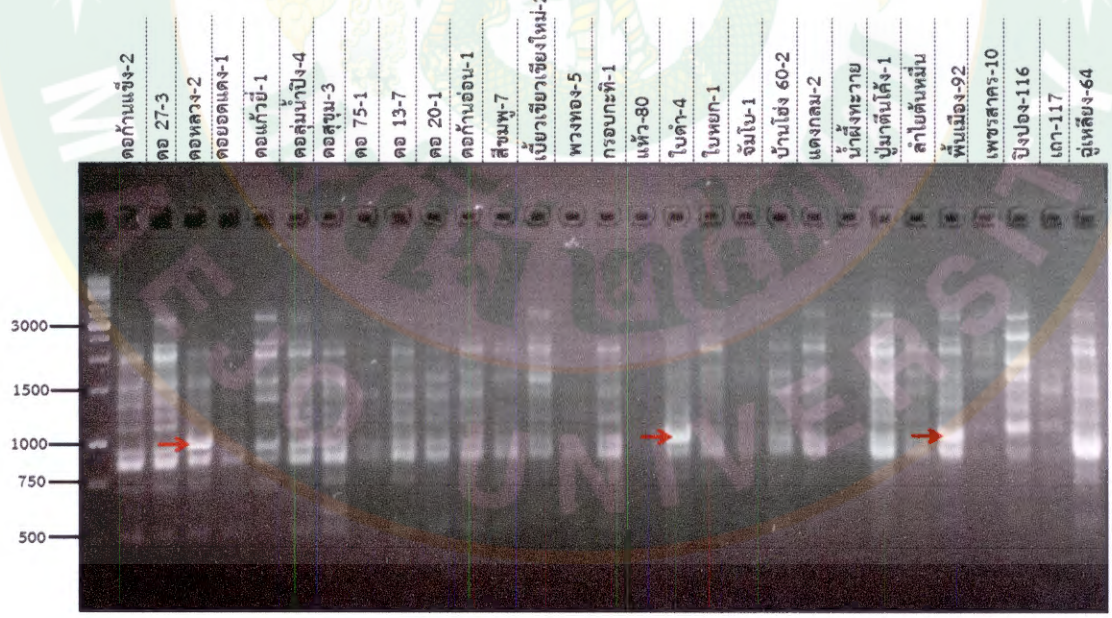


ภาพที่ 21 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ em11

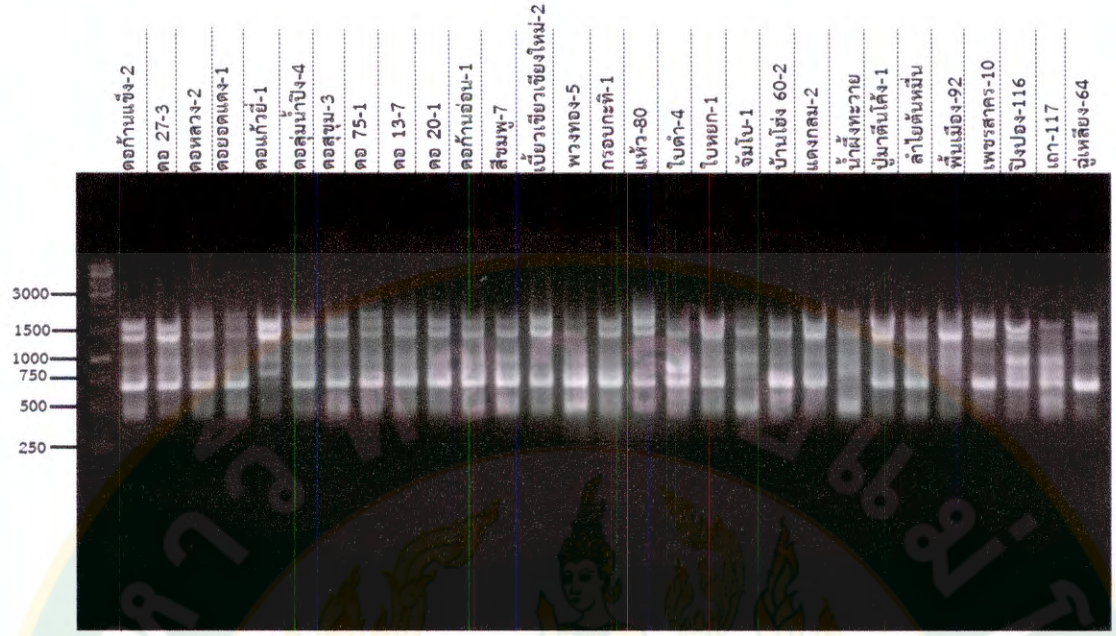
ภาพที่ 22 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR1



ภาพที่ 23 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR2



ภาพที่ 24 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR3

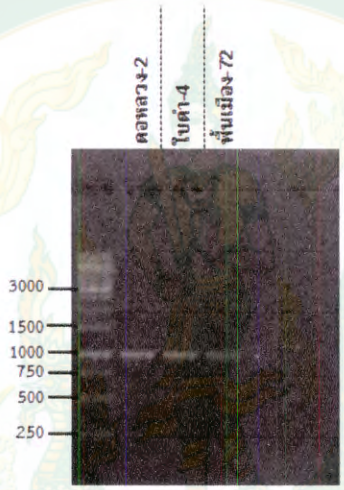


ภาพที่ 25 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR4

ภาพที่ 26 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR5

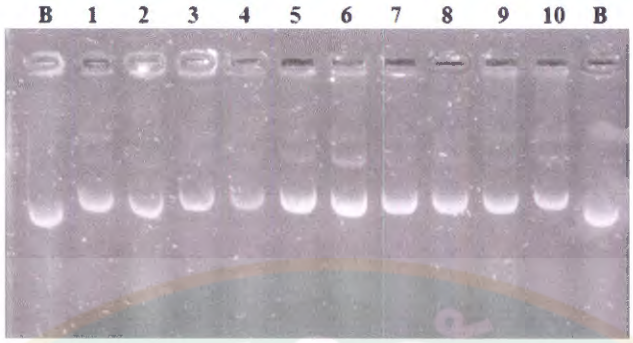
การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR

การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เริ่มจากการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITPR3 ของพันธุ์ลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ซึ่งพบว่ามีลำไยจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ดอหลวง-2, ใบดำ-4 และพื้นเมือง-72 เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ที่แตกต่างจากลำไยพันธุ์อื่น ๆ จึงตัดแถบดีเอ็นเอของลำไยทั้ง 3 พันธุ์ที่แตกต่างจากพันธุ์อื่น ๆ แล้วนำไปแยกบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป TIANgel Midi Purification (Tiangen, China) ได้เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส จำนวน 3 ตัวอย่าง มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากัน คือ ประมาณ 30 ng/µl (ภาพที่ 27)



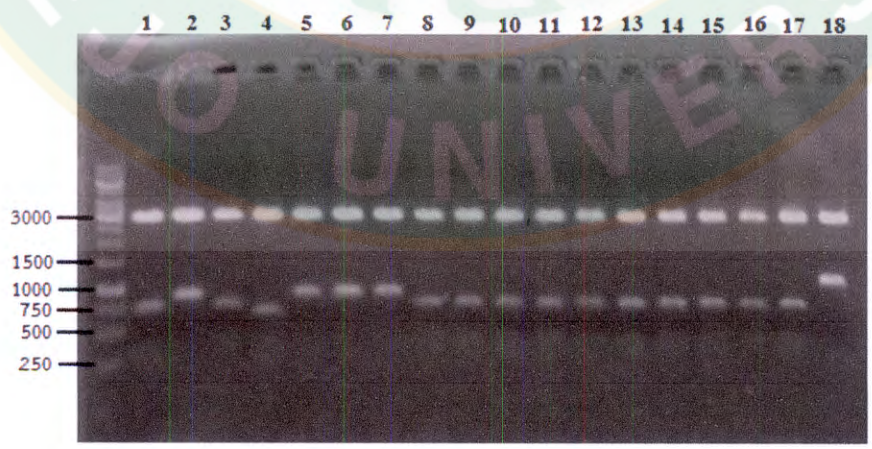
ภาพที่ 27 การแยกบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ITPR3 ของลำไย 3 พันธุ์

จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้ไปสร้างดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้ชุดสำเร็จรูป pGEM-T Easy (Promega, USA) และถ่ายฝากดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5α ได้เป็นโคโลนีสีขาว นำมาคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากขนาดด้วย lysis buffer (5 mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.25% w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05 w/v bromophenol blue) แล้ววิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใส่โคโลนีสีฟ้าในช่องแรกและช่องสุดท้ายของเจลเป็นตัวควบคุมเนื่องจากเป็นโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะ จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้ากว่าโคโลนีสีฟ้ามาสกัดพลาสมิด เนื่องจากดีเอ็นเอสายผสมจะต้องมีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอพาหะจึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้า (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิสจากการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

ทำการคัดเลือกได้โคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะเป็นดีเอ็นเอสายผสมจำนวน 18 โคโลนี จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป TIANprep Mini Plasmid Kit (Tiangen, China) แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI วิเคราะห์ด้วย 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส โดยช่องที่ 1-6 คือ ดีเอ็นเอสายผสมของลำไยพันธุ์ดอหลวง-2 ช่องที่ 7-12 คือ ดีเอ็นเอสายผสมของลำไยพันธุ์ใบดำ-4 และช่องที่ 13-18 คือ ดีเอ็นเอสายผสมของลำไยพันธุ์พื้นเมือง-72 พบว่าหลังจากตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แล้ว โคลนของลำไยพันธุ์ดอหลวง-2 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 600 bp (โคลนที่ 4) 750 bp (โคลนที่ 1 และ 3) และ 1,000 bp (โคลนที่ 2, 5 และ 6) โคลนของลำไยพันธุ์ใบดำ-4 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 750 bp (โคลนที่ 8-12) และ 1,000 bp (โคลนที่ 7) โคลนของลำไยพันธุ์พื้นเมือง-72 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 750 bp (โคลนที่ 13-17) และ 1,200 bp (โคลนที่ 18) คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) โดยเลือกตัวอย่างในช่องที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 15 และ 18 จำนวน 11 ตัวอย่าง (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

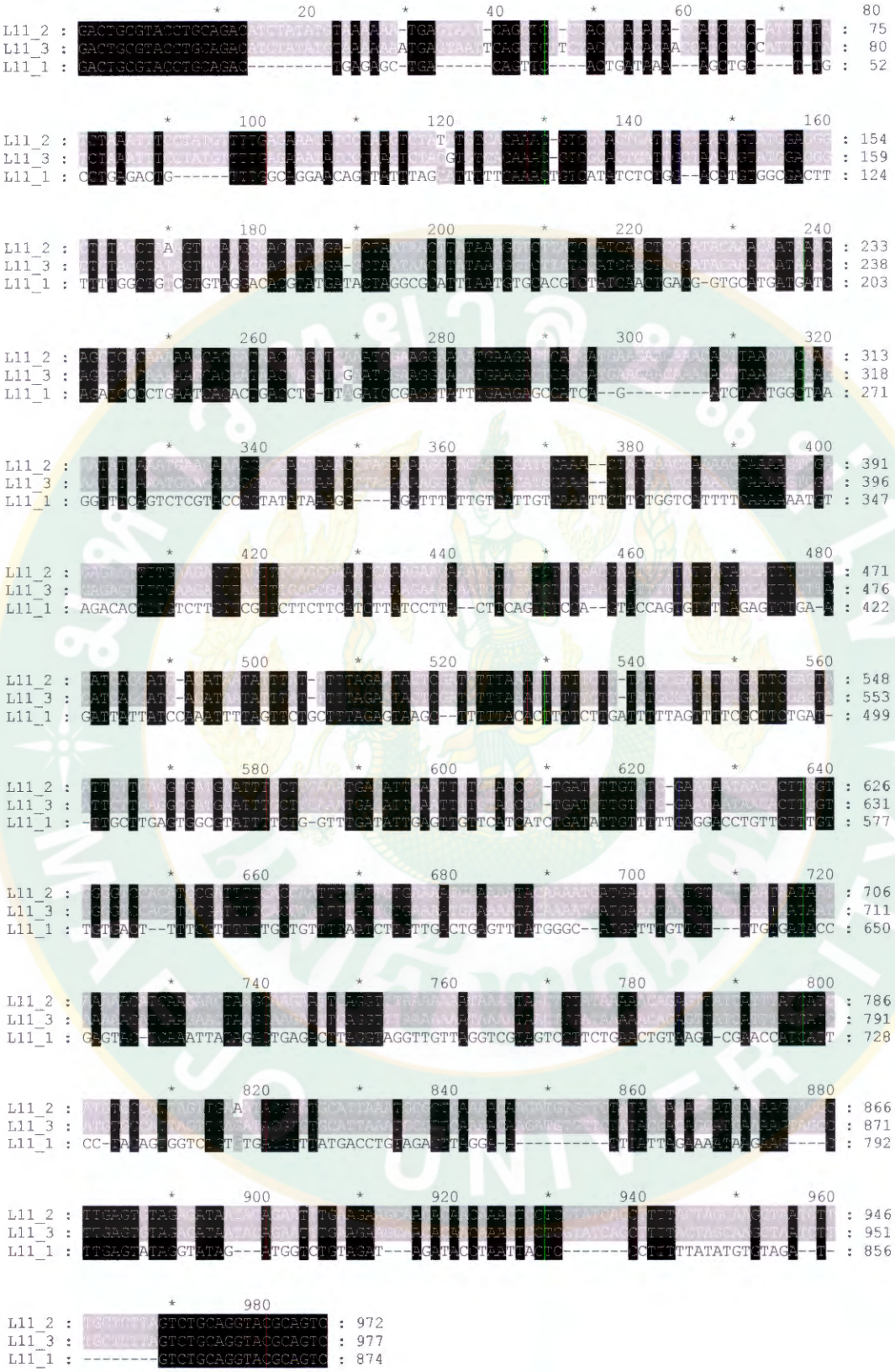
เมื่อได้ผลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้ จำนวน 11 โคลน แล้วนำมา blast กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับเบสที่ได้จากทั้ง 11 โคลนนั้นไม่ตรงกับลำดับเบสใด ๆ ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูลเลย จากนั้นนำลำดับเบสมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalX บันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .msf แล้วเปิดไฟล์ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม GeneDoc ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

จากการส่งตัวอย่างของลำไยพันธุ์ดอหลวง-2 จำนวน 5 โคลน คือ โคลนที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า โคลนที่ 2, 5, และ 6 มีความยาวของลำดับเบสเหมือนกันยาว 861 เบส ส่วนโคลนที่ 3 และ 4 ลำดับเบสจำนวน 971 และ 803 เบส ตามลำดับ ซึ่งโคลนทั้งสองมีลำดับเบสแตกต่างจากโคลนอื่น ๆ (ภาพที่ 30) จึงเลือกลำดับเบสของโคลนที่ 2 ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่มแรก และโคลนที่ 3 มาออกแบบไพรเมอร์

