การตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดของปทุมมาและกระเจียว โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์

สถาพร สุขจิตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

การตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดของปทุมมาและกระเจียว โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์

สถาพร สุขจิตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดของปทุมมาและกระเจียว
โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์

สถาพร สุขจิตร

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(อาจารย์ ดร.นฤมล เข็มกลัดเงิน)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดของปทุมมาและกระเจียว โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์
ชื่อผู้เขียน นายสถาพร สุขจิตร
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.นฤมล เข็มกลัดเงิน

บทคัดย่อ

ปทุมมาเป็นพืชวงศ์ขิงอยู่ในสกุล *Curcuma* เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง เพื่อให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะใหม่ ๆ และดึงดูดความต้องการของตลาดมากขึ้น นักปรับปรุงพันธุ์จึงพยายามผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว โดยใช้เทคนิคพิเศษในการช่วยผสมและช่วยชีวิตเอมบริโอ ซึ่งลูกผสมที่ได้อาจเป็นลูกที่เกิดจาการผสมตัวเอง หรือลูกที่เกิดจากเซลล์ร่างกายของต้นแม่ ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่แท้จริง วิทยานิพนธ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียวโดยการประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ ได้แก่ เทคนิค Genome *in situ* hybridization (GISH) การนับจำนวนโครโมโซม (Chromosome counting) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด inter-simple sequence repeat (ISSR) จากผลการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH ไม่สามารถตรวจสอบการเป็นลูกผสมได้ อาจเกิดจากการทำให้โครโมโซมเสียสภาพไม่สมบูรณ์ การล้างส่วนที่โพรบจับแบบไม่จำเพาะเจาะจงออกไม่หมด เป็นต้น สำหรับวิธีการนับจำนวนโครโมโซมสามารถตรวจสอบการเป็นลูกผสมของลูกผสม SWEPL พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 37 สำหรับการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดด้วยเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 250-3,000 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งสิ้น 71 แถบ จากทั้งหมด 72 แถบ คิดเป็น 98.61 เปอร์เซ็นต์ และมี 10 ไพรเมอร์ ที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ของต้นพ่อแม่พันธุ์ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.04-0.57 แสดงว่า มีความห่างไกลกันทางพันธุกรรม วิทยานิพนธ์นี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR สามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมในพืชกลุ่มที่ศึกษานี้ ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้กับคู่ผสมอื่น ๆ ในสกุล *Curcuma* หรือสกุลใกล้เคียงได้ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ศึกษาได้นี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : ปทุมมา, กระเจียว, ลูกผสมข้ามชนิด, เครื่องหมาย ISSR, Genome in situ hybridization (GISH), การนับจำนวนโครโมโซม

Title VALIDATION OF INTERSPECIFIC HYBRIDS BETWEEN PARACURCUMA AND EUCURCUMA USING GENETIC TECHNIQUES

Author Mr. Sathaporn Sukjit

Degree Master of Science in Genetics

Advisory Committee Chairperson Dr. Naruemon Khemkladngoen

ABSTRACT

Siam tulip, belonging to the family Zingiberaceae; genus *Curcuma*, is an economically important flower in Thailand. To create novel hybrids attracting market demands, interspecific hybrids crossed between Siam tulip and its related species have been generated through sophisticated crossing techniques and embryo rescue. However, the hybridization process may create selfing or induce somatic embryogenesis. Hence, it is necessary to verify the true interspecific hybrids. The objective of this study was to apply genetic techniques, genome *in situ* hybridization (GISH), chromosome counting and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for detection of interspecific hybrids between Paracurcuma and Eucurcuma. Unfortunately, GISH experiment was not successful. The GISH probe hybridized unspecifically to chromosomes and protein in cytoplasm. Causes might be because of incompletion at chromosome denaturation or insufficient washing during detection process. For chromosome counting, chromosomes of a SWEPL hybrid were prepared and counted. The number of chromosome was 37 (2n = 37) which was the expected chromosome number of a hybrid crossed between *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (2n = 32, n = 16) *C. aurantiaca* Van (2n = 42, n = 21). Furthermore, the verification of interspecific hybrids using ISSR marker was performed. The results of DNA amplification using 10 ISSR primers showed 72 amplified bands in total with 250-3,000 bp in size. Seventy-one amplified bands of the total (98.61 %) were polymorphic. Moreover, it was found that 10 primers (100 %) could be used for interspecific hybrid detection. A dendrogram based on polymorphic bands showed

genetic similarities among parental species with similarity coefficients ranging between 0.04-0.57. In conclusion, the results in this study elucidated that ISSR markers were efficient to verify interspecific hybrids between Paracurcuma and Eucurcuma, which might also be applied to other hybrids related to *Curcuma* sp. Furthermore, the genetic relationship shown in this study might be useful in the *Curcuma* breeding program.

Keywords : Paracurcuma, Eucurcuma, Genome in situ hybridization (GISH), Chromosome counting, Interspecific hybrids, ISSR markers

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จากหลาย ๆ ฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. นฤมล เข็มกลัดเงิน ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยอบรมสั่งสอนแนะนำแนวทางการเรียนรู้ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ กรรมการที่ปรึกษา ที่คอยให้คำปรึกษา รับฟังปัญหา แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และคอยอบรมสั่งสอนตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี กรรมการที่ปรึกษา ที่คอยให้คำปรึกษา รับฟังปัญหา แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ร่วมทั้งให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพืชปทุมมา กระเจียว และลูกผสม ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา “ทุนศิษย์ก้นกุฏิ” ประจำปีการศึกษา 2559 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2561 จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยอบรมเลี้ยงดู เป็นกำลังใจ และสนับสนุนงบประมาณ ร่วมถึงคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสาขาพันธุศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

สถาพร สุขจิตร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 4

2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปทุมมา 4

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปทุมมา 5

2.3 ชนิดของพืชในสกุล *Curcuma* 6

2.4 การปรับปรุงพันธุ์พืช 7

2.5 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสม 12

2.5.1 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมโดยวิธีสัณฐานวิทยา 12

2.5.2 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมโดยวิธีทางพันธุศาสตร์ 13

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 27

บทที่3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย 31

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย 31

วัสดุและอุปกรณ์ 32

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 36

วิธีดำเนินงานวิจัย 38
1. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH 38
2. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยการนับจำนวนโครโมโซม 44
3. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค ISSR 44
บทที่ 4 ผลการวิจัย และวิจารณ์ 48
4.1 ผลการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH 48
4.1.1 ผลการเปรียบเทียบสารเคมีต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ได้โครโมโซมระยะที่ต้องการ (Pretreatment) 48
4.1.2 ผลการหาขนาดของดอก และขนาดของอับเรณูที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมโครโมโซม 52
4.1.3 ผลการเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์ 55
4.1.4 ผลการเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ทำโพรบ และ Blocking DNA 57
4.1.5 ผลการเตรียมโพรบ 57
4.1.6 ผลการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH 58
4.2. การตรวจสอบลูกผสมโดยวิธีนับจำนวนโครโมโซม 71
4.3. ผลการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเครื่องหมาย ISSR 74
4.3.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ 74
4.3.2 การตรวจสอบไพรเมอร์ และหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 78
4.3.3 การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 79
4.3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชตัวอย่างที่ศึกษา 91
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 96
บรรณานุกรม 98
ภาคผนวก 102
ภาคผนวก ก. การเตรียมสาร 103

ภาคผนวก ข การให้สัญลักษณ์แถบดีเอ็นเอ.....105
ภาคผนวก ค. การนับจำนวนโครโมโซม.....110
ภาคผนวก ง. การตรวจสอบลูกผสมโดยเครื่องหมาย ISSR.....113
ประวัติผู้วิจัย.....120

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาผ่านด่านตรวจพืชท่าอากาศยานเชียงใหม่.... 4

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกหัวพันธุ์และต้นปทุมมาทั้งประเทศ..... 5

ตารางที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกดอกปทุมมาทั้งประเทศ 5

ตารางที่ 4 แสดงคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิด 26

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในงานวิจัยของ Taheri et al. (2012) 45

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ สำหรับเครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในงานวิจัยของ Das et al. (2011) 45

ตารางที่ 7 ระยะการแบ่งเซลล์ของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep. ในดอกและอับเรณูขนาดต่าง ๆ เมื่อถูกชักนำด้วยสารเคมี 51

ตารางที่ 8 ระยะการแบ่งเซลล์ที่พบจากพืชตัวอย่างที่มีดอกและอับเรณูขนาดต่างๆ 54

ตารางที่ 9 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสง..... 76

ตารางที่ 10 ข้อมูลไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR 78

ตารางที่ 11 แถบดีเอ็นเอของลูกผสม BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa ที่ปรากฏเหมือนพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในแต่ละไพรเมอร์ 90

ตารางที่ 12 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนปทุมมา (SW, BR และ WT) กระเจียว (EPL, Usa และ KS) และลูกผสม (BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR95

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมโดยวิธีสัณฐานวิทยา 13

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดโดยวิธี genomic in situ hybridization (GISH) 19

ภาพที่ 3 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย RFLP 21

ภาพที่ 4 เทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ในการตรวจสอบ SNPs 22

ภาพที่ 5 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย RAPD 22

ภาพที่ 6 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย AFLP 23

ภาพที่ 7 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย ISSR 24

ภาพที่ 8 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย SSR 25

ภาพที่ 9 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย SSCP 25

ภาพที่ 10 แสดงเซลล์ระยะไดอะไคเนซิส ของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep. โดยการเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิค squash 49

ภาพที่ 11 แสดงเซลล์ระยะต่าง ๆ ของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep. โดยการเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิค squash 50

ภาพที่ 12 แสดงเซลล์ระยะไดอะไคเนซิส ของพืชตัวอย่าง 53

ภาพที่ 13 การเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์ของปทุมมาสปีชีส์ Curcuma alismatifolia Gagnep. โดยย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 30, 40, 60 และ 80 นาที ย้อมด้วยสี DAPI ลูกศรแสดงการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 56

ภาพที่ 14 การเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ทำโพรบ และ Blocking DNA สำหรับเทคนิค GISH 57

ภาพที่ 15 การติดฉลากโพรบแบบทางอ้อม 58

ภาพที่ 16 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค GISH โดยใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ถูกตัด 59

ภาพที่ 17 การทำ GISH โดยใช้ตัวอย่างดอกจากลูกผสม WTEPL ใช้โพรบที่ไม่ถูกตัด ซึ่งใช้โพรบเป็นปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซีส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซีส 61

ภาพที่ 18 การทำ GISH โดยใช้ตัวอย่างดอกจากกระเจียวสปีชีส์ C. aurantiaca Van ใช้โพรบที่ไม่ถูกตัดของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซีส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซีส 62

ภาพที่ 19 การทำ GISH จากตัวอย่างลูกผสม WTEPL ใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep. 64

ภาพที่ 20 การทำ GISH จากตัวอย่างกระเจียวสปีชีส์ C. aurantiaca Van ใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep. 66

ภาพที่ 21 ผลการทำ GISH จากลูกผสม WTEPLใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep. 69

ภาพที่ 22 ผลการทำ GISH ของกระเจียวสปีชีส์ C. aurantiaca Van ใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ (C. alismatifolia Gagnep.) 71

ภาพที่ 23 เซลล์ระยะไดอะไคเนซิสย้อมด้วยสี DAPI ของปทุมมาสปีชีส์ C. alismatifolia Gagnep. 73

ภาพที่ 24 เซลล์ระยะไดอะไคเนซิสย้อมด้วยสี DAPI ของปทุมมาสปีชีส์ C. aurantiaca Van Zip... 73

ภาพที่ 25 เซลล์ระยะไดอะไคเนซิสย้อมด้วยสี DAPI ของลูกผสม SWEPL 74

ภาพที่ 26 ผลการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม 75

ภาพที่ 27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 808 79

ภาพที่ 28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 809 80

ภาพที่ 29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 811 81

ภาพที่ 30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 812 82

ภาพที่ 31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 816 83

ภาพที่ 32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 817 84

ภาพที่ 33 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 818 85

ภาพที่ 34 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 826 86

ภาพที่ 35 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 836 87

ภาพที่ 36 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 891 88

ภาพที่ 37 แผนภูมิความสัมพันธ์ของปทุมมา (SW, BR และ WT) กระเจียว (EPL, Usa และ KS) และลูกผสม (BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa) ที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR 92

บทที่1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปทุมมา (Siam tulip) เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย สามารถส่งออกได้ในรูปของไม้ตัดดอก ไม้กระถาง และหัวพันธุ์ ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่การผลิตปทุมมาประมาณ 400 ไร่ แหล่งผลิตใหญ่อยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เลย ชัยภูมิ และกาญจนบุรี ฤดูการผลิตอยู่ระหว่างเดือนเมษายน - กันยายน มีการส่งออกหัวพันธุ์ไปต่างประเทศ ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตทั้งหมด ส่วนที่เหลือ 25 เปอร์เซ็นต์ ใช้สำหรับการปลูกขยายพันธุ์ในฤดูกาลถัดไป (ยุทศาสตร์การพัฒนางานวิจัยปทุมมาพ.ศ.2559-2563, ม.ป.ป.) ประเทศไทยส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 จนถึงปัจจุบัน มูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี (โสระยา, 2558) จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าประเทศไทยส่งออกปทุมมาในรูปหัวพันธุ์ที่ยังไม่งอก หัวพันธุ์ที่งอกแล้ว และดอกปทุมมาสดมีมูลค่ารวมปีละ 10 - 20 ล้านบาท ตลาดนำเข้าหลักได้แก่ ญี่ปุ่น ยุโรป และอเมริกา ซึ่งเป็นตลาดที่มีคุณภาพและมีกำลังซื้อสูง (ตารางที่1-3) (ยุทธศาสตร์การพัฒนางานวิจัยปทุมมา พ.ศ. 2559-2563, ม.ป.ป.)

ในปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาเพื่อให้ได้ลักษณะที่หลากหลาย เป็นที่ต้องการทางการค้าใหม่ ๆ โดยการผสมพันธุ์ระหว่างปทุมมาพันธุ์ต่าง ๆ แต่ลักษณะที่ได้ก็ไม่แตกต่างกันมากนัก (เฉลิมศรี, 2549) จึงมีการผสมปทุมมากับพืชสกุลเดียวกัน เพื่อให้เกิดลูกผสมข้ามชนิดที่มีความหลากหลายของลักษณะต่างๆ มากขึ้น เช่น ช่อดอก กลีบประดับ และสีของกลีบประดับ แต่ก็พบว่าการผสมระหว่างปทุมมาและกระเจียวทำให้เกิดลูกผสมข้ามชนิดที่มีลักษณะคล้ายทั้งพ่อและแม่ และพบลูกผสมลักษณะแตกต่างกันออกไปด้วย แต่ก็พบปัญหาและอุปสรรคในการผสมข้ามชนิด เช่น การบานของดอกไม่พร้อมกัน ละอองเกสรตัวผู้ไม่สามารถงอกบนยอดเกสรตัวเมียได้ หากละอองเกสรตัวผู้งอกได้อาจไม่สามารถงอกไปถึงไข่ได้ หรืองอกผิดทิศทางจนไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ทำให้ผสมไม่ติด หรือผสมติดแต่เอมบริโอหยุดการเจริญเติบโตหรือตายก่อนที่จะพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ จึงต้องมีวิธีที่จะทำให้เอมบริโอสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้ และหนึ่งในวิธีที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมพันธุ์ข้ามชนิดของพืชกลุ่มปทุมมาคือ การใช้ละอองเกสรของต้นแม่กระตุ้นให้เกิดการปฏิสนธิ และการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเอมบริโอ (embryo rescue) เพื่อช่วยให้เอมบริโอพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ละอองเกสรของต้นแม่กระตุ้นให้เกิดการปฏิสนธิอาจทำให้เกิดการผสมตัวเองได้ และการเพาะเลี้ยงเอมบริโออาจทำให้เซลล์ร่างกาย (somatic cells) ของต้นแม่สามารถพัฒนาไปเป็น

ต้นใหม่ได้ (ศิริพร, 2547) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบลูกผสมที่แท้จริงสำหรับการผสมข้ามชนิดในปทุมมา ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบลูกผสมในพืชดอกหลายชนิดด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ เช่น การตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลระหว่างกล้วยไม้สกุล *Ascocenda* และ *Phalaenopsis* โดยใช้เทคนิค genome *in situ* hybridization (GISH) และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Liu et al., 2016) การตรวจสอบโพลีพลอยดีของลิลี่ลูกผสมระหว่างสปีชีส์ *Longiflorum* และ *Asiatic lilies* โดยใช้เทคนิค GISH การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในสกุล *Jatropha* โดยใช้เครื่องหมาย Single-strand conformation polymorphism (SSCP) (Sims, 2006) นอกจากนี้ (ธีรนิติ, 2555) ได้ทำการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างสกุลย่อย *Paracurcum*a และสกุลย่อย *Eucurcuma* โดยใช้เครื่องหมาย Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ได้สำเร็จ 1 คู่ผสม ดังนั้นการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ เช่น เทคนิคทางพันธุศาสตร์เซลล์โดยเฉพาะเทคนิค GISH และเครื่องหมายดีเอ็นเออาจเป็นวิธีหนึ่งในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดของปทุมมาและกระเจียวได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค GISH และเครื่องหมาย ISSR ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดของพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดของพืชดอกกลุ่มปทุมมาและกระเจียวได้
2. ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และองค์ประกอบของจีโนมของพืชกลุ่มปทุมมา กระเจียวและลูกผสม
3. นำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในพืชอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ปทุมมาเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) สกุลขมิ้น (*Curcuma*) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma alismatifolia* Gagnep. เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยเป็นอันดับสองรองจากกล้วยไม้ มีการส่งออกหัวพันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 จนถึงปัจจุบัน มูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี (โสระยา, 2558)

2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปทุมมา

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาผ่านด่านตรวจพืชท่าอากาศยานเชียงใหม่

ปี พ.ศ.	ปริมาณ				ประเทศปลายทาง (5 ลำดับต้น)
	หัวพันธุ์ (หัว)	หัวพันธุ์ (กก.)	ต้น (ต้น)	มูลค่า (บาท)	
2557	2,518,423	26,504	23,811	13,086,967	เยอรมนี เบลเยียม สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และ อิตาลี
2558	2,136,957	16,204	469	11,382,808	เยอรมนี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เบลเยียม และ อิตาลี
2559	1,806,294	19,901	20,704	11,254,608	เบลเยียม เยอรมนี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และ อิตาลี
2560	1,740,437	11,175	2,496	11,852,034	เบลเยียม เยอรมนี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และ เกาหลีใต้
2561	1,208,198	395	45,528	12,051,326	จีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี และ โปรตุเกส

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกหัวพันธุ์และต้นปทุมมาทั้งประเทศ

ปี พ.ศ.	ปริมาณ				ประเทศปลายทาง (5 ลำดับต้น)
	หัวพันธุ์ (หัว)	หัวพันธุ์ (กก.)	ต้น (ต้น)	มูลค่า (บาท)	
2557	2,518,423	26,504	23,811	13,086,967	เยอรมนี เบลเยียม สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และ อิตาลี
2558	2,136,957	16,204	469	11,382,808	เยอรมนี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เบลเยียม และ อิตาลี
2559	1,806,294	19,901	20,704	11,254,608	เบลเยียม เยอรมนี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และ อิตาลี
2560	1,740,437	11,175	2,496	11,852,034	เบลเยียม เยอรมนี ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และ เกาหลีใต้
2561	1,208,198	395	45,528	12,051,326	จีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี และ โปรตุเกส

ตารางที่ 3 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกดอกปทุมมาทั้งประเทศ

ปี พ.ศ.	ปริมาณ		ประเทศปลายทาง (5 ลำดับต้น)
	จำนวน ชิ้น/ช่อ	มูลค่า (บาท)	
2557	27,206	224,048	สิงคโปร์ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เวียดนาม และ อารับ
2558	7,213	65,069	สิงคโปร์ บาห์เรน ญี่ปุ่น จีน และ บรูไนท์
2559	63,845	734,239	ญี่ปุ่น เลบานอน บรูไน แอฟรกา ใต้ และ คูเวต
2560	72,357	1,063,502	ญี่ปุ่น จีน เลบานอน เวียดนาม และ คูเวต
2561	141,306	1,633,814	ญี่ปุ่น จีน ฮ่องกง อินโดนีเซีย และ เลบานอน

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปทุมมา

1) เหง้า และ ลำต้น ปทุมมาเป็นไม้ดอกประเภทหัวแบบไรโซมหรือเหง้า ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหาร มีลักษณะป้อม และโป่งออกทางด้านข้างมากกว่าที่จะเรียวยาว สามารถเห็นข้อ และปล้องที่หดสั้นได้อย่างชัดเจน มีตาเรียงตัวอยู่ในแนวเดียวกัน 3 - 4 ตาต่อหัว ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นเทียม ซึ่งประกอบด้วยกาบใบหุ้มซ้อนกันที่เกิดจากตาข้างของเหง้า มีความสูงของต้น 30 - 40 ซม.

2) ราก รากของปทุมมาเป็นระบบรากฝอย แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ รากค้ำจุน และรากสะสมอาหาร รากสะสมอาหารที่ปลายรากจะเป็นตุ่มสีขาว เก็บสะสมอาหารไว้ในช่วงพักตัว ก่อนงอกในฤดูต่อไป ในการเก็บเกี่ยวหัวพันธุ์จึงควรมีรากสะสมอาหารติดมาด้วย

3) ใบ ใบของปทุมมาเป็นแบบใบเดี่ยว มีแผ่นใบยาวรีสีเขียว ลักษณะรูปหอก หรือรูปไข่ เส้นกลางใบมีสีน้ำตาลอ่อน ขอบใบเรียว ขนาดใบกว้าง 4 - 5 ซม. ยาว 30 - 35 ซม. ใบเกิดจากส่วนของลำต้นใต้ดิน

4) ช่อดอก ดอกของปทุมมาเจริญออกทางยอดของต้น เป็นช่อแบบช่อเชิงลด (Compact spike) ประกอบด้วยกลีบประดับเรียงซ้อนกันเป็นระเบียบ กลีบประดับส่วนบนมีขนาดใหญ่สีม่วงอมชมพูเรียงซ้อนกัน มีจำนวน 12 - 15 กลีบ ส่วนกลีบประดับส่วนล่างสั้นมีสีเขียว มีจำนวน 8 - 10 กลีบ ส่วนโคนของกลีบประดับเชื่อมติดกัน ตรงปลายมีลักษณะป้านแผ่ออกเป็นช่องทำให้น้ำขังได้ ดอกแท้จริงของปทุมมาเกิดที่ซอกของกลีบประดับส่วนล่าง และบางส่วนของกลีบประดับส่วนบน ดอกจริงมี 3 - 4 ดอกต่อกลีบประดับ จะทยอยบานทีละดอกและบานเพียง 1 วันเท่านั้น ดอกจริงยาวประมาณ 4 ซม. เท่านั้น ประกอบด้วยกลีบดอก 6 กลีบ แบ่งออกเป็นชั้นนอก 3 กลีบ ชั้นใน 3 กลีบ กลีบดอกสีขาวยกเว้นกลีบส่วนล่างมีลักษณะเหมือนปากมีสีม่วงเข้มกับเหลือง เป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้มีก้านและแผ่นเชื่อมติดกับกลีบดอก เกสรตัวผู้มีลักษณะกลมเหนียวจับกันเป็นก้อน ยอดเกสรตัวเมียเป็นแบบปลายมีดคล้ายปากแตรชูอยู่เหนืออับเรณูตัวผู้ รังไข่มีขนาดประมาณ 0.5 ซม. มีไข่อ่อนคล้ายเมล็ดถั่ว 40 - 50 อัน เกาะติดอยู่ที่แกนกลางของรังไข่

5) เมล็ด ปทุมมาสามารถติดเมล็ดได้ถ้ามีการช่วยผสมเกสร เมล็ดมีรูปร่างยาวรีสีน้ำตาลมีเปลือกแข็งหุ้ม ปกติแล้วเมล็ดจะเริ่มแก่เมื่อช่อดอกเริ่มแห้ง แต่เมล็ดมักมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ (อังคณา, 2551) และ (สุรวิช, 2540)

2.3 ชนิดของพืชในสกุล *Curcuma*

พืชในสกุล *Curcuma* ที่พบในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อย คือ

1) สกุลย่อย *Paracurcuma* หรือพืชกลุ่มปทุมมามีลักษณะช่อดอกที่มีรูปทรงถ้วย โดยแทงช่อดอกออกมาจากส่วนกลางของลำต้นเทียม ก้านช่อดอกยาวตรง ดอกจริงมีสีม่วงหรือสีม่วงอ่อน พืชสกุลย่อยนี้ได้แก่ ปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep.) ช่อมรกต (*C. harmandii* Gagnep.) เทพรำลึก (*C. parviflora* Wall.) เทพอัปสร (*C. thorelii* Gagnep.) เป็นต้น พืชกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามเขตชายแดนไทย-ลาว และชายแดนไทย-เขมร ส่วนใหญ่มักพบตามทุ่งหญ้าที่โล่งแจ้งบริเวณชายป่าเบญจพรรณ หรือ บริเวณชั้นล่างของป่าเต็งรัง ไม้ในกลุ่มนี้มีหลายชนิดสามารถนำมาผลิตเป็นไม้กระถาง และไม้ประดับแปลงได้