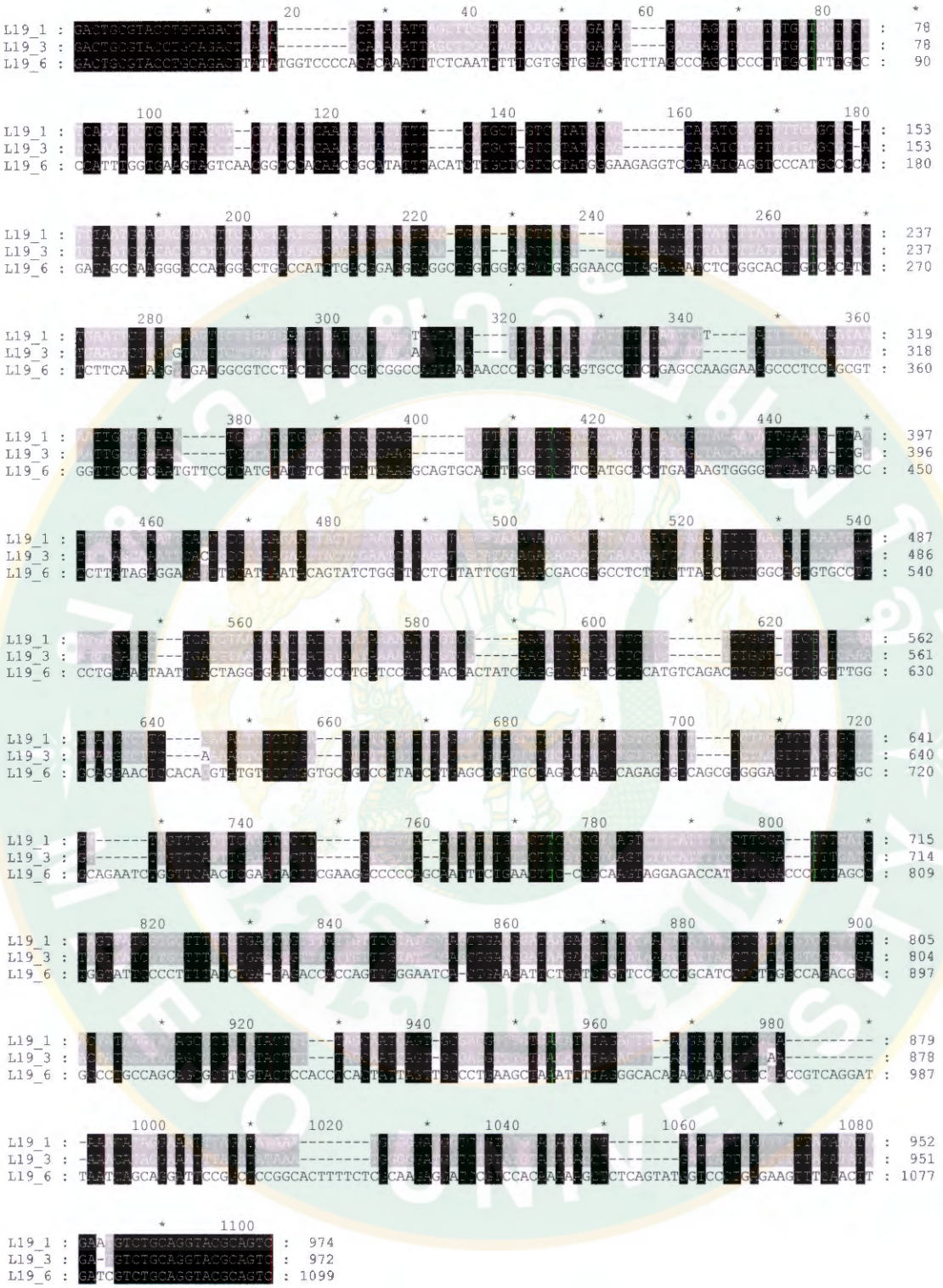
จากการส่งตัวอย่างของลำไยพันธุ์ใบดำ-4 จำนวน 3 โคลน คือ โคลนที่ 1, 2, และ 3 ไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า โคลนที่ 1, 2, และ 3 มีความยาวของลำดับเบส คือ 874, 972 และ 977 เบส ตามลำดับ ซึ่งโคลนที่ 2 และ 3 มีลำดับเบสคล้ายคลึงกัน โดยมีลำดับเบสแตกต่างกัน 10 ตำแหน่ง ในขณะที่โคลนที่ 1 มีลำดับเบสแตกต่างจากโคลนทั้งสอง (ภาพที่ 31) จึงเลือกลำดับเบสของทั้ง 3 โคลน มาออกแบบไพรเมอร์

จากการส่งตัวอย่างของลำไยพันธุ์พื้นเมือง-72 จำนวน 3 โคลน คือ โคลนที่ 1, 3, และ 6 ไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า โคลนที่ 1, 3, และ 6 มีความยาวของลำดับเบส คือ 974, 972 และ 1,099 เบส ตามลำดับ โดยโคลนที่ 1 และ 3 มีลำดับเบสเหมือนกัน มีตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 7 ตำแหน่งเท่านั้น ในขณะที่โคลนที่ 6 มีลำดับเบสแตกต่างจากโคลนทั้งสอง (ภาพที่ 32) จึงเลือกลำดับเบสของโคลนที่ 1 และ 6 มาออกแบบไพรเมอร์

ภาพที่ 30 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของลำไยพันธุ์ดอหลวง-2 ที่ได้จากไพรเมอร์ ITPR3



ภาพที่ 31 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของลำไยพันธุ์ใบดำ-4 ที่ได้จากไพรเมอร์ ITPR3



ภาพที่ 32 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของลำไยพันธุ์พื้นเมือง-72 ที่ได้จากไพรเมอร์ ITPR3

การออกแบบไพรเมอร์ SCAR

คัดเลือกลำดับเบสที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม clustalX เพื่อนำไปออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) โดยโคลนที่ได้จากลำไยพันธุ์ดอหลวง-2 เลือก L3_2 และ L3_3 มาออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งทั้งสองโคลนมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน ส่วนโคลนที่ได้จากลำไยพันธุ์ใบดำ-4 เลือกทั้ง 3 โคลน มาออกแบบไพรเมอร์ และโคลนที่ได้จากลำไยพันธุ์พื้นเมือง-72 เลือก L19_1 และ L19_6 มาออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งทั้งสองโคลนมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน ซึ่งผลการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3Plus มีดังนี้

- ไพรเมอร์ L3_2 เส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 662 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60.1°C และ% GC เท่ากับ 50 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 849 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.9°C และ% GC เท่ากับ 55 มี PCR product 188 bp

- ไพรเมอร์ L3_3 เส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 4 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.9°C และ% GC เท่ากับ 50 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 228 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.8°C และ% GC เท่ากับ 55 มี PCR product 225 bp

- ไพรเมอร์ LG3_3 ออกแบบมาจากโคลน L3_3 แต่ตำแหน่งของไพรเมอร์ต่างกัน โดยเส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 125 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60°C และ% GC เท่ากับ 45 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 361 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.1°C และ% GC เท่ากับ 50 มี PCR product 237 bp

- ไพรเมอร์ L11_1 เส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 682 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.5°C และ% GC เท่ากับ 50 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 838 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60.2°C และ% GC เท่ากับ 50 มี PCR product 157 bp

- ไพรเมอร์ L11_2 เส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 135 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60°C และ% GC เท่ากับ 45 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 371 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.1°C และ% GC เท่ากับ 50 มี PCR product 237 bp

- ไพรเมอร์ L11_3 เส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 765 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.8°C และ% GC เท่ากับ 55 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 1,003 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.9°C และ% GC เท่ากับ 55 มี PCR product 239 bp

- ไพรเมอร์ LG11_3 ออกแบบมาจากโคลน L11_3 แต่ตำแหน่งของไพรเมอร์ต่างกัน โดยเส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 127 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60.1°C และ% GC เท่ากับ 50

ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 367 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60°C และ% GC เท่ากับ 50 มี PCR product 241 bp

- ไพรเมอร์ L19_1 เส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 765 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.8°C และ% GC เท่ากับ 55 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 931 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 59.5°C และ% GC เท่ากับ 50 มี PCR product 167 bp

- ไพรเมอร์ L19_6 เส้น Forward เริ่มจากตำแหน่งที่ 499 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60°C และ% GC เท่ากับ 55 ในขณะที่เส้น Reverse เริ่มจากตำแหน่งที่ 696 มีความยาว 20 bp มีค่า Tm 60°C และ% GC เท่ากับ 50 มี PCR product 248 bp ซึ่งสรุปไว้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบจากโปรแกรม Primer3