2) สกุลย่อย *Eucurcuma* หรือพืชกลุ่มกระเจียวมีลักษณะช่อดอกเป็นรูปทรงกระบอก โดยแทงช่อดอกขึ้นมาจากเหง้าโดยตรง หรือออกจากทางด้างข้างของลำต้นเทียม ดอกจริงมีสีขาวหรือสีเหลือง พืชสกุลย่อยนี้ได้แก่ กระเจียวส้ม (*C. roscoeana* Wall.) อุษา พลอยไพลิน พลอยทักษิณ (C. *aurantiaca* Van.) บัวชั้น (*C. petiolata*) เป็นต้น พืชกลุ่มนี้พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ชนิดที่พบในที่โล่งแจ้งมักมีลักษณะใบหนามีขนมาก ส่วนพวกที่พบในป่าชื้นมักจะมีลักษณะใบบาง กระเจียวกลุ่มนี้มีหลายชนิดสามารถผลิตเป็นไม้ตัดดอก และเป็นไม้กระถางได้ (อังคณา, 2551) และ (สุรวิช, 2540)

2.4 การปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์ คือ การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ในระหว่างพืชชนิดเดียวกัน และผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดกัน เพื่อนำลักษณะที่ดีต่าง ๆ มารวมกันให้ได้พืชที่ต้องการ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชไม่ว่าจะเป็นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อความดีเด่นในลักษณะใด จะมีกระบวนการที่เป็นแบบแผนเดียวกันคือ

1) รวบรวมพันธุ์ (plant introduction) คือการเก็บรวบรวมแหล่งพันธุกรรมของลักษณะที่ต้องการปรับปรุง แหล่งพันธุกรรมได้จากพันธุ์ปลูก พันธุ์ป่า พันธุ์พืชที่อยู่ในสปีชีส์หรือจีนัสใกล้เคียง ทั้งที่หาได้ในประเทศ และขอจากแหล่งรวบรวมพันธุกรรม (germplasm collection หรือ germplasm bank) ต่างประเทศ เช่น แหล่งรวบรวมพันธุกรรมข้าวที่ IRRI และข้าวโพดที่ CYMMIT นอกจากพันธุ์แล้วยังอาจขอ Bulk population ที่มีฐานพันธุกรรมกว้าง หรือประชากร (population) ที่ยังไม่มีความคงตัวอื่นๆ นำมาปลูกทดสอบว่ามีลักษณะที่ต้องการหรือไม่ บางครั้งพบว่าพันธุ์ที่นำเข้ามามีคุณสมบัติดีกว่าพันธุ์ที่เกษตรกรปลูกอยู่ สามารถแนะนำให้ปลูกแทนพันธุ์เก่าได้ทันที

2) คัดเลือก (selection) ทำการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์ และประชากรที่รวบรวมได้โดยปลูกแล้วคัดเลือก ในขั้นนี้ก็อาจเป็นไปได้ว่าจะคัดเลือกได้พันธุ์ที่สามารถแนะนำให้เกษตรกรปลูกแทนพันธุ์เดิมได้ อาจจะอย่างน้อยก็ระยะหนึ่ง ก่อนจะปรับปรุงพันธุ์ใหม่เสร็จ

3) ผสมพันธุ์ (hybridization) ในกรณีที่สายพันธุ์หรือประชากรที่นำมาคัดเลือกนั้น ให้สายพันธุ์ที่มีลักษณะดีบางลักษณะ ก็นำลักษณะดีของแต่ละพันธุ์มารวมกันโดยการผสมพันธุ์ การผสมพันธุ์จะประสบความสำเร็จเมื่อใช้วิธีที่ถูกต้อง ในเวลาที่เหมาะสม และผู้ทำต้องมีประสบการณ์พอควร การผสมพันธุ์จะทำให้ยีนเกิดการกระจายตัว และรวมตัวใหม่ในชั่วลูกหลาน สำหรับพืชผสมข้ามสามารถจะสร้างพันธุ์ลูกผสม (F_1) ขึ้นได้เมื่อลูกผสม F_1 แสดงลักษณะดีเด่นสูงคุ้มกับการลงทุน (ศิริพร, 2547)

2.4.1 การผสมพันธุ์พืชต่างชนิด (สปีชีส์) (ศิริพร, 2547)

การปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์มีวัตถุประสงค์ที่สำคัญคือ การรวมลักษณะของพืชทั้งสองต้นเข้าด้วยกันหรือเพิ่มลักษณะที่ไม่มีเข้าไป เพื่อให้พืชที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับที่ต้องการมากที่สุด ซึ่งสามารถทำได้หลายระดับทั้งภายในสปีชีส์ ระหว่างสปีชีส์ หรือระหว่างสกุล การปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ภายในสปีชีส์เดียวกัน การผสมพันธุ์ไม่เป็นอุปสรรค แต่ลูกจะมีลักษณะไม่ต่างจากพ่อแม่พันธุ์มากนักหากฐานพันธุกรรมของพันธุ์พ่อแม่ไม่ต่างกัน สำหรับการผสมพันธุ์ภายนอกสปีชีส์แต่สกุลเดียวกันเป็นการผสมพันธุ์ที่ต้องอาศัยเทคนิคต่าง ๆ ช่วยในการผสม แต่จะทำให้ลูกที่ได้มีลักษณะที่แตกต่างไปจากพ่อแม่พันธุ์ ส่วนการผสมพันธุ์พืชต่างสกุล จะผสมติดยากอาจจะต้องผสมให้มีความใกล้เคียงกันก่อน จึงจะประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ ความสำเร็จของการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์นั้นขึ้นกับโครโมโซมของคู่ผสมว่ามีความใกล้เคียงกันหรือไม่ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของคู่ผสม หากคู่ผสมมีความสัมพันธ์กันมากจะมีโอกาสผสมติดมากกว่าคู่ผสมที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างกัน อาจกล่าวอย่างกว้างๆ ได้ว่า ความสำเร็จของการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ คู่ผสมจะต้องมีความคล้ายคลึงกันทางด้านพันธุกรรมมากที่สุด แต่มีความแตกต่างกันทางลักษณะมากที่สุด การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ (Cytogenetics) และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Genetic Relationship) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ จะช่วยทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดของคู่ผสมได้

ในหลาย ๆ กรณีที่การผสมระหว่างพันธุ์ในพืชชนิดเดียวกันไม่สามารถให้ผลทางพันธุกรรมที่ต้องการได้ ตัวอย่างเช่น ในมันฝรั่งพันธุ์ปลูกทุกพันธุ์ที่อยู่ใน สปีชีส์ *Solanum tuberosum* L. จะอ่อนแอต่อโรคใบไหม้ ไวรัส และโรคอื่น ๆ จึงทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก และยากที่จะได้พันธุ์ต้านทานโรคจากการผสมพันธุ์พืชที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน เพราะทุกพันธุ์ขาดความต้านทานที่เหมาะสม ดังนั้นการผสมพันธุ์พืชต่างชนิดจึงถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการถ่ายทอดลักษณะที่ดี เช่น ความต้านทานโรคจากสปีชีส์อื่นซึ่งอาจเป็นพันธุ์ป่าหรือพันธุ์ปลูกก็ได้ การถ่ายทอดลักษณะบางลักษณะจากแหล่งพันธุกรรมจากพืชสปีชีส์หนึ่งไปยังอีกสปีชีส์หนึ่งเรียกว่า อินโทรเกรสชั่น (introgression) โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของการผสมกลับลูกผสมที่ได้ไปยังพ่อหรือแม่ วิธีการนี้จะทำให้สามารถถ่ายทอดลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่ต้องการโดยไม่กระทบกระเทือนต่อลักษณะอื่นๆ ของพันธุ์เดิมเมื่อทำการผสมข้ามสปีชีส์ของพืชที่มีความใกล้เคียงกันจะสามารถทำให้เกิดการรวมตัวของลักษณะที่ดีจากพ่อ และแม่ เนื่องจากการรวมตัวกันใหม่ของยีนในชั่วลูก การผสมพืชต่างชนิดจะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้ลักษณะพันธุกรรมใหม่ที่แตกต่างไปจากพ่อแม่เดิม ซึ่งมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ เพราะ สี ขนาด รูปร่าง เป็นลักษณะที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ (อังคณา, 2551)

2.4.2 ลักษณะของลูกผสมต่างชนิด (ศิริพร, 2547)

การกระจายตัวในชั่วลูกของลูกผสมต่างชนิดจะมีความผันแปรสูงมากกว่าการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ในพืชสปีชีส์เดียวกัน ความสมดุล และความคงตัวทางพันธุกรรมของพืชชนิดใหม่จะเกิดขึ้นในชั่วหลัง ๆ อย่างไรก็ตามขอบเขต และรูปแบบของความแปรปรวนของลักษณะที่แตกต่างจะขึ้นกับความใกล้ชิดกันทางสรีรวิทยาของสปีชีส์พ่อแม่ จำนวนโครโมโซม และโครงสร้างทางพันธุกรรม ดังนั้นลูกผสมต่างชนิดสามารถจัดแบ่งได้ 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกัน มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน และมีระดับการเข้าคู่กันของโครโมโซมสูง ซึ่งจะให้ลูกผสมที่มีความสมบูรณ์ทางเพศ ความสมบูรณ์ทางเพศของลูกผสมขึ้นกับระดับของการเข้าคู่กันของโครโมโซม ว่าโครโมโซมเข้าคู่กันได้ทั้งหมดหรือเข้าคู่กันบางส่วน ซึ่งจะทำให้การสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในลูกผสมชั่วที่ 1 เกิดได้แบบปกติไม่มากก็น้อย และจัดเป็นพวกสมบูรณ์ทางเพศ ตัวอย่างเช่น การผสมข้ามระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ปลูกกับมะเขือป่าซึ่งมียีนที่ต้านทานต่อโรค *Cercosporosis* โรคเหี่ยว และโรคใบไหม้ ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์พืชไม่พบอุปสรรคใดในการผสมข้ามระหว่างพืช 2 สปีชีส์นี้

Lycopersicon esculentum X *L. pimpinellifolium* Mill.

(2n = 24) (2n = 24)

↓

ลูกผสมต่างชนิด

กลุ่มที่ 2 เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสปีชีส์ในสกุล (genus) เดียวกันแต่ชุดพันธุกรรมต่างกัน ลูกผสมต่างชนิดในกลุ่มนี้จะสมบูรณ์ทางเพศต่อเมื่อสปีชีส์ทั้ง 2 ชนิดที่ผสมข้ามมีจำนวนโครโมโซมที่เข้าคู่กันได้หมดหรือได้บางส่วนไม่อย่างนั้นกระบวนการไมโอซิสในลูกผสมจะผิดปกติ ไม่สามารถสร้างกามีท หรือเซลล์สืบพันธุ์ได้เนื่องจากความแตกต่างของจำนวน และโครงสร้างของโครโมโซม ดังนั้นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสปีชีส์ที่แตกต่างกันมากทางโครงสร้างของโครโมโซมจะเป็นหมัน นอกจากนี้การผสมข้ามสปีชีส์ในกลุ่มนี้ในระดับดิพลอยด์ (2n = 2x) อาจเกิดการขาดหายบางส่วนของโครโมโซมในหน่วยสืบพันธุ์ในต้นลูกผสมต่างชนิด หรือขาดยีนสำคัญซึ่งจะทำให้ลูกผสมตายได้

นักปรับปรุงพันธุ์พืชหลายท่านได้พยายามทำการผสมข้ามปอ (Jute) สปีชีส์ที่มีผลยาวกับสปีชีส์ที่มีผลสั้นและออกดอกได้ตลอด ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 14 เพื่อผลิตลูกผสมแต่ไม่ประสบผลสำเร็จ เพิ่งไม่นานนักที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชชาวอินเดียประสบผลสำเร็จในการสร้างลูกผสมระหว่าง ปอ 2 สปีชีส์นี้

Corchorus olotorius L. X *C. capsularis* L.

ผลยาว 2n = 14 ผลสั้น 2n = 14

↓

ต้นลูกผสม

ในทำนองเดียวกันกับการผสมข้ามระหว่างข้าวต่างสปีชีส์ จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของข้าวสปีชีส์ต่างๆ พบว่ามีโครโมโซมทั้งหมด 11 แบบ ที่มีขนาด และรูปร่างต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้าวแต่ละสปีชีส์มีโครงสร้างโครโมโซมที่แตกต่างกัน และประมาณ 2 ใน 3 ของสปีชีส์ข้าวทั้งหมดเป็นพวกดิพลอยด์ (2n = 2x = 24) ส่วนที่เหลือเป็นพวกสปีชีส์เททราพลอยด์ (2n = 4x = 48) พวกดิพลอยด์ที่แตกต่างกันประกอบด้วยชุดจีโนมต่อไปนี้ AA ,A^bA^b ,A^gA^g ,CC ,EE ,FF ส่วนชุดจีโนมของสปีชีส์เททราพลอยด์ คือ BBCC และ CCDD และพบว่าข้าวพันธุ์ปลูกมีชุดจีโนมเป็น AA จะเข้ากันไม่ได้กับชุดจีโนมอื่น ๆ จากการทดลองพบว่าสามารถสร้างข้าวอัลโลโพลีพลอยด์ (allopolyploid) ที่มีจีโนไทป์เป็น AACC AABBCC และ AABBDD ได้สำเร็จ

นอกจากนี้ถ้านำพืชสปีชีส์ที่เป็นดิพลอยด์ (2n = 2x) ผสมกับสปีชีส์ที่เป็นเททราพลอยด์ (2n = 4x) อัตราการติดเมล็ดทั่วไปจะต่ำ เช่น การผสมข้ามระหว่างข้าวสาลีดิพลอยด์กับเททราพลอยด์พบว่าอัตราที่ได้ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และการผสมข้ามระว่างสปีชีส์ที่เป็นดิพลอยด์ (2n = 2x) กับสปีชีส์ที่เป็นเฮกซาพลอยด์ (2n = 6x) จะยิ่งยากขึ้นไปอีก การผสมข้ามระหว่างสปีชีส์ที่เป็นโพลีพลอยด์จะง่ายกว่าและลูกผสมที่สมบูรณ์เพศอาจเกิดขึ้นได้แม้พ่อและแม่จะแตกต่างกันทั้งในระดับของจำนวนชุดพันธุกรรม และจำนวนโครโมโซม แต่ทั้งนี้จะเป็นไปได้ก็ต่อเมื่อสปีชีส์ของพ่อและแม่มีชุดพันธุกรรมที่เหมือนกัน ตัวอย่างเช่น

ข้าวสาลีเฮกซาพลอยด์ X ข้าวสาลีเททราพลอยด์

(AABBDD) (AABB)

↓

ลูกผสมสมบูรณ์เพศ

กลุ่มที่ 3 เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพืชต่างสกุล การผสมข้ามระหว่างพืชสปีชีส์หนึ่งกับอีกสปีชีส์หนึ่งจะยากยิ่งขึ้นถ้าพืชทั้ง 2 สปีชีส์มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา เซลล์วิทยา และพันธุกรรม การผสมระหว่างพืชต่างสกุลเป็นการผสมข้ามระหว่างพืชที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด ด้วยเหตุนี้งานของนักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงยากมาก ในกรณีเช่นนี้จำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคพิเศษเข้าช่วยเพื่อให้ประสบความสำเร็จ

งานทดลองของ Karpechenko ในปี ค.ศ. 1922 ที่ทำการผสมข้ามระหว่างหัวผักกาด (2n = 18) กับกะหล่ำปลี (2n = 18) พบว่าลูกผสมที่ได้เป็นหมันเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ เหลือติดเมล็ดน้อยมาก Karpechenko เป็นคนแรกที่แสดงให้เห็นว่าความเป็นหมันในลูกผสมระหว่างพืชต่างชนิดสามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มชุดของโครโมโซมในเซลล์ร่างกายของสปีชีส์ที่ทำการผสมข้าม

ลูกที่ได้จากการผสมพืชต่างสกุลจะคล้ายกับลูกที่ได้จากลูกผสมระหว่างพืชสกุลเดียวกันแต่ชุดโครโมโซมต่างกัน ในกรณีนี้ลูกที่ได้ในชั่วหลังๆ จะกลับไปมีลักษณะเหมือนกับพ่อแม่รูปแบบที่อยู่กึ่งกลางระหว่างสปีชีส์พ่อและแม่จะเกิดได้ก็ต่อเมื่อทำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเท่านั้น

2.4.3 เทคนิคในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการผสมพันธุ์ข้ามชนิดหรือสกุล

สำหรับพืชที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ หรือข้ามสกุลมักมีลักษณะที่หลากหลาย นักปรับปรุงพันธุ์จึงนิยมปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการผสมข้ามสปีชีส์หรือข้ามสกุล แต่การผสมก็มีอุปสรรคต่าง ๆ ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จ เช่น การเข้ากันไม่ได้ของคู่ผสม (cross incompatibility) เมล็ดลูกผสมไม่สามารถงอกเป็นต้นหรือเป็นเมล็ดบอด ต้นลูกผสมที่ได้เป็นหมัน จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคต่าง ๆ เพื่อแก้ปัญหาดังนี้

2.4.3.1 เมื่อเกิดการเข้ากันไม่ได้ของคู่ผสม สามารถแก้ไขได้ดังนี้

1. ทำการผสมทั้งทางตรง และผสมกลับ
2. ใช้พืชที่มีไบโอไทป์ แตกต่างกันในการผสม
3. ถ่ายละอองเกสรในระยะเวลาที่แตกต่างกัน
4. ตัดก้านชูเกสรตัวเมียให้สั้นลง
5. ก่อนถ่ายละอองเกสรให้ตัดปลายยอดเกสรตัวเมียออก แล้ววางวุ้นที่มีอาหารลงแทนที่
6. ฉีดพ่นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตบนเกสรตัวเมีย
7. ถ่ายละอองเกสรโดยใช้ละอองเกสรผสมจากหลายต้นตัวผู้
8. นำพืชทั้ง 2 ชนิด มาไว้ใกล้กันก่อนการผสมเกสร
9. นำต้นพืชที่จะทำการผสมไปผ่านขบวนการบางอย่างก่อนการผสม เช่น ใช้สารเคมี หรือปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิร้อน หรือเย็น เป็นต้น
10. นำไข่อ่อนไปเพาะเลี้ยงและทำการผสมในสภาพปลอดเชื้อ
11. เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

2.4.3.2 เมื่อเมล็ดลูกผสมไม่สามารถงอกเป็นต้น หรือเป็นเมล็ดบอด สามารถแก้ไขได้ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเอมบริโอหรือเรียกว่าการช่วยชีวิตเอมบริโอ (embryo recue) เป็นการนำเอาส่วนของเอมบริโอออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ก่อนที่เอมบริโอนั้นจะฝ่อหรือหยุดการ

พัฒนาเนื่องจากลูกผสมจากการผสมข้ามชนิด (interspeific) นั้น จะมีปัญหาทางพันธุกรรม และมักไม่สามารถพัฒนาเป็น เอมบริโอและเมล็ดที่สมบูรณ์ได้

2. ถ้าต้นลูกผสมตาย หรือไม่เจริญอาจแก้ไขได้โดยการทาบกิ่งต้นลูกผสมลงบนสปีชีส์พ่อหรือแม่ หรือ สปีชีส์ที่อยู่สกุลเดียวกัน

ปัญหาการไม่สามารถงอกของเมล็ดก็เป็นปัญหาที่พบบ่อย ทั้งนี้อาจเกิดจากอาหารสะสมไม่เพียงพอ หรือกรณีมีสิ่งยับยั้งในการงอก เช่น เปลือกเมล็ดมีลักษณะแข็ง มีสารเคลือบเปลือกเมล็ด หรือมีสารเคมีบางชนิดไปยับยั้งการงอกของเมล็ด

2.4.3.3 เมื่อต้นลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) เป็นหมัน

ความเป็นหมันของลูกผสมอาจเกิดจากปัจจัยของโครโมโซมหรือยีน หรือการเข้ากันไม่ได้ระหว่างไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสของพ่อแม่ ทั่วไปแล้วความเป็นหมันเนื่องจากโครโมโซมเกิดจากความแตกต่างของจำนวน หรือการเข้าคู่กันไม่ได้ของโครโมโซมซึ่งทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสล้มเหลว วิธีการที่นิยมใช้ในการแก้ไขความเป็นหมันในลูกผสมแบ่งได้ 2 วิธี คือ

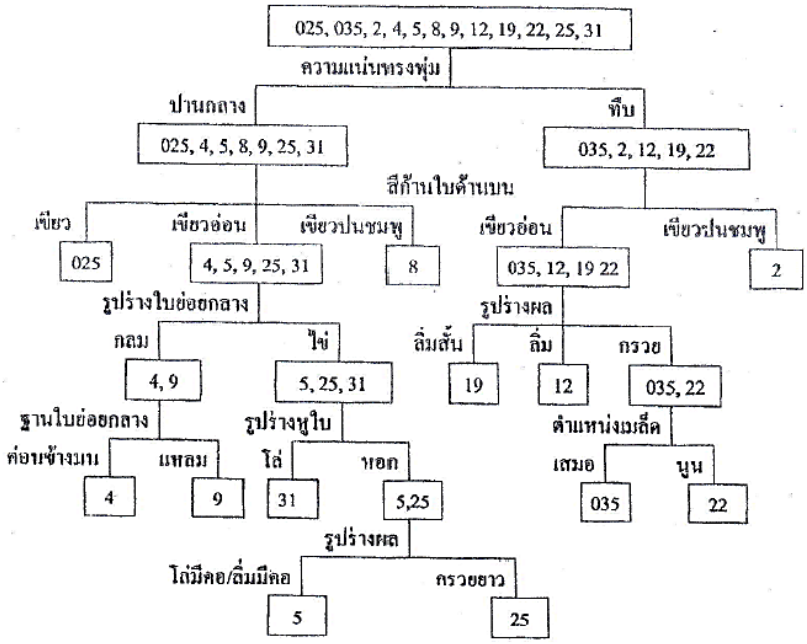
1. การผสมกลับโดยใช้ต้นลูกผสมเป็นแม่เสมอโดยอาศัยความเป็นจริงที่ว่าหน่วยสืบพันธุ์เพศเมียที่สร้างโดยต้นลูกผสมจะแข็งแรง และมีชีวิตมากกว่าหน่วยสืบพันธุ์เพศผู้ ดังนั้น จึงแนะนำให้ใช้ลูกผสมเป็นต้นแม่แล้วถ่ายละอองเกสรของพ่อหรือแม่ลงบนต้นลูกผสม โดยวิธีนี้อาจได้เมล็ดจากการผสมกลับ หรืออาจใช้ละอองเกสรจากสปีชีส์ที่ 3 ก็ได้

2. การเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าโดยใช้สารโคซิซิน เป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการแก้ไขปัญหาความเป็นหมันในลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุล วิธีนี้จะได้ลูกผสมที่มีโครโมโซมต่างชุดกันเพิ่มเป็น 2 เท่า ทำให้แต่ละชุดของโครโมโซมมีคู่ของโครโมโซมที่จับคู่กันในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส และสร้างกามีทเพื่อการผสมพันธุ์ได้

2.5 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสม

2.5.1 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมโดยวิธีสัณฐานวิทยา

การจำแนกพันธุ์โดยการศึกษาสัณฐานวิทยาซึ่งได้แก่ โครงสร้างส่วนต่างๆ ของพืช ลักษณะลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด เพื่อเป็นเกณฑ์การจัดจำแนกพืช โดยพืชที่สืบสายมาจากต้นเดียวกันย่อมมีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน เมื่อนำพืชมาผสมพันธุ์ข้ามชนิดลูกผสมอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไป ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างทางสัณฐานวิทยานับว่าเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากสามารถแสดงลักษณะต่างๆ ของพืชได้อย่างชัดเจน ยกตัวอย่างเช่น การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมสตรอเบอรี่โดยใช้ลักษณะของความแน่นทรงพุ่ม สีก้านใบด้านบน รูปร่างใบย่อยกลาง รูปร่างหูใบ รูปร่างผล และตำแหน่งเมล็ด สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นลูกผสมได้ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 1 (ปราโมทย์, 2543)



ภาพที่ 1 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมโดยวิธีสัณฐานวิทยา

หมายเลข CMU025 และCMU035 คือ พ่อแม่พันธุ์ หมายเลข 2, 4, 5, 8, 9, 12, 19, 22, 25 และ 31 คือต้นลูกผสม

2.5.2 การจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมโดยวิธีทางพันธุศาสตร์

การจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาเป็นการดูเพียงลักษณะภายนอก เช่น ดอก ใบ ราก เป็นต้น มีความยากลำบาก และอาจใช้เวลานาน ดังนั้นเทคนิคทางพันธุศาสตร์ซึ่งได้แก่ เทคนิคทางพันธุศาสตร์เซลล์ (cytogenetics) โดยเฉพาะการนับจำนวนโครโมโซม เทคนิค Genome in *situ* hybridization (GISH) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ซึ่งใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตสำเร็จมาแล้วหลายชนิดอาจจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และการจำแนกลูกผสมข้ามชนิดในงานวิจัยนี้ได้