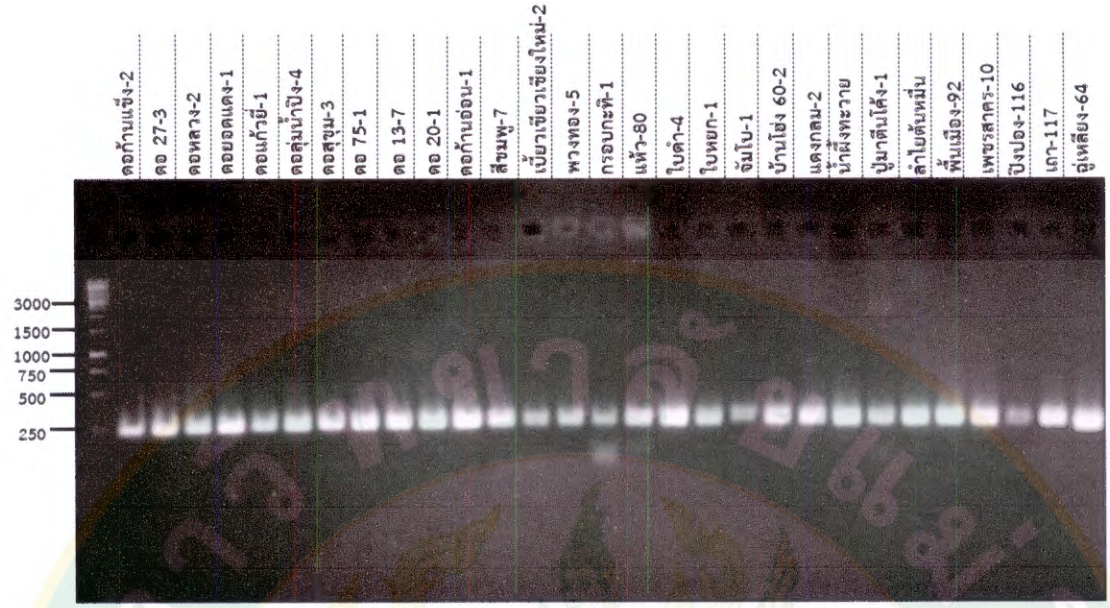
ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	ค่า Tm	ขนาด PCR product
L3_2	F: 5'-AGCGCGATGTTAGGGATATG-3'	60.1°C	188 bp
	R: 5'- AGCTCCGAACTCCACTGGTA-3'	59.9°C	
L3_3	F: 5'-TTCGATTGACTGCGTACCTG-3'	59.9°C	225 bp
	R: 5'- GCGAGCTGATGGATAAGACC-3'	59.8°C	
LG3_3	F: 5'-CGTCGCACTGATTGCTAAAA-3'	60°C	237 bp
	R: 5'- TGTGCTGTGCCTTTTCTAGG-3'	59.1°C	
L11_1	F: 5'-GATCATCATGCACCGTCAGT-3'	59.5°C	157 bp
	R: 5'- TGCTTGCCTGAGACTGTTTG-3'	60.2°C	
L11_2	F: 5'-CGTCGCACTGATTGCTAAAA-3'	60.0°C	237 bp
	R: 5'- TGTGCTGTGCCTTTTCTAGG-3'	59.1°C	
L11_3	F: 5'-GCGAGCTGATGGATAAGACC-3'	59.8°C	239 bp
	R: 5'- TCCACTAGGGGATTGACTGG-3'	59.9°C	
LG11_3	F: 5'-GTTTGCAGCGTGACTAACGA-3'	60.1°C	241 bp
	R: 5'- ACACGACACGGAAAAGATCC-3'	60.0°C	
L19_1	F: 5'-GCGAGCTGATGGATAAGACC-3'	59.8°C	167 bp
	R: 5'- CATACAGACCATCCCCCATT-3'	59.5°C	
L19_6	F: 5'-GGCACCGAGAACATACCTGT-3'	60.0°C	248 bp
	R: 5'- TCGTCAATGCACCTGAGAAG-3'	60.0°C	

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยด้วยไพรเมอร์ SCAR

หลังจากออกแบบไพรเมอร์ SCAR ด้วยโปรแกรม Primer3Plus จำนวน 9 ไพรเมอร์ จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของการเข้าจับคู่ (anneal) ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์มีค่าประมาณ 58°C เมื่อนำไพรเมอร์ทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ L3_2, L11_1, L11_2 และ L19_6 มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นเพียงตำแหน่งเดียวและมีขนาดเท่ากันในลำไยทุกพันธุ์ โดยไพรเมอร์ L3_2 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 180 bp (ภาพที่ 33) ไพรเมอร์ L11_1 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 bp (ภาพที่ 34) ไพรเมอร์ L11_2 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 bp (ภาพที่ 35) และไพรเมอร์ L19_6 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 240 bp (ภาพที่ 36) ทำให้ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์ลำไยได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yang et al. (2013) ที่ใช้แถบดีเอ็นเอของลำไยพันธุ์ Guangxi จากเทคนิค RAPD มาพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR โดยพบว่าการใช้แถบดีเอ็นเอของลำไยพันธุ์ Guangxi เพียงพันธุ์เดียวสามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอของลำไยทั้ง 5 พันธุ์ ในกลุ่ม *D. longan* ได้ โดยสาเหตุที่เครื่องหมาย SCAR ที่ออกแบบไม่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง อาจเนื่องจากความแตกต่างของตำแหน่งที่ไพรเมอร์ของเครื่องหมายเดิมจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (priming site) ในบางตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งนี้จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นได้ เมื่อออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่อยู่ถัดมาจึงไม่พบความแตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่าง (สุรินทร์, 2552) นอกจากนี้ยังพบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ L11_3, LG3_3 และ LG11_3 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 29 พันธุ์ พบว่า เมื่อทำซ้ำแล้วให้ผลไม่เหมือนเดิม (ภาพที่ 37-39)

ภาพที่ 33 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L3_2

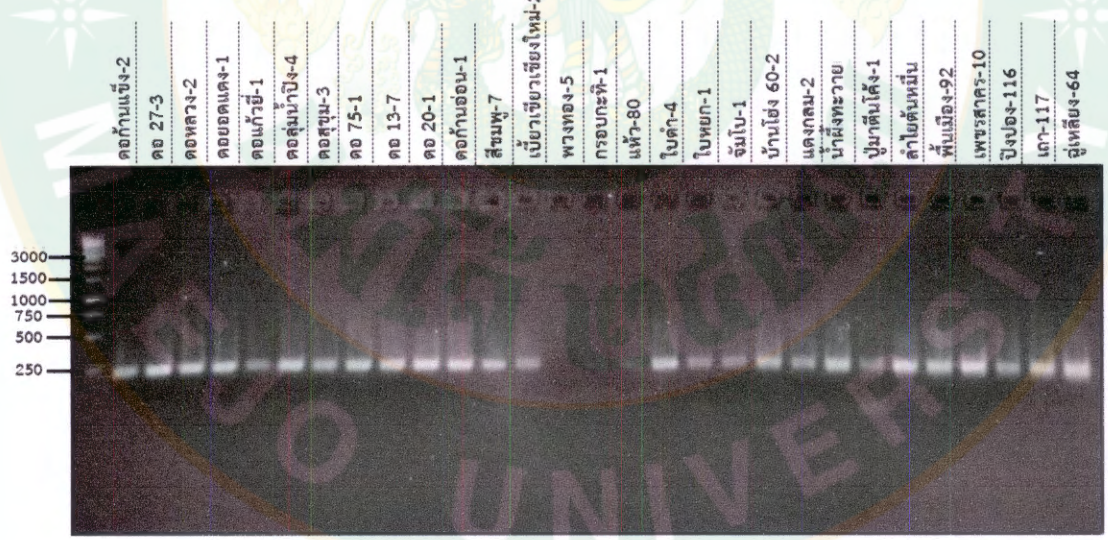
ภาพที่ 34 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L11_1



ภาพที่ 35 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L11_2

ภาพที่ 36 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L19_6

ภาพที่ 37 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L11_3



ภาพที่ 38 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ LG3_3

ภาพที่ 39 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ LG11_3

และจากการทดสอบไพรเมอร์ L3_3 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยทั้ง 29 พันธุ์ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 12 พันธุ์ ได้แก่ ดอก้านแข็ง-2, ดอแก้วยี่-1, ดอสุขุม-3, สีชมพู-4, พวงทอง-5, กรอบกะทิ-1, ใบหยก-1, จัมโบ-1, บ้านโฮ่ง 60-2, แดงกลม-2, ปู่มาตีนโค้ง-1 และฝูเหลียง-64 และพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณประมาณ 250 bp เพียงแถบเดียว ในลำไยจำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ ดอ 27, ดอหลวง-2, ดอยอดแดง-1, ดอสุ่มน้ำปิง-4, ดอ 75-1, ดอ 13-7, ดอ 20-1, ดอก้านอ่อน-1, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่-2, แห้ว-80, ใบดำ-4, น้ำผึ้งทะวาย, ลำไยต้นหมื่น และพื้นเมือง-92 และมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp เกิดขึ้นในลำไยจำนวน 2 พันธุ์ คือ ปิงปอง-116 และเถา-117 นอกจากนี้ยังพบว่า มีลำไยพันธุ์เพชรสาครเพียงพันธุ์เดียวที่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบ มีทั้งขนาด 200 และ 250 bp (ภาพที่ 40)

ภาพที่ 40 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L3_3

ไพรเมอร์ L3_3 สามารถใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมจากการผสมข้ามพันธุ์ ดังนี้