2.5.2.1 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์เซลล์ (อลงกลด, 2554)

โดยทั่วไปจำนวนโครโมโซม (chromosome number) จะคงที่ในเซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ความผันแปรของจำนวนโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็อาจตรวจพบได้ เช่น ในตัวอย่างของพืช Hops (*Humulus japonicas*) เพศเมียจะมีโครโมโซมเป็น XX แต่เพศผู้จะมีโครโมโซมเป็น XXX จึงสรุปได้ว่าความผันแปรของจำนวนโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สามารถที่จะตรวจพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ซึ่งเป็นข้อยกเว้นจากปกติ ในสภาพปกติจำนวนโครโมโซมของเซลล์ร่างกายในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะถูกเรียกว่า โซมาติก (somatic) ไซโกติก (zygotic) หรือดิพลอยด์

นัมเบอร์ (diploid number) จำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์จะเรียกว่าแฮพลอยด์ (haploid) หรือแกมิติกนัมเบอร์ (gametic number) จำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตที่น้อยที่สุดพบคือ 2n = 2 พบในพวกพยาธิตัวกลม (*Ascaris megalacephala*) ในสัตว์ชั้นสูงมีจำนวนโครโมโซมที่น้อยที่สุดคือ เก้งธรรมดาเพศเมียมีจำนวนโครโมโซม 2n = 6 เพศผู้มีจำนวนโครโมโซม 2n = 7 ในพืชชั้นสูง *Haplopappus gracillis* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 6 โดยพบว่าพืชที่เป็นดิพลอยด์ส่วนมากจะมีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 15 - 20 แท่ง จะมีเพียงส่วนน้อยที่มีจำนวนโครโมโซมมากหรือน้อยกว่านี้ ในพืชที่พบจำนวนโครโมโซมมากที่สุดคือ เฟิร์น (*Ophioglossum petiolatum*) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 1,020 จากความรู้เบื้องต้นที่ทราบว่าจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตภายในสปีชีส์เดียวกันจะเท่ากัน และลูกจะได้โครโมโซมครึ่งหนึ่งจากพ่อและแม่ ดังนั้นหากปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมข้ามชนิดลูกผสมที่ได้จะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับผลรวมของโครโมโซมของเซลล์สืบพันธ์จากต้นแม่และต้นพ่อ จึงสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้จากจำนวนโครโมโซม และสามารถตรวจสอบว่าลูกผสมนั้น เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพืชชนิดใด การตรวจสอบองค์ประกอบทางจีโนมของลูกผสมนั้น โดยใช้เทคนิค Genome in *situ* hybridization (GISH)

การเตรียมโครโมโซมพืชเพื่อใช้ในการนับจำนวนโครโมโซมและเทคนิค GISH

1. ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการเตรียมโครโมโซม

1.1 การทำ Pretreatment

การศึกษาโครโมโซมพืชเพื่อตรวจสอบจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมมีหลายวิธีแต่ละวิธีจะเลือกเอาเซลล์ระยะเมทาเฟส เพราะเป็นระยะที่มีโครโมโซมขดสั้นมากที่สุดเห็นโครโมโซมได้ชัดเจน เพื่อที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟส ได้มีการนำสารเคมีต่าง ๆ มาใช้ยับยั้งเซลล์ให้หยุดในระยะเมทาเฟส ทำให้โครโมโซมขดตัวสั้นลง หรือยับยั้งเส้นใยสปินเดิลทำให้โครโมโซมไม่เรียงกลางเซลล์กระจายทั่วไซโทพลาสซึม เรียกการเหนี่ยวนำนี้ว่า Pretreatment ภายหลังจากการทำ Pretreatment จะตรึงเซลล์ (Fix) ด้วยน้ำยาตรึง (fixative) ต่อไป มีสารเคมีหลายชนิดที่ใช้เพื่อการทำ Pretreatment เช่น สารโคลชิซิน (colchicine) 8-ไฮดร็อกซีควิโนลีน (8 hydroxy-quinoline) และ พาราไดคลอโรเบนซีน (paradichlorobenzine) รวมทั้งการใช้น้ำเย็นด้วย เป็นต้น

1.2 การตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ เป็นการหยุดการทำงานของเซลล์ และทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิมโดยใช้น้ำยาตรึงเซลล์ซึ่งต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง น้ำยาตรึงเซลล์ที่นิยมใช้ ดังนี้

1) Carnoy’s solution ประกอบด้วยเมทานอลเข้มข้นต่อกรดอะซิติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3 : 1

2) Farmer’s solution ประกอบด้วยเอทานอลเข้มข้นต่อคลอโรฟอร์มต่อกรดอะซิติกเข้มข้นในอัตราส่วน 6 : 3 : 1

1.3 สีย้อมโครโมโซม (stain)

สีที่นิยมใช้ในการศึกษาโครโมโซมพืช คือ อะซิโท-คาร์มีน ในกรณีที่มีสนิมเหล็กปนอยู่ในสีนี้จะทำให้โครโมโซมติดสีดีมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันนี้มีสีหลายชนิดที่นิยมนำมาใช้ย้อมโครโมโซมพืช เช่น สีแลคโท-โพรพิโอนิค ออร์ซีน (lacto-propionic orcein) สีอะซีโท-ออร์ซีน (aceto-orcein) สีแอลกอฮอลิค-ไฮโดรคลอริค-แอซิด คาร์มีน (alcoholic-hydrochloric-acid carmine) และสีฟอร์ยเก็น (Feulgen) เป็นต้น

1.4 การทำสไลด์ชั่วคราว (temporary slide)

การเก็บรักษาสไลด์เอาไว้ชั่วคราว เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้าไปปนเปื้อนตัวอย่างเซลล์พืช จะใช้วิธีการปิดรอบ ๆ กระจกปิดสไลด์ให้แน่นด้วยสารที่มีความเหนียวหรือขี้ผึ้งที่มีคุณสมบัติสามารถขูดออกได้ง่าย ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการที่จะกลับมาทำสไลด์ถาวรต่อไป สารที่นิยมใช้มีหลายชนิดดังนี้

1) Dahl’s varnish-beewax-paraffin โดยใช้ส่วนผสมของ Turtox ringing vanish: beeWax: paraffin ในอัตราส่วน 0.5 : 1 : 2

2) ส่วนผสมของ gum-mastic และ paraffin ในอัตราส่วน 1 : 1 ตั้งไฟให้ร้อนคนให้เข้ากัน แล้วกรองหยาบๆ เพื่อเอาเศษผงที่ไม่ต้องการออก

3) ส่วนผสมของ lanolin และ paraffin ในอัตราส่วน 1 : 1 ตั้งไฟให้ร้อนคนให้เข้ากัน

4) ใช้น้ำยาทาเล็บ (ชนิดใส) โดยทารอบกระจกปิดสไลด์ วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เป็นการยากที่จะขูดน้ำยาทาเล็บออกเพื่อจะทำสไลด์ถาวรอีกครั้ง

1.5 การทำสไลด์ถาวร (permanent slide)

การทำสไลด์ถาวรวิธีการที่สะดวกที่สุด คือ วิธี dry ice technique

1) วางแผ่นสไลด์บนน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่เป็นก้อนเรียบ โดยวางให้แผ่นกระจกปิดสไลด์อยู่ด้านบน และแผ่นสไลด์อยู่ด้านล่างติดกับน้ำแข็งแห้ง ใช้ปลายดินสอกดให้สไลด์ติดกับน้ำแข็งแห้ง เพื่อให้เซลล์พืชที่เตรียมจะเย็นและแข็ง

2) ใช้ปลายมีดเปิดแผ่นสไลด์ออกอย่างรวดเร็วในขณะที่แผ่นสไลด์ยังเย็น จัดนำเอาแผ่นสไลด์วางทำมุม 45 องศากับพื้น ใช้ที่เป่าผมเป่าลมร้อนอ่อน ๆ ให้กับแผ่นสไลด์จนแห้ง

3) ล้างแผ่นสไลด์ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้แผ่นสไลด์แห้ง

4) ทำการ mount สไลด์ด้วยสาร premount เช่น diaphane, euparal เป็นต้น

2. เนื้อเยื่อสำหรับการเตรียมโครโมโซมจากพืช

2.1. ปลายราก

การเตรียมโครโมโซมจากปลายรากเป็นวิธีเตรียมโครโมโซมพืชที่นิยมมากที่สุด โดยเป็นการเตรียมจากโซมาติกเซลล์ (somatic cell) หรือเซลล์ร่างกาย เทคนิคที่ใช้ในการเตรียมคือ เทคนิคการบดขยี้เซลล์ (squash technique)

2.2. การเตรียมโครโมโซมจากดอกพืช

ดอกพืชที่นำมาศึกษาการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ (ไมโอซิส) ต้องเลือกดอกที่กำลังมีการแบ่งเซลล์ เป็นดอกที่ไม่อ่อน และไม่แก่มากเกินไป ซึ่งนิยมศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในเซลล์ไมโครสปอร์โรไซท์ของละอองเกสรเพศผู้

3. การเตรียมสไลด์ และการหยดเซลล์

3.1 การเตรียมสไลด์

แผ่นสไลด์ที่นำมาศึกษาโครโมโซม ควรไม่มีคราบสกปรกหรือคราบไขมันปนเปื้อนอยู่บนแผ่นสไลด์ สไลด์ที่สะอาดเมื่อมีการหยดสารละลายตะกอนเซลล์ จะทำให้เซลล์แผ่กระจายตัวดี และส่งผลให้เมทาเฟสโครโมโซมมีการกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน ซึ่งมีวิธีการเตรียมสไลด์ดังนี้

1) นำสไลด์มาล้างด้วยผงซักฟอกหรือน้ำยาล้างจานจนแน่ใจว่าสะอาดดี

2) ทำการล้างน้ำเปล่า โดยการถูให้สะอาด จนแน่ใจว่าน้ำยาที่ใช้ล้างออกหมด แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าอีก 2 - 3 ครั้ง

3). นำสไลด์ไปแช่ใน 1N HCl อย่างน้อย 1 คืน จากนั้นนำสไลด์เก็บไว้ในน้ำกลั่น แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) เมื่อนำสไลด์มาใช้ด้วยการหยดเซลล์ลงบนสไลด์ ต้องหยดในสภาพที่สไลด์เย็นจัด ภายหลังจากที่นำสไลด์ออกมาจากการแช่เย็นได้ไม่นาน

3.2 การหยดเซลล์

1) ในกรณีที่ตะกอนเซลล์เก็บรักษาอยู่ในน้ำยาตรึงเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต้องทำการเปลี่ยนน้ำยาตรึงใหม่ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดส่วนน้ำยาตรึงเซลล์ด้านบนทิ้ง แล้วเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปใหม่ประมาณ 1 - 2 มล. ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนเซลล์ที่มีอยู่

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็นจัด ประมาณ 3 หยด โดยไม่ซ้ำตำแหน่งเดิม หยดให้สูงจากสไลด์ประมาณ 1 - 2 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตกกระจาย และโครโมโซมมีการกระจายตัวดี ทิ้งสไลด์ให้แห้ง จึงนำมาตรวจโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยปรับแสงให้น้อยที่สุด เลือกสไลด์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟส และมีการกระจายตัวของโครโมโซมดีไว้ย้อมสีโครโมโซม

เทคนิค *In situ* hybridization

เทคนิค *In situ* hybridization เป็นเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล (molecular cytogenetics) ที่อาศัยหลักการจับคู่กันระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) กับดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) โดยดีเอ็นเอเป้าหมาย หมายถึง ดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการค้นหาว่ามีตำแหน่งใดบนแท่งโครโมโซม และดีเอ็นเอโพรบ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้ในการติดตามตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยที่ดีเอ็นเอเป้าหมายกับ โพรบต้องเป็นเบสคู่สมกัน (complementary) มีการพัฒนาเทคนิคเพื่อหาตำแหน่งของดีเอ็นเอหรือยีนเป้าหมายในจีโนมของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นเทคนิคที่อาศัยการย้อมสีชนิดพิเศษเพื่อให้ทราบตำแหน่งของยีน หรือลำดับของเบสที่สนใจบนแท่งโครโมโซม ภาพที่ 2 แสดงวิธีการหาตำแหน่งของยีนหรือดีเอ็นเอที่สนใจว่ามีตำแหน่งใดบนโครโมโซมโดยใช้เทคนิค FISH ซึ่งสามารถสรุปเป็น 4 ขั้นตอนหลัก คือ

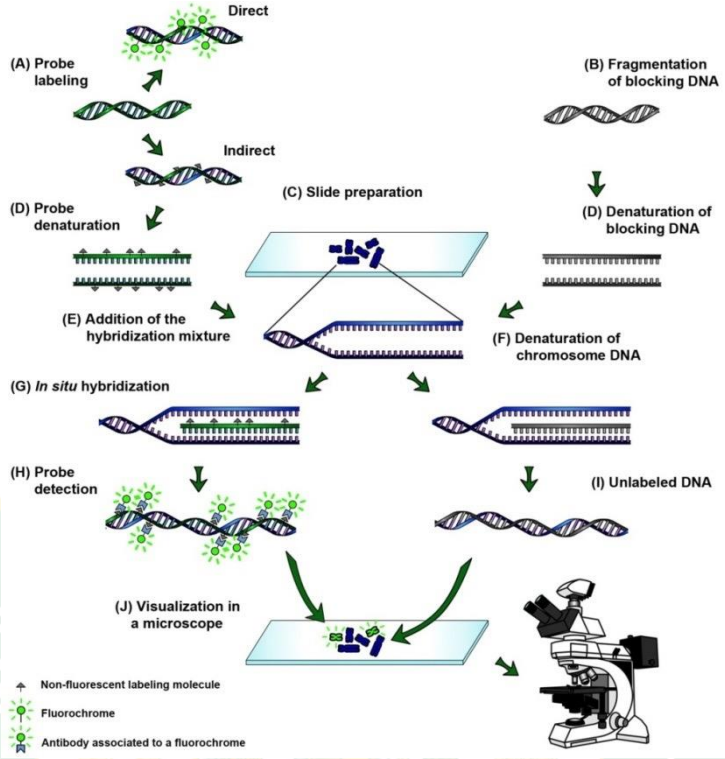
1) การเตรียมตัวอย่าง เทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่ต้องการหาตำแหน่งดีเอ็นเอหรือยีนบนแท่งโครโมโซม ดังนั้นการเตรียมโครโมโซมจึงมีความสำคัญมาก ต้องกำจัดโซโทพลาสซึม อาร์เอ็นเอ และขยะที่อยู่ในนิวเคลียสออกโดยการใช้เอนไซม์ย่อย เพื่อลดสัญญาณรบกวนจากการจับกันระหว่างโพรบกับโปรตีน ไลปิด คาร์โบไฮเดรต และอาร์เอ็นเอ

2) การเตรียมและการติดฉลากดีเอ็นเอโพรบ ดีเอ็นเอโพรบอาจเป็นยีนที่สนใจหรือดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ถูกติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ หรือไม่ใช่สารฟลูออเรสเซนซ์ การติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์เรียกว่า การติดฉลากแบบทางตรงซึ่งสามารถตรวจสอบการเรืองแสงได้โดยตรง ส่วนการติดฉลากที่ไม่ใช่สารฟลูออเรสเซนซ์เรียกว่า การติดฉลากแบบทางอ้อมซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากสารตัวที่สอง หรือสามที่เป็นสารฟลูออเรสเซนซ์

3) การไฮบิไดซ์โพรบกับตัวอย่างโครโมโซมที่ต้องการ โดยการทำให้โครโมโซมบนสไลด์เสียสภาพธรรมชาติด้วยสารฟอร์มามายด์ (Formamide) แล้วจึงหยดโพรบที่ทำให้เสียสภาพด้วยความร้อนบนสไลด์ หลังจากนั้นบ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความชื้น เพื่อให้โพรบเข้าไฮบริไดซ์กับตำแหน่งที่เป็นคู่สมกันบนโครโมโซม เวลาที่ใช้ในการไฮบริไดซ์ของโพรบกับโครโมโซมขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ ว่ามีความใกล้หรือมีความห่างไกลกันทางวิวัฒนาการ

4) การตรวจสอบและการแสดงผล การตรวจหาตำแหน่งของยีนหรือช่วงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สนใจบนแท่งโครโมโซมใช้เทคนิค *In situ* hybridization ร่วมกับ immunocytochemistry คือ อาศัยการเข้าคู่กันของโครโมโซมและโพรบที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลหรือสารเคมีที่สามารถติดตามได้ด้วยสารเรืองแสง แล้วจึงติดตามการเรืองแสงของโพรบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจบนโครโมโซม

ดีเอ็นเอโพรบนอกจากจะเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่เป็นบริเวณใดบริเวณหนึ่งของโครโมโซมดังที่กล่าวมาในเทคนิค FISH แล้ว เราสามารถใช้ดีเอ็นเอโพรบเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่สนใจได้ เพื่อศึกษาองค์ประกอบของจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่สนใจว่าประกอบด้วยดีเอ็นเอมาจากแหล่งใดบ้าง เรียกเทคนิคนี้ว่า Genome *in situ* hybridization (GISH) เทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมของพืช ใช้ตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrids) หรือข้ามสกุล (intergeneric hybrids) โดยตรวจสอบองค์ประกอบของจีโนมที่ได้รับมาจากพ่อหรือแม่ได้ (อลงกลด, 2554)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดโดยวิธี genomic *in situ* hybridization (GISH)
ที่มา : Brammer et al., (2003)

2.5.2.2 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552)

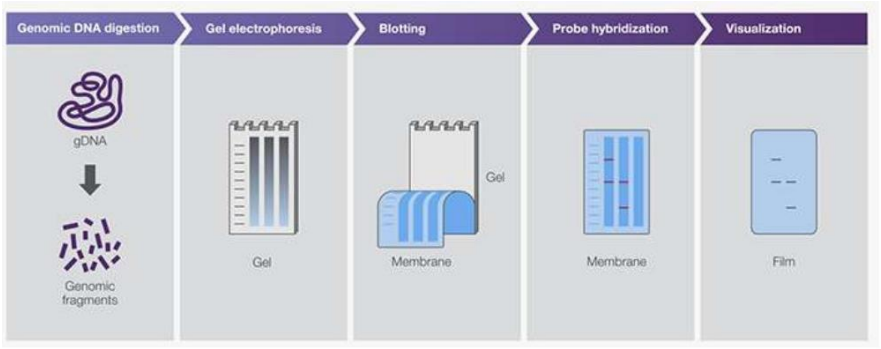
เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) คือ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอของแต่ละสิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน หรือมีความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ระหว่างสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดรูปแบบของการจัดเรียง นิวคลีโอไทด์หลายรูปแบบ หรือเรียกว่าเกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ซึ่งอาจทำให้เกิดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว สายพันธุ์ หรือชนิดของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงถูกนำมาใช้เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) และยังเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (plant patent) และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) อีกด้วย (จุฑาพร แสงประจักษ์, 2555)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ แบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

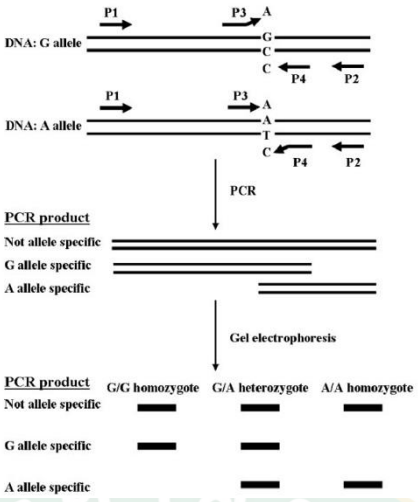
1) Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอตรวจสอบ (โพรบ) ได้แก่ เครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) คือ ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) วิธีการเริ่มจากการตัดดีเอ็น-เอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส หลังจากนั้นแยกดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาไว้บนแผ่นเมมเบรนแล้วใช้โพรบหรือดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากสำหรับติดตาม เพื่อบอกความแตกต่างของจีโนม ความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของเทคนิค RFLP เกิดจากดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนลำดับเบสต่างไปจากเดิม ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย RFLP
ที่มา : Mahadwala, (2017)

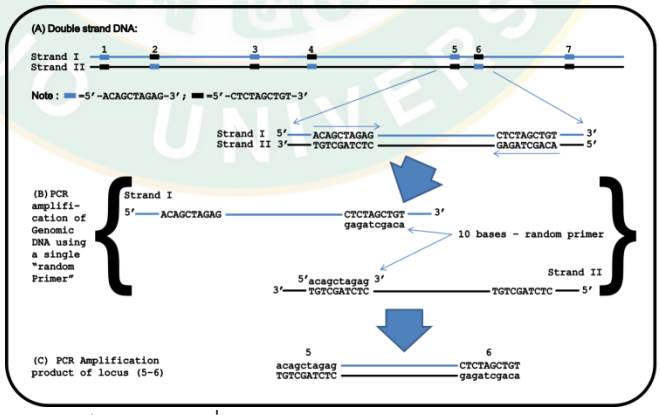
2) PCR-based marker เป็นการนำเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) มาประยุกต์ใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอกลุ่มนี้มีหลายชนิดมีทั้งแบบตรวจสอบได้ทีละตำแหน่งและตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน เครื่องหมายที่ตรวจสอบหลายตำแหน่งพร้อมกันเป็นการตรวจสอบแบบสุ่มไม่จำเพาะกับตำแหน่งใด ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มนี้ ได้แก่

เครื่องหมาย Single-nucleotide polymorphism (SNPs) เป็นการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวในบริเวณหนึ่ง ๆ ของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว เป็นเครื่องหมายที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรมากที่สุด วิธีการตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ได้แก่ tetra-primer ARMS-PCR โดยออกแบบไพรเมอร์จำนวน 4 เส้น มีเส้นด้านนอก 2 เส้น (outer primer) ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณก่อนและหลังตำแหน่งที่เกิด SNPs และไพรเมอร์ด้านในอีก 2 เส้น (inner primer) ที่จำเพาะกับตำแหน่ง SNPs หากสายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบมีตำแหน่ง SNPs จะทำให้ได้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์แตกต่างจากสายดีเอ็นเอที่ไม่มี SNPs ดังภาพที่ 4



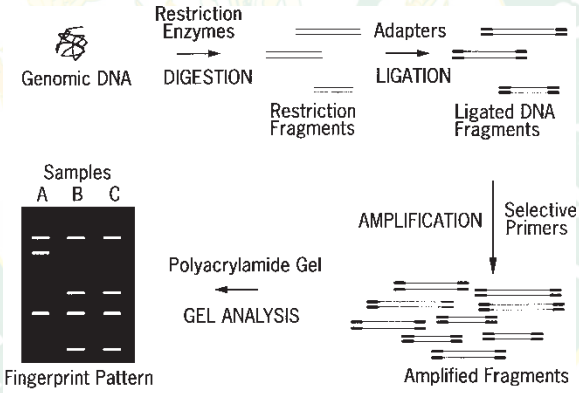
ภาพที่ 4 เทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ในการตรวจสอบ SNPs
ที่มา : Yang et al., (2006)

เครื่องหมาย Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเครื่องหมายที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้น ๆ ความยาวประมาณ 10 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นแบบสุ่ม ไม่จำเพาะเจาะจงกับยีน และแสดงผลในรูปของการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งหนึ่ง ๆ คุณสมบัติที่สำคัญของการใช้เทคนิคนี้คือ สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ dominant marker คือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย RAPD
ที่มา : Plant molecular biology, (2017)

เครื่องหมาย Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเครื่องหมายที่สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการรวมวิธี RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน ซึ่งรูปแบบ polymorphism ที่เกิดขึ้นกับความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เหมือนกับเทคนิค RFLP และสามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เหมือนกับ เทคนิค RAPD ทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอชิ้นสั้น ๆ เรียกว่า adapter เข้าที่ปลายทั้ง 2 ด้านของชิ้นดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นไพรเมอร์มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ adapter ที่บริเวณด้านปลาย 3’ ของไพรเมอร์ มีลำดับเบสที่เป็นส่วนหนึ่งของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเบสอีก 2 - 3 นิวคลีโอไทด์ เพื่อให้เกิดการเลือกจับของเบสที่เป็นคู่สมกัน ซึ่งเป็นการลดจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอ ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ ไม่ต้องทราบข้อมูลของลำดับเบส สามารถทำได้รวดเร็ว เกิด polymorphism จำนวนมาก ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ ค่าใช้จ่ายสูง ต้องการดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง ดังภาพที่ 6



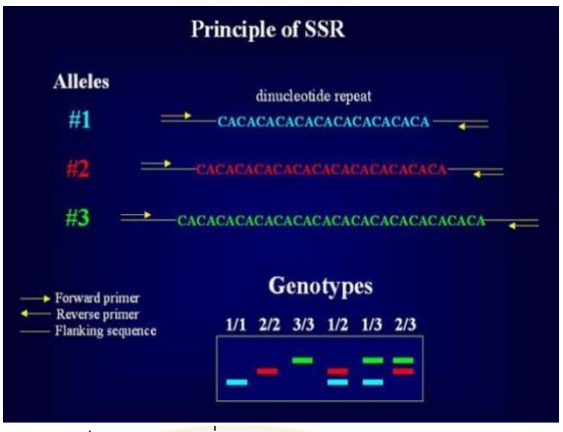
ภาพที่ 6 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย AFLP
ที่มา : Blears et al., (1998)