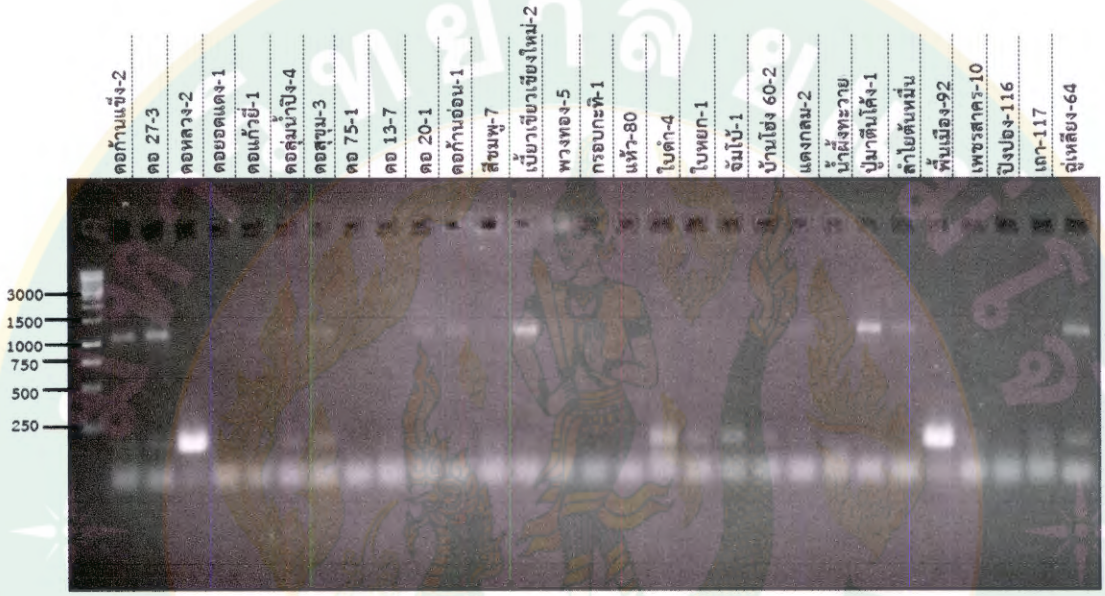
1. การใช้พันธุ์คอก้านแข็ง-2, คอแก้วยี่-1, คอสุขุม-3, สีชมพู-7, พวงทอง-5, กรอบกะทิ-1, ใบหยก-1, จัมโบ-1, บ้านโฮ่ง 60-2, แดงกลม-2, ปู่มาตีนโค้ง-1 และฝูเหลียง-64 เป็นพันธุ์แม่ สามารถใช้พันธุ์พ่อได้ จำนวน 17 พันธุ์ ได้แก่ คอ 27-3, คอหลวง-2, คอยอดแดง-1, คอลุ่มน้ำปิง-4, คอ 75-1, คอ 13-7, คอ 20-1, คอก้านอ่อน-1, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่-2, กรอบกะทิ-1, แห้ว-80, น้ำผึ้งทะวาย, ลำไยต้นหมื่น, พื้นเมือง-92, เพชรสาคร-10, ปิงปอง-116 และเถา-117

2. การใช้พันธุ์คอ 27-3, คอหลวง-2, คอยอดแดง-1, ตอลุ่มน้ำปิง-4, คอ 75-1, คอ 13-7, คอ 20-1, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่-2, กรอบกะทิ-1, แห้ว-80, น้ำผึ้งทะวาย, ลำไยต้นหมื่น และพื้นเมือง-92 เป็นพันธุ์แม่ สามารถใช้พ่อพันธุ์ได้จำนวน 3 พันธุ์ คือ เพชรสาคร-10, ปิงปอง-116 และเถา-117

3. การใช้พันธุ์เพชรสาคร-10 เป็นพันธุ์พ่อ สามารถใช้แม่พันธุ์ได้จำนวน 28 พันธุ์ ได้แก่ คอก้านแข็ง-2, คอ 27-3, คอหลวง-2, คอยอดแดง-1, คอแก้วยี่-1, คอลุ่มน้ำปิง-4, คอสุขุม-3, คอ 75-1, คอ 13-7, คอ 20-1, คอก้านอ่อน-1, สีชมพู-7, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่-2, พวงทอง-5, กรอบกะทิ-1, แห้ว-80, ใบดำ-4, ใบหยก-1, จัมโบ-1, บ้านโฮ่ง 60-2, แดงกลม-5, น้ำผึ้งทะวาย, ปู่มาตีนโค้ง-1, ลำไยต้นหมื่น, พื้นเมือง-92, ปิงปอง-116, เถา-117 และฝูเหลียง-64

การทดสอบไพรเมอร์ L19_1 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing 58°C พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 bp ในลำไยพันธุ์คอก้านแข็ง-2, คอ27-3, คอแก้วยี่-1, คอลุ่มน้ำปิง-4, คอสุขุม-3, คอ 20-1, คอก้านอ่อน-1, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่-2,

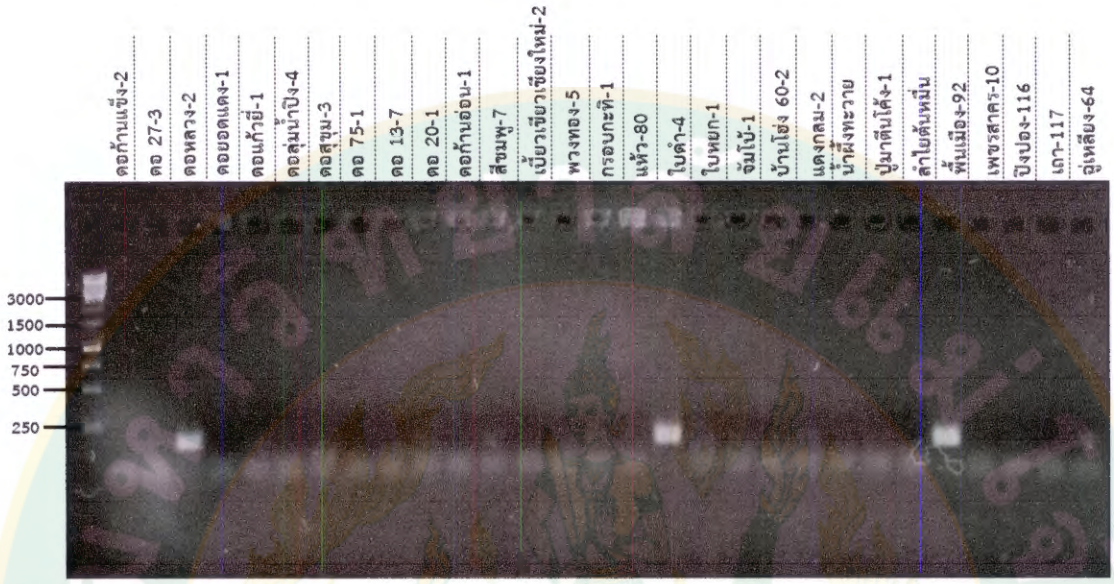
ปู่มาตีนโค้ง-1, ลำไยต้นหมื่น และฉู่เหลียง-64 และพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 bp ในลำไยพันธุ์ดอก้านแข็ง-2, ดอ 27-3, ดอหลวง-2, ดอลุ่มน้ำปิง-4, ดอสุขุม-3, ใบดำ-4, ใบหยก-1, จัมโบ-1, พื้นเมือง-92 และฉู่เหลียง-64 และเมื่อทำซ้ำพบว่ามี แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 bp ในลำไย 3 พันธุ์ คือ ดอหลวง-2, ใบดำ-4 และพื้นเมือง-92 ยังให้ผลเหมือนเดิม ในขณะที่แถบดีเอ็นเอจากพันธุ์ต่าง ๆ ให้ผลของแถบดีเอ็นเอไม่เหมือนเดิม (ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L19_1 อุณหภูมิ 58°C

จึงนำเทคนิค touch down PCR มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ L19_1 ในลำไยทั้ง 29 พันธุ์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้การลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing จากสูงในรอบแรกและลดลงจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ ใช้ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายมีปริมาณน้อย และมีดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ด้วย (สุรินทร์, 2552) โดยดัดแปลงสภาวะจากการพัฒนาและทดสอบเครื่องหมายชนิด SSR จากฐานข้อมูล EST พริก (วีระนันท์, 2555) คือ 94 ºC 4 นาทีสำหรับขั้นตอนการ denaturing จากนั้นทำ 5 รอบของ denaturing ที่ 94 ºC 30 วินาที annealing 60 ºC 30 วินาที และ elongation 72 ºC 60 วินาที และจากนั้นลดอุณหภูมิ annealing ลง 1°C ทุกๆ 5 รอบ จนถึงอุณหภูมิ annealing 55 ºC แล้วทำเพิ่มอีก 15 รอบ และ final elongation 72 ºC นาน 7 นาที พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 bp ในลำไย 3 พันธุ์ คือ ดอหลวง-2, ใบดำ-4 และพื้นเมือง-92 (ภาพ 42) เมื่อทำซ้ำแล้วได้ผลเหมือนเดิม ซึ่งการพบความแตกต่างในลักษณะการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SCAR นี้สอดคล้องกับที่พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับ

จำแนกพืชในวงศ์มะเดื่อ (Anuntalabhochai et al., 2008) และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR ในการจำแนกพืชสกุลมะขามป้อม (Theerakulpisut et al., 2008)



ภาพที่ 42 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ L19_1 ด้วยเทคนิค touch down PCR

นอกจากนี้พบว่าจากการออกแบบไพรเมอร์ L11_3 และ L19_1 มีลำดับเบสของไพรเมอร์เส้น Forward (GCGAGCTGATGGATAAGACC) เหมือนกัน จึงนำไพรเมอร์เส้น Forward และ Reverse ของไพรเมอร์ L11_3 และไพรเมอร์เส้น Reverse ของไพรเมอร์ L19_1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยทั้ง 29 พันธุ์ โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 58°C เมื่อวิเคราะห์ผลผลิต PCR พบว่า มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 bp ในลำไย 3 พันธุ์ คือ ดอหลวง-2, ใบดำ-4 และพื้นเมือง-92 (ภาพที่ 43) ซึ่งให้ผลเหมือนกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ โดยการใช้ไพรเมอร์ L19_1 ด้วยเทคนิค touch down PCR ซึ่งจะนำเครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนาได้ไปตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยที่ทำการผสมข้ามพันธุ์ต่อไป

การพัฒนาไพรเมอร์ SCAR จำนวน 9 ไพรเมอร์ที่มาจากไพรเมอร์ ITAP พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ลำไยได้ จำนวน 2 ไพรเมอร์ คิดเป็น 22.22 % ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จมากกว่าการวิจัยของ Yushianti & Shiraishi (2010) ได้พัฒนาเครื่องหมาย SACR จากเทคนิค RAPD เพื่อใช้ในการจำแนกพืช Sengon (*Paraserianthes falcataria* L.) Nielsen ในประเทศญี่ปุ่นได้ออกแบบไพรเมอร์ SCAR จำนวน 46 ไพรเมอร์ และสามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้ 5 ไพรเมอร์ คิดเป็น 10.87 % แม้ว่าการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR จะมีแนวโน้มในความสำเร็จไม่สูง

มากนัก (Zhang et al., 2013) แต่เทคนิคนี้ยังข้อดีกว่าเทคนิค RAPD เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวต่อปฏิกิริยาน้อยกว่าและสามารถทำซ้ำได้ (Yushianti & Shiraishi, 2010)

ภาพที่ 43 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วย primer combination ระหว่างไพรเมอร์ L11_3F + L11_3R + L19_1R

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไย

หลังจากผสมข้ามลำไยแล้ว ดอกเพศเมียที่มีรังไข่ 2 พู ตรงกลางจานรองดอก มีเพียง 1 พู เท่านั้น ที่จะเจริญเติบโตและพัฒนาจนเป็นผล ส่วนอีกพูจะค่อย ๆ ฝ่อ (ภาพที่ 44 ab) แต่ในบางกรณีอาจพบไข่ในพูทั้งสองเจริญจนเป็นผลได้ (ภาพที่ 45) หลังจากผสมข้ามพันธุ์ลำไยจนครบระยะเวลา 4 เดือนแล้ว ทำการเพาะเมล็ดในวัสดุเพาะกล้าจนมีใบงอกออกมา 3-4 ใบ (ภาพที่ 46) จึงเก็บใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR ที่พัฒนาได้

(a) (b)

ภาพที่ 44 การเจริญเติบโตและพัฒนาจนเป็นผลของรังไข่ 1 พู

ภาพที่ 45 การเจริญเติบโตและพัฒนาจนเป็นผลของรังไข่ 2 พู

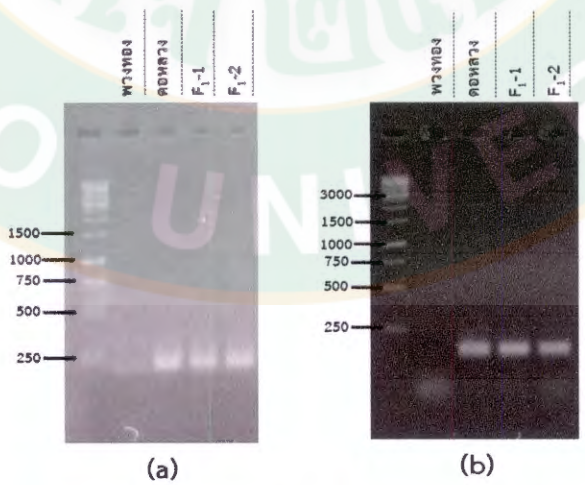
ภาพที่ 46 ต้นกล้าลำไยลูกผสมอายุ 1 เดือน

คู่ผสมของลำไยพันธุ์พวงทอง x ดอหลวง

ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์พวงทองกับดอหลวง โดยใช้พันธุ์พวงทองเป็นพันธุ์แม่มีลักษณะเด่น คือ เนื้อหนากรอบ สีขาวครีม รสหวานหอม (พาวิน และคณะ, 2547) และใช้พันธุ์ดอหลวงเป็นพันธุ์พ่อมีลักษณะเด่น คือ มีผลขนาดใหญ่กว่าลำไยพันธุ์อื่นๆ (ธีรนุช, 2559) สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR ที่พัฒนาได้ จำนวน 2 เครื่องหมายในการตรวจสอบครั้งนี้ คือ L3_3 และ L19_1 ซึ่งจากการใช้ไพรเมอร์ L3_3 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยพันธุ์พวงทอง ดอหลวง ลำไยลูกผสม F_1-1 และ F_1-2 พบว่า ลำไยลูกผสมทั้ง 2 ต้น มีแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp เหมือนพันธุ์พ่อ ในขณะที่พันธุ์แม่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 47 a) และจากกการใช้ไพรเมอร์ L19_1 ด้วยเทคนิค touch down PCR พบว่า ลำไยลูกผสมทั้ง 2 ต้น มีแถบดีเอ็นเอขนาด 150 bp เหมือนพันธุ์พ่อ ในขณะที่พันธุ์แม่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 47 b) เมื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมแล้วจึงนำไปปลูกลงบ่อซีเมนต์ (ภาพที่ 48 ab)

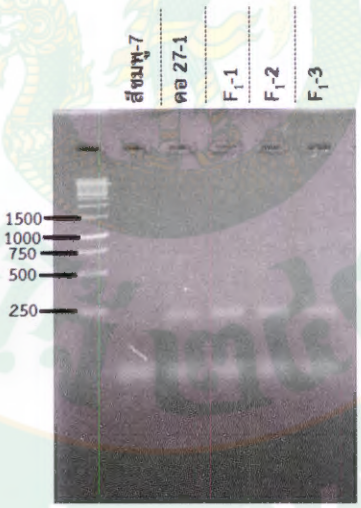
คู่ผสมของลำไยพันธุ์สีชมพู x ดอ 27

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์สีชมพูกับดอ 27 โดยใช้พันธุ์สีชมพูเป็นพันธุ์แม่มีลักษณะเด่น คือ มีเนื้อ สีชมพูเรื่อๆ ยิ่งผลแก่จัดสีของเนื้อยิ่งเข้ม รสหวานมีกลิ่นหอม ตอบสนองต่อสารโพแทสเซียมคลอเรตได้ดี แต่มีข้อด้อย คือ ไม่ทนแล้ง (พาวิน และคณะ, 2547) และใช้พันธุ์ดอ 27 เป็นพันธุ์พ่อ ซึ่งลักษณะเด่นของลำไยกลุ่มดอ คือ การออกดอกเร็วกว่าพันธุ์อื่น ๆ สามารถใช้ไพรเมอร์ L3_3 ได้ ซึ่งจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยพันธุ์สีชมพู ดอ 27 และลำไยลูกผสม F_1-1, F_1-2 และ F_1-3 พบว่า ลำไยลูกผสมทั้ง 3 ต้นมีแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp เหมือนพันธุ์พ่อ ในขณะที่พันธุ์แม่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 49) จากนั้นย้ายลงไปปลูกในวงบ่อซีเมนต์ (ภาพที่ 50)



ภาพที่ 47 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์พวงทอง x ดอหลวง โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3 (a) และไพรเมอร์ L19_1 (b)