เครื่องหมาย Inter-simple sequence repeat (ISSR) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ (micro-satellite) 2 ตำแหน่ง ไมโครแซทเทลไลต์ คือชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วย 1 - 6 นิวคลีโอไทด์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดโดยพบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ไมโครแซทเทล-ไลต์จะกระจายแบบไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งจีโนม และส่วนใหญ่พบในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน (noncoding region) ความผันแปรจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในจีโนมสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมาย ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ หลักการของเทคนิค ISSR คือใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นไมโครแซทเทลไลต์และเติมนิวคลีโอไทด์คัดเลือก โดยไพรเมอร์จะเข้า

จับกับไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่งใกล้ ๆ กัน แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอระหว่างไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 2 ตำแหน่ง (วริสรา และคณะ, 2557) ดังแสดงในภาพที่ 7

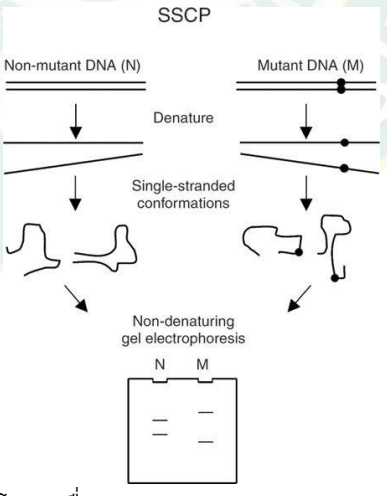
ภาพที่ 7 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย ISSR
ที่มา: Olson et al., (1989)

สำหรับเครื่องหมายที่ตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ตำแหน่งเป็นการตรวจสอบในบริเวณที่จำเพาะตรวจสอบจากส่วนที่มีชุดเดียวในจีโนมซึ่งอาจเป็นส่วนของยีนหรือบริเวณอื่นใดก็ได้ ได้แก่ เครื่องหมาย Simple sequence repeat (SSR) เป็นเครื่องหมายที่ใช้หลักการของการกระจายตัวของเบสซ้ำในสิ่งมีชีวิต ลักษณะที่สำคัญของเบสซ้ำนี้ คือ การมีลำดับเบสจำเพาะอยู่บริเวณหัวท้ายของเบสซ้ำ ซึ่งเบสจำเพาะเหล่านี้สามารถนำมาใช้สร้างเป็นไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้เพิ่มจำนวนเบสซ้ำในตำแหน่งที่ต้องการ โดยใช้หลักการของพีซีอาร์ จากนั้นนำไปแยกความแตกต่างโดยเทคนิค อิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งความแตกต่างของ แถบดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในแต่ละสิ่งมีชีวิต คุณสมบัติที่สำคัญของเทคนิคนี้คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลบนจีโนม และจำนวนของรูปแบบของอัลลีลที่สามารถตรวจสอบได้และเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย SSR
ที่มา: Kumar, (2017)

เครื่องหมาย Single-strand conformation polymorphism (SSCP) อาศัยหลักการที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ จะมีการขดหรือพันกันในโมเลกุล เกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสของดีเอ็นเอสายนั้น ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลโพลิอะครีลาไมด์ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิดโครงรูปแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเร็วช้าต่างกัน ดังภาพที่ 9 ซึ่งสามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดดังตารางที่ 4



ภาพที่ 9 แสดงการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเครื่องหมาย SSCP
ที่มา: Gasser et al., (2006)

ตารางที่ 4 แสดงคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิด

เครื่องหมายดีเอ็นเอ / คุณสมบัติ	RFLP	SSCP	SSR	SNP	RAPD	AFLP	ISSR
ใช้ไพรเมอร์เพียงเส้นเดียว	×	×	×	×	√	×	√
ตรวจสอบหลายตำแหน่ง	×	×	×	×	√	√	√
ต้องรู้ลำดับเบส	√	√	√	√	×	×	×
ทำง่าย	×	×	√	×	√	×	√
ราคาไม่แพง	×	×	×	×	√	√	√
ทำซ้ำได้	√	×	√	√	×	√	√
ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ	√	×	×	×	×	√	×
แยก Homozygote กับ Heterozygote ได้	√	√	√	√	×	×	×
ใช้ Agarose gel	√	×	×	√	√	×	√

หมายเหตุ : √ คือ มีคุณสมบัติ × คือ ไม่มีคุณสมบัติ
ที่มา : สุรินทร์, (2552)

เมื่อเปรียบเทียบเครื่องหมายดีเอ็นเอต่าง ๆ (ตารางที่ 4) พบว่าเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายที่ทำได้ง่าย ตรวจสอบได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน ไม่ต้องรู้ลำดับเบสของพืชตัวอย่าง ราคาไม่แพง และทำซ้ำได้ จึงเหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมในงานวิจัยนี้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เทคนิค GISH และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิด และข้ามสกุลในพืชหลายชนิด เช่น Liu and Gu (2011) ใช้เทคนิค GISH ศึกษาบรรพบุรุษของ *Camellia reticulata* (Theaceae) ซึ่งเป็นพืชโพลิพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 4x = 60 และ 2n = 6x = 90 จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค GISH สามารถระบุได้ว่า *C. reticultata* (2n = 4x) ที่เป็นพืชอัลโลเททราพลอยด์เกิดจาก *C. reticulata* (2n = 2x) กับ *C. pitardii* (2n = 2x) และพบว่า *C. reticultata* (2n = 6x) ที่เป็นพืชอัลโลเฮกซะพลอยด์เกิดจาก *C. reticulata* (2n = 4x) กับ *C. saluenensis* (2n = 2x) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค GISH สามารถใช้ศึกษาองค์ประกอบของจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้

การตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลระหว่างกล้วยไม้ *Ascocenda* และ *Phalaenopsis* โดยใช้เทคนิค GISH และเครื่องหมาย RFLP ซึ่งกล้วยไม้สกุล *Ascocenda* ที่เป็นแม่พันธุ์มีจีโนมเป็นพวกทริพลอยด์ (2n = 3x = 57) และสกุล *Phalaenopsis* ที่เป็นพ่อพันธุ์มีจีโนมเป็นพวกเททราพลอยด์ (2n = 4x = 76) จากการศึกษาด้วยเทคนิค GISH สามารถจำแนกองค์ประกอบจีโมนของลูกผสมได้ พบว่าลูกผสมส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 67 โดยได้รับโครโมโซมจากสกุล *Ascocenda* จำนวน 31 แท่ง และได้รับโครโมโซมจากสกุล *Phalaenopsis* จำนวน 36 แท่ง และไม่พบโครโมโซมที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกัน นอกจากนี้ยังพบลูกผสมจำนวน 1 ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 62 ซึ่งได้รับโครโมโซมจากสกุล *Ascocenda* จำนวน 28 แท่ง และจากสกุล *Phalaenopsis* จำนวน 34 แท่ง สำหรับการตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้โพรบที่เป็นบริเวณของ external transcribed spacer (ETS) พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสกุล *Ascocenda* ที่เป็นแม่พันธุ์ จำนวน 2 แถบคือ แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 4,000 bp. และ 540 bp. และพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสกุล *Phalaenopsis* ที่เป็นพ่อพันธุ์ จำนวน 2 แถบคือ แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,100 bp. และ 900 bp. สำหรับลูกผสมทุกต้นพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 4,000 bp. และ 540 bp. เหมือนต้นแม่ และพบเพียงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 bp. ที่เหมือนต้นพ่อ แต่มีเพียงลูกผสมบางต้นที่พบแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบจากต้นพ่อ ดังนั้นเทคนิค GISH และ เครื่องหมาย RFLP สามารถใช้ตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลระหว่างกล้วยไม้ *Ascocenda* และ *Phalaenopsis* ได้ (Liu et al.,2016) นอกจากนี้ Suwannoi et al. (2012) ได้ใช้เครื่องหมาย gene specific SSCP ยืนยันความเป็นลูกผสมที่แท้จริง และใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชกลุ่ม *Jatropha* ระหว่างพ่อแม่และลูกผสมได้ โดยพบว่าลูกผสมส่วนใหญ่ที่ได้เป็นลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับเข็มปัตตาเวีย ซึ่งเป็นคู่ที่มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด ลูกผสมสามารถออกดอกและติดผลได้บางต้น ส่วนลูกผสมระหว่างสบู่ดำกับฝิ่นต้น ฝิ่นต้นกับสบู่

ดำ สบู่ดำกับหนุมานนั่งแท่น สามารถออกดอกได้แต่ดอกไม่สมบูรณ์ และการผสมระหว่างสบู่ดำกับสบู่แดงยังไม่ประสบความสำเร็จ

เครื่องหมายดีเอ็นเอถูกประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และตรวจสอบการเป็นลูกผสมในพืชหลายชนิด เช่น การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสบู่ดำ (*Jatropha* sp.) และลูกผสมข้ามชนิดโดยใช้เครื่องหมาย RAPD, ISSR และ SSR ซึ่งมีค่า Polymorphism สูงถึง 98.55 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมาย RAPD และ ISSR แสดงให้เห็นว่าสปีชีส์ *J. tanjorensis* เป็นลูกผสมตามธรรมชาติของ สปีชีส์ *J. gossypifolia* และ สปีชีส์ *J. curcas* และไพรเมอร์ ccmp6 และ ccmp10 จากเครื่องหมาย SSR แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสปีชีส์ *J. gossypifolia* เป็นพันธุ์แม่ (Basha and Sujatha, 2009) การศึกษาลูกผสมข้ามชนิดของอ้อย (*Saccharum sp.*) โดยใช้เครื่องหมาย RAPD ซึ่งสามารถระบุลูกผสมข้ามชนิดที่แท้จริงได้อย่างแม่นยำระหว่างอ้อยสปีชีส์ *Saccharum officinarum* กับอ้อยสปีชีส์ *Sorghum bicolor* และอ้อยสปีชีส์ *Saccharum officinarum* กับข้าวโพดสปีชีส์ *Zea mays* (Nair et al., 2006) การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของลูกผสมข้ามชนิดของวนิลาโดยมีสปีชีส์ *Vanilla planifolia* (Vp) เป็นพันธุ์แม่ และสปีชีส์ *V. aphylla* (Va) เป็นพันธุ์พ่อ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และเครื่องหมาย AFLP พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างพันธุ์ Vp กับลูกผสม อยู่ที่ 58.5 - 68.3 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างพันธุ์ Va กับลูกผสม อยู่ที่ 50.0 - 72.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเป็นลูกผสมที่แท้จริง (Divakaran et al., 2006) การตรวจสอบลูกผสมของพืชสกุล *Populus*. โดยใช้เครื่องหมาย RFLP ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*ll และ *Hae*lll ซึ่งมีสปีชีส์ *P. trichocarpa* เป็นพันธุ์แม่ สปีชีส์ *P. deltoids* เป็นพันธุ์พ่อ สามารถตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดรุ่น F_1 ได้อย่างสมบูรณ์ (Bradshaw et al., 1994) การใช้เครื่องหมาย ISSR ระบุความเป็นลูกผสมของ Texas bluegrass โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด ISSR 9 เส้น และใช้ไพรเมอร์ชนิด ISSR 2 เส้นร่วมกัน จำนวน 9 คู่ รวมทั้งสิ้น 18 ไพรเมอร์ ซึ่งพบว่ามี 17 ไพรเมอร์ที่สามรถตรวจสอบลูกผสมได้ (Goldman, 2008) นอกจากนี้ Dongre and Parkhi (2005) ได้จำแนกฝ้ายลูกผสมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD จำนวน 20 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ชนิด ISSR 19 ไพรเมอร์ และ ไพรเมอร์ชนิด SSR 19 ไพรเมอร์ ซึ่งเครื่องหมาย ISSR ตรวจสอบได้เฉพาะ band ที่มาจากแม่เท่านั้น เครื่องหมาย RAPD และ เครื่องหมาย SSR มีเครื่องหมายละ 2 ไพรเมอร์ที่ตรวจสอบได้เพียง band ที่มาจากพ่อ

สำหรับพืชสกุล *Curcuma* มีการรายงานข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซม ดังนี้ ลลิตา และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในอุทยานแห่งชาติภูแลนคาจำนวน 12 ชนิด โดยวิธี Feulgen squash พบว่าจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 2n = 20 - 48 โดยพบว่า *Curcuma alismatifolia* Gagnep. มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 นอกจากนี้ Leong-Škorničková et al. (2007) ได้ทำการศึกษาจำนวน