ภาพที่ 48 ลูกผสมของลำไยพันธุ์พวงทอง x ดอหลวง (a) F_1-1 และ (b) F_1-2



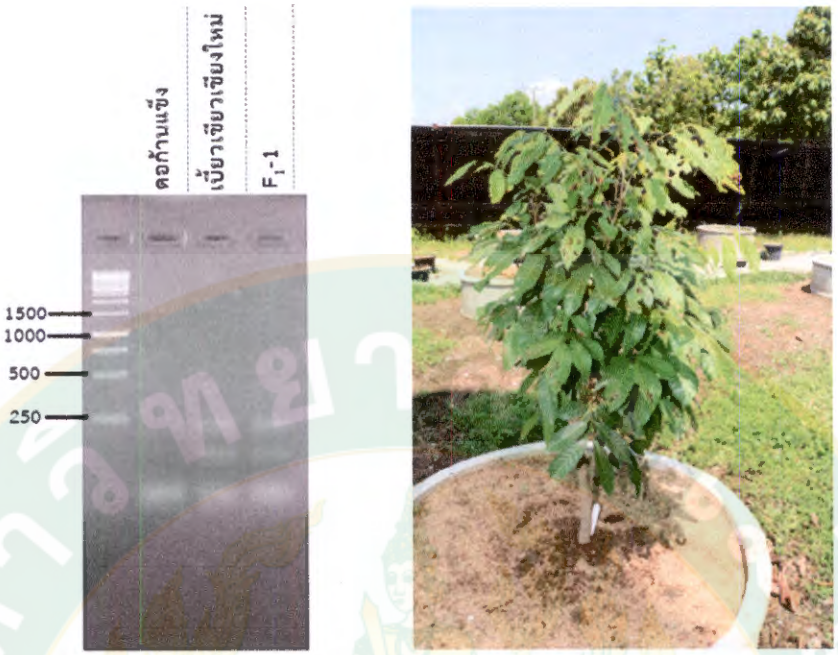
ภาพที่ 49 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์สีชมพู x ดอ 27 โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3

(a) (b) (c)

ภาพที่ 50 ลูกผสมของลำไยพันธุ์สีชมพู x ดอ 27 (a) F_1-1, (b) F_1-2 และ (c) F_1-3

คู่ผสมของลำไยพันธุ์ดอก้านแข็ง x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่

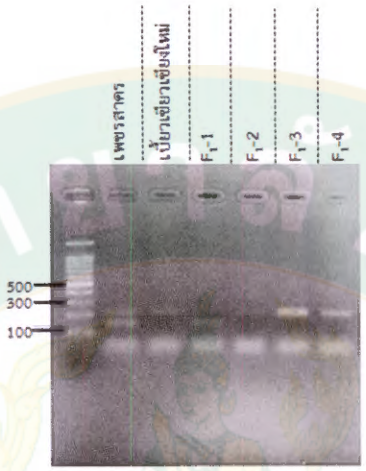
การตรวจสอบความเป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์ดอก้านแข็งกับเบี้ยวเขียวเชียงใหม่ โดยใช้พันธุ์ดอก้านแข็งเป็นพันธุ์แม่มีลักษณะเด่น คือ ลำไยกลุ่มดอมีการออกดอกเร็วกว่าพันธุ์อื่น ๆ (พาวิน และคณะ, 2547) และใช้พันธุ์เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ เป็นพันธุ์พ่อ ซึ่งมีลักษณะเด่น คือ มีเนื้อหนา สามารถทนแล้งได้ดี แต่มีข้อด้อย คือ ออกดอกติดผลช้ากว่าพันธุ์อื่น ๆ และอ่อนแอต่อโรคพุ่มไม้กวาด (ธีรนุช, 2559) สามารถใช้ไพรเมอร์ L3_3 ได้ ซึ่งจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยพันธุ์ดอก้านแข็ง เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ และลำไยลูกผสม F_1-1 พบว่า ลำไยลูกผสม 1 ต้นมีแถบดีเอ็นเอขนาด 200 และ 250 bp เหมือนพันธุ์พ่อ แต่ไม่เหมือนกับที่ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ในครั้งแรก เนื่องจากต้นที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR กับต้นที่ใช้ในการผสมข้ามพันธุ์เป็นคนละต้นกัน แต่อย่างไรก็ตามยังสามารถใช้ไพรเมอร์ L3_3 ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ ในขณะที่พันธุ์แม่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 51 a) จากนั้นย้ายลงไปปลูกในวงบ่อซีเมนต์ (ภาพที่ 51 b)



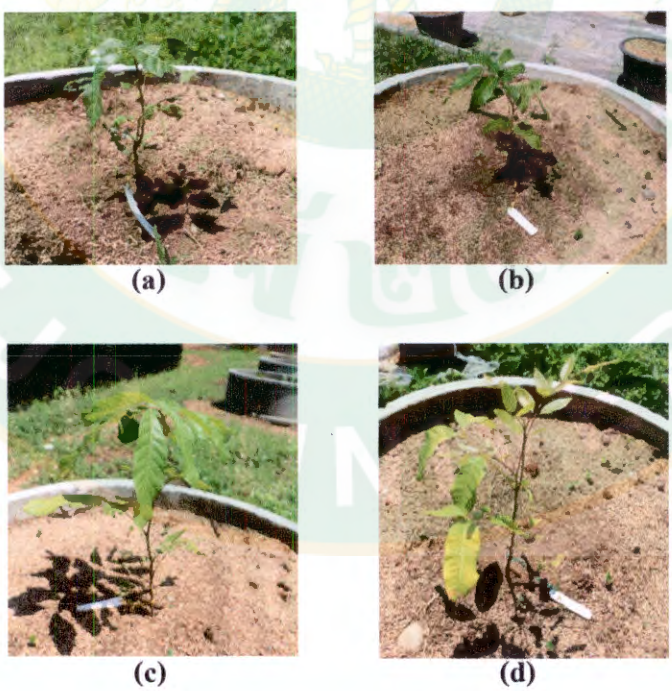
ภาพที่ 51 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์ดอก้านแข็ง x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3 (a) ลำไยพันธุ์ดอก้านแข็ง x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ (b)

นอกจากนี้ยังได้นำไพรเมอร์ L3_3 มาทดลองใช้ในการตรวจสอบลำไยลูกผสมพันธุ์เพชรสาคร x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ โดยใช้พันธุ์เพชรสาครเป็นพันธุ์แม่ มีลักษณะเด่น คือ ออกดอกง่ายและออกดอกก่อนลำไยพันธุ์อื่น ๆ แต่มีข้อด้อย คือ มีเนื้อบาง เมล็ดโต มีน้ำเยอะและมีกลิ่นคาว (พาวินและคณะ, 2546) และใช้พันธุ์เบี้ยวเขียวเชียงใหม่เป็นพ่อ มีลักษณะเด่น คือ มีเนื้อหนา สามารถทนแล้งได้ดี แต่มีข้อด้อย คือ ออกดอกติดผลช้ากว่าพันธุ์อื่น ๆ (ธีรนุช, 2559) ซึ่งจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยพันธุ์เพชรสาคร เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ และลำไยลูกผสม F_1-1, F_1-2, F_1-3 และ F_1-4 พบว่า ลำไยพันธุ์เพชรสาครมีแถบดีเอ็นเอขนาด 200 และ 250 bp และพันธุ์เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ มีแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์ยังให้แถบดีเอ็นเอเหมือนเดิม และพบว่าลูกผสมทั้ง 4 ต้น ไม่มีแถบดีเอ็นที่เหมือนกับต้นแม่ 100 % โดย F_1-1 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 200 bp เหมือนกับพันธุ์แม่ 1 แถบ ส่วน F_1-2, F_1-3 และ F_1-4 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp (ภาพที่ 52) ซึ่งเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (ภาพที่ 53 ab) ซึ่งไม่สามารถสรุปได้ว่า ลูกผสมทั้ง 4 ต้น เป็นต้นลูกผสมที่แท้จริง เนื่องจากลำไยเป็นพืชผสมข้าม ต้นพ่อและแม่ที่ใช้ในการผสมพันธุ์อาจจะไม่ใช่พันธุ์แท้ ดังนั้นลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองก็อาจจะมีการกระจายตัวได้ จึงมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนต้นแม่บางส่วน ไม่ได้ปรากฏทุก

แถบ ดังนั้นไพรเมอร์ SCAR คู่นี้ม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบลำไยลูกผสมคู่นี้ได้ จึงควรมีการพัฒนาไพรเมอร์คู่อื่น ๆ มาใช้ในการจำแนกต่อไป



ภาพที่ 52 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยพันธุ์เพชรสาคร x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ โดยใช้ไพรเมอร์ L3_3



ภาพที่ 53 ลูกผสมของลำไยพันธุ์เพชรสาคร x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ (a) F_1-1, (b) F_1-2, (c) F_1-3 และ (d) F_1-4

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR จากไพรเมอร์ ITAP พบว่า จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลำไยจำนวน 29 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ ITPR3 มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างของพันธุ์ดอหลวง ใบดำและพื้นเมืองขนาด 1,000 bp จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอจากลำไยพันธุ์พื้นเมืองมาสร้างดีเอ็นเอสายผสม แล้วส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอ ทำการออกแบบไพรเมอร์ SCAR ได้จำนวน 9 คู่ เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลำไยทั้ง 29 พันธุ์ อีกครั้ง พบว่า มีไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ L3_3, L11_1, L11_2 และ L19_6 มีแถบดีเอ็นเอแบบ monomorphic band มีไพรเมอร์ 3 คู่ คือ L11_3, LG3_3 และ LG11_3 ทำซ้ำแล้วให้ผลไม่เหมือนเดิม และมีไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมได้ 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ L3_3 และ L19_1 โดยที่ไพรเมอร์ L3_3 ใช้อุณหภูมิ 58 °C ในขั้นตอน annealing พบว่า ไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในลำไยจำนวน 12 พันธุ์ มีแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp เกิดขึ้นในลำไยจำนวน 14 พันธุ์ มีแถบดีเอ็นเอขนาด 200 bp เกิดขึ้นในลำไยจำนวน 2 พันธุ์ และมีแถบดีเอ็นเอขนาด 200 และ 250 bp เกิดขึ้นในลำไยจำนวน 1 พันธุ์ ส่วนไพรเมอร์ L19_1 สามารถใช้ในการจำแนกลำไยพันธุ์ดอหลวง ใบดำและพื้นเมือง ออกจากลำไยพันธุ์อื่น ๆ ได้ ซึ่งมีผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 200 คู่เบส โดยใช้เทคนิค touch down PCR หรือการใช้ primer combination ระหว่างไพรเมอร์ L11_3F + L11_3R + L19_1R

เมื่อนำเครื่องหมายที่พัฒนาได้มาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลำไยที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ L3_3 สามารถใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของพันธุ์พวงทอง x ดอหลวง, สีชมพู x ดอ 27, ดอก้านแข็ง x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ และเพชรสาคร x เบี้ยวเขียวเชียงใหม่ ส่วนไพรเมอร์ L19_1 สามารถใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของพันธุ์พวงทอง x ดอหลวง ได้

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

ในการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จะนำมาพัฒนาต่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR อาจจะต้องเลือกใช้เครื่องหมายที่สามารถจะทำซ้ำได้แต่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นหลายแถบ เพราะจะทำให้ได้เครื่องหมาย SCAR ที่มีประสิทธิภาพที่และสามารถทำซ้ำได้ง่ายเช่นเดียวกัน และในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ลำไยในครั้งนี้ ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลำไยลูกผสมได้เท่านั้น แต่ยังไม่สามารถเชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตรได้ จึงควรมีการวิจัยศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แซ่หล่อ. 2553. ปัญหาลำไยผลแตก. **วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน**. 22 (486): 94.

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ และธัญพิศิษฐ์ พวงจิก. 2545. **การปรับปรุงพันธุ์มะม่วงไทยโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR**. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2546. **การจัดจำแนกไม้ผล**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 417น.

ทวีสิน แก้วศรีนวม. 2554. **การปรับปรุงพันธุ์ลำไยโดยการผสมพันธุ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 85น.

ธีรนุช เจริญกิจ. 2559. **แม่โจ้...ศาสตร์แห่งพันธุ์ลำไย**. เชียงใหม่: วนิดาการพิมพ์. 224น.

พาวิน มะโนชัย, ยุทธนา เขาสุเมรุ, ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2547. **เทคโนโลยีการผลิตลำไย**. กรุงเทพฯ: ฟิสิกส์เซ็นเตอร์. 126น.

เพ็ญแข พัฒโณทัย, สุขุม ลิมังกูร และ วัฒนา เสถียรสวัสดิ์. 2512. **การศึกษาในการผสมลำไย**. น. 64-77. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์ และชีววิทยา ครั้งที่ 8. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีระนันท์ ศรีเกตุ. 2555. **การพัฒนาและทดสอบเครื่องหมายชนิด SSR จากฐานข้อมูล EST**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 192น.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการ ม.อบ**. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5(2): 37-59.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. สถิติการส่งออก. **[ระบบออนไลน์]**. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร (ลำไย). **[ระบบออนไลน์]**. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/longan60.pdf

อดิศร กระแสชัย และ ธวัชชัย รัตน์ชเลศ. 2541. **การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ลำไยโดยวิธีกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ : การพัฒนาของต้นที่เกิดจากการเพาะเมล็ดที่ได้รับรังสีแกมม่า**. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อนันต์ ดำรงสุข. 2547. **ลำไย**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์. 151น.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์. 95น.

Anuntalabhochai, S., W. Phromthep, S. Sitthiphrom, R. Chundet and R.W. Cutler. 2008. Phylogenetic diversity of *Ficus* spcies using HAT-RAPD markets as a measure of genomic polymorphism. **The Open Agriculture Journal**. 2: 62-67.

Carson, S. and D. Robertson. 2006. **Manipulation and Expression of Recombinant DNA A Laboratory Manual.** USA: Elsevier Academic Press publications.

Cutler, R.W., Sitthiphrom S, Marha J, Anuntalabhochai S. 2007. Development of Sequence-characterized DNAMarker toTemperature Insensitivity for Fruit Production Longan (*Dimocarpus longa*n Lour.) Cultivars. **Agronomy and Crop Science**. 193: 74–78.

Hwang, S.K. and Y.M. Kim. 2000. A Simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genome DNA for PCR-based detection of transgenees. **J Biochem Mol Biol**. 33: 537-546.

Sitthiphrom S, Anuntalabhochai S, Dum-ampai N, Thakumphu B, Dasanonda M. 2005. Investigation of genetic relationships and hybrid detection in longan by high annealing temperature RAPD. **Acta Hort**. 665: 161-170.

Theerakulpisut, P., N. Kanawapee, D. Maensiri, S. Bunnag and P. Chantaranothai. 2008. Development of species-specific SCAR markers for identification of three medicinal species of *Phyllanthus*. **Systematics and Evolution**. 46(4): 614-621.

Viruel, M.A. and J. I. Hormaza. 2004. Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae). **Theor Appl Genet**. 108: 896-902.

Wang, B., H.W. Tan, W. Fang, L.W. Meinhardt, S. Mischke, T. Matsumoto and D.Zhang. 2015. Developing single nucleotide polymorphism (SNP) markers from transcriptome sequence for identification of longan (*Dimocarpus longan*) germplasm. **Horticulture Research** 65: 1-10.

Xiong, F., J. Jiang and Z. Han. 2011. Molecular characterization of high plant species using PCR with primers designed from consensus branch point signal sequences. **Biochem. Genet**. 49: 352-363.

Xiong, F., J. Lio, R. Zhong, J. Jiang, Z. Han, L. He, Z. Li, X. Tang and R. Tang. 2013. Intron targeted amplified polymorphism (ITAP), a new sequence related amplified

polymorphism-based technique for generating molecular markers in higher plant species. **Plant Omics Journal**. 6(2): 128-134.

Yang, L., S. Fu, M.A. Khan, W. Zeng and J. Fu. 2013. Molecular cloning and development of RAPD-SCAR markers for *Dimocarpus longan* variety authentication. **SpringerPlus**. 2: 1-8.

Yonemoto ,Y., A.K. Chowdhury, H. Kato and M.M. Macha. 2006. Cultivars identification and their genetic relationships in *Dimocarpus longan* subspecies based on RAPD markers. **Scientia Horticulture**. 109: 147-152.

Yushianti, V. and S. Shiraishi. 2010. Sequence characterized amplified region (SCAR) markers in sengon (*Paraserianthes falcataria* L.) Nielsen. **HAYATI Journal of Biosciences**. 17(4): 167-172.

Zhang, W., L. Yin, S. Wei, Z. Deng, J. Yi, R. Wu and Q. Chen. 2013. RAPD marker conversion into a SCAR marker for rapid identifiation of johnsongrass [*Sorghum halepense* (L.) Pers.]. **Not. Bot. Horti. Agrobo**: 41(1): 306-312.