โครโมโซมและขนาดของจีโนมของพืชสกุล *Curcuma* ในประเทศอินเดีย พบว่าพืชสกุลนี้มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22, 42, 63, >70, 77 และ 105 โดย *Curcuma aurantiaca* Zijp และ *Curcuma roscoeana* Wall. มีจำนวนโครโมโซม 2n = 42 พืชส่วนใหญ่ในสกุลนี้มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน x = 7 และมีระดับพลอยดีเป็น 6x, 9x, 11x, 12x และ 15x สำหรับการศึกษาขนาดจีโนมพบว่า มีขนาดอยู่ระหว่าง 1.66 – 4.76 พิโคกรัม จากข้อมูลจำนวนโครโมโซมและขนาดจีโนมทำให้ทราบว่าพืชในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน และ Das et al. (2011) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Curcuma* ทั้งหมด 9 ชนิดจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย โดยใช้เครื่องหมาย RAPD ISSR และ AFLP พบว่าเครื่องหมายเหล่านี้ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 266 แถบ โดยเครื่องหมาย ISSR ให้เปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึมสูงถึง 98.55 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมาย RAPD และ AFLP ให้เปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึม 92.22 และ 97.27 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR มีความสามารถในการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีกว่าเครื่องหมายอื่นๆ ที่ศึกษานี้ในสกุล *Curcuma* นอกจากนี้เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปสร้างเดนโดรแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า เครื่องหมาย RAPD ISSR และ AFLP สามารแบ่งพืชกลุ่มนี้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่มีระดับความเหมือนกันที่ 0.2, 0.34 และ 0.06 ตามลำดับ และมีกลุ่มย่อยที่คล้ายคลึงกัน

นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชกลุ่มปทุมมา เช่น Anuntalabhochai et al. (2007) ได้ทำการตรวจสอบการเป็นลูกผสมของปทุมมาโดยใช้เครื่องหมาย HAT-RAPD พบว่าเครื่องหมายนี้ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 100 - 2,500 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมาเท่านั้น จึงนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมาย Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้ (600 คู่เบส) จำเพาะต่อปทุมมาสามารถใช้จำแนกลูกผสมที่มีพ่อ หรือแม่พันธุ์เป็นปทุมมาได้ แต่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าลูกผสมเกิดจากปทุมมากับสปีชีส์ใด

ในลูกผสมข้ามชนิดของพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว ธีรนิติ (2555) ได้ทำการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* (ปทุมมา) และสกุลย่อย *Eucurcuma* (กระเจียว) ทั้งหมด 7 คู่ผสม โดยใช้เครื่องหมาย RAPD ทั้งหมด 70 ไพรเมอร์ แต่มีเพียง 1 ไพรเมอร์เท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างคู่ผสมของ *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca* และสามารถใช้บ่งบอกถึงความเป็นลูกผสมได้ แต่ในคู่ผสมอื่นๆ ยังไม่มีไพรเมอร์ที่บ่งบอกถึงลูกผสมได้และในปทุมมา (*C. alismatifolia*)ซึ่งอยู่ในสกุลย่อย *Paracurcuma* Taheri et al. (2012) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสปีชีส์ *C. alismatifolia* 5 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย ISSR พบว่าให้เปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึมสูง (77 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำข้อมูลมาสร้างเดนโดรแกรมพบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง 0.4 - 0.58 และสามารถแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรมออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์ Chiang Mai Red และ Kimono Pink กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์ Sweet Pink และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ พันธุ์ Chiang Mai Pink และ Doi Tung 554

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงมีความเป็นได้ที่จะใช้เทคนิค GISH และเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียวได้

บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผศ.ดร.เฉลิมศรี นนทสวัสศรี สาขาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

กลุ่มพืชที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่

1. ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Snow White (SW) พันธุ์ Big Red (BR) และพันธุ์ White Tung (WT)
2. กระเจียวสปีชีส์ *C. roscoeana* wall. พันธุ์กระเจียวส้ม (KS)
3. กระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. ได้แก่ พันธุ์ EPL และพันธุ์อุษา (Usa)

กลุ่มพืชลูกผสม ได้แก่

1. SWEPL เป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow White (SW) และกระเจียวพันธุ์ EPL
2. WTEPL เป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ White Tung (WT) และกระเจียวพันธุ์ EPL
3. WTUsa เป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ White Tung (WT) และกระเจียวพันธุ์อุษา (Usa)
4. BKS เป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ Big Red (BR) และกระเจียวพันธุ์กระเจียวส้ม (KS)

วัสดุและอุปกรณ์

1) หลอดไมโครทิวป์ หลอดพีซีอาร์
2) สไลด์ และแผ่นปิดสไลด์
3) ปากคีบ เข็มเขี่ย และมีดผ่าตัด
4) ขวดรูปชมพู่
5) ที่ตั้งหลอดทดลอง
6) กระบอกตวง
7) กระดาษทิชชู่
8) ช้อนตักสาร
9) บีกเกอร์
10) ปิเปตแก้ว
11) แผ่นกรอง ขนาด 41 µm (nylon membrane filter)
12) นาฬิกาจับเวลา
13) ถุงมือ
14) โถแก้วย้อมสไลด์ แบบ Coplin (Staining Jar)
15) ไมโครปิเปต (Gilson, USA)

เครื่องมือ

1) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (T100™ Thermal Cycler) (Bio-Rad, USA)

2) เครื่องรันเจล Electrophoresis - Gel (Bio-Rad, USA)

3) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Heraeus รุ่น Biofuge pico (Sorvall, Germany)

4) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก (Mini centrifuge) รุ่น Mini 6Ks (Bioline)

5) เครื่อง votex รุ่น MS-1 (IKA-Malaysia)

6) เครื่อง autoclave รุ่น ASB260 (Astell Scientific, England)

7) เครื่องถ่ายรูปเจล (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software) (Bio-Rad, USA)

8) เครื่อง hot plate (Fisher Scientific, USA)

9) เครื่องวัด pH ยี่ห้อ Clean L'eau (Taoyuan, Taiwan)

10) เครื่องกวนสาร (Jemway 1000, UK)

11) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WNB 7 (Memmert, Germany)

12) incubator (major science, Taiwan)

13) ตู้อบ FED 53-UL (BINDER, Norway)

14) เครื่องไมโครเวฟ รุ่น R-220 (SHARP, Thailand)

15) เครื่องชั่ง รุ่น PG503-S (Mettler Toledo, Switzerland)

16) ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

17) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

18) ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

19) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus CH30, Japan)

20) กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

21. ตู้ดูดควัน Easy Lab Fume Hood (S.K.Powerable, Thailand)

สารเคมี

1) บัฟเฟอร์ Hybridization (2X SSCP, 10 เปอร์เซ็นต์ dextran sulphate, 50 เปอร์เซ็นต์ formamid)

2) บัฟเฟอร์ 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Trisodium citrate dihydrate)

3) บัฟเฟอร์ 4 เปอร์เซ็นต์ Paraformaldehyde ใน 1X PBS

4) บัฟเฟอร์ Chromosome denaturation solution (70 เปอร์เซ็นต์ Formamide, 2X SSC) และ (50 เปอร์เซ็นต์ Formamide, 2X SSC)

5) บัฟเฟอร์ TN (0.1 M Tris aminomethane, 0.15 M NaCl, pH 7.5 by HCl)

6) บัฟเฟอร์ Maleic acid (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5 by NAOH)

7) 10 เปอร์เซ็นต์ blocking reagent stock solution ใน บัฟเฟอร์ Maleic acid

8) บัฟเฟอร์ blocking (1 เปอร์เซ็นต์ blocking reagent, 5 เปอร์เซ็นต์ serum sheep ใน บัฟเฟอร์ TN)

9) บัฟเฟอร์ Washing (บัฟเฟอร์ TN, 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20)

10) บัฟเฟอร์ 10X PBS (1.3 M NaCl, 0.07 M $Na_2HPO_412H_2O$, 0.03 M $NaH_2PO_42H_2O$)

11) Anti-fade reagent (0.2 เปอร์เซ็นต์ DABCO (1, 4-Diazabicyclo-2.2.2 octane), 50 เปอร์เซ็นต์ glycerol, 1X PBS)

12) 0.05 เปอร์เซ็นต์ colchicine ในน้ำ

13) 0.002 M 8-hydroxyquinoline

14) สีย้อม aceto-orcein (2 เปอร์เซ็นต์ w/v orcein powder, 50 เปอร์เซ็นต์ v/v acetic acid)

15) กรดไฮโดรคลอริก (1 N)

16) บัฟเฟอร์ 10X citrate (100 mM citric acid, 100 mMTri-sodium citrate)

17) น้ำยาตรึง (Fixation solution; acetic acid : ethanol = 1 : 3)

18) สีย้อม Giemsa's (RVL supply, Thailand)

19) สาร Streptavidin-Cy3

20) ผงอะกาโรส (agarose) (Bio Basic, USA)

21) บัฟเฟอร์ 5X TBE (0.445 M Tris base, 0.445 M Boric acid, 0.01 M EDTA pH 8.0)

22) สีย้อม DAPI (4, 6 –diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

23) เอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์, 75 เปอร์เซ็นต์, 95 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์

24) SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, USA)

25) oligonucleotide (IDT, USA)

26) Nuclease-free Water

27) Salmon Sperm DNA ความเข้มข้น 10 mg/ml (Invitrogen, USA)

28) บัฟเฟอร์ Proteinase K (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 2 mM $CaCl_2$)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1) GeneRuler 100 bp. Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

2) GeneRuler 1 Kb. Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

1) เอนไซม์สำหรับเตรียมโครโมโซม (7 เปอร์เซ็นต์ 1.14 U/mg Cellulase (sigma, USA), 3 เปอร์เซ็นต์ 450 U/mg pectinase (Sigma, USA)) ในบัฟเฟอร์ 1X citrate

2) เอนไซม์ RNase A (Worthington Biochemical Corporation, USA) (0.1 mg/ml ใน 2X SSC pH7.0)

3) เอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 5 µg/ml (Invitrogen, USA)

4) DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, USA)

ชุดทดลองสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

1) ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ยี่ห้อ DNAsecure Plant Kit (Tiangen, China)

2) ชุดติดฉลากโพรบสำเร็จรูป ยี่ห้อ biotin nick translation (Invitrogen, USA)

3) ชุดติดฉลากโพรบสำเร็จรูป ยี่ห้อ nick translation mix และสารเรืองแสง Fluorescein-12-dUTP (Roche, Switzerland)

4) ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปจากเจล/พีซีอาร์ ยี่ห้อ Plus DNA Clean/Extraction kit (GeneMark, USA)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH

1.1 การเปรียบเทียบสารเคมีต่างๆ เพื่อชักนำให้ได้โครโมโซมระยะที่ต้องการ (Pretreatment)

1.1.1 เก็บตัวอย่างช่อดอก

1.1.2 ชักนำให้เกิดระยะการแบ่งเซลล์ที่ต้องการด้วยสารเคมีต่างๆ

1.1.3 เตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการกด (Squash) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

1.2 การหาขนาดของดอกและขนาดของอับเรณูที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมโครโมโซม

1.2.1 เตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการกด (Squash) จากสารเคมีที่ชักนำที่ทำให้เกิดระยะการแบ่งเซลล์ที่ต้องการ โดยใช้ขนาดดอกและขนาดอับเรณูที่ต่างกัน และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

1.3 การเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์

1.3.1 ย่อยอับเรณูด้วยเอนไซม์

1.3.2 เตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์

1.3.3 ย้อมโครโมโซมด้วยสีย้อม DAPI และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

1.4 การเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ทำโพรบและ Blocking DNA

1.4.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบโดยวิธีของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ Tiangen®

1.4.2 ตัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) สำหรับ Blocking DNA

1.5 การเตรียมโพรบ

1.5.1 การติดฉลากทางอ้อมติดฉลากด้วย heptene ชนิด biotin โดยใช้ชุดสำเร็จรูป BioNick™ Labeling System (Invitrogen™, USA) ด้วยเทคนิค Nick Translation

1.5.2 การติดฉลากทางตรงติดฉลากด้วย Fluorescein-12-dUTP โดยใช้ชุดสำเร็จรูป nick translation mix (Roche™)

1.6 การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH

1.6.1 การเตรียมสไลด์

1.6.2 การเตรียมโพรบ

1.6.3 การ Hybridization

1.6.4 การล้างโพรบที่จับกับโครโมโซมแบบไม่จำเพาะเจาะจง

1.6.5 การตรวจสอบสัญญาณสำหรับการติดฉลากโพรบทางอ้อม

1.6.6 การย้อมสี DAPI และตรวจสอบสัญญาณภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

2. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยการนับจำนวนโครโมโซม

2.1 การเตรียมสไลด์

2.2 การย้อมสไลด์ด้วยสาร DAPI

2.3 ตรวจสอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

2.4 นับจำนวนโครโมโซม

3. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค ISSR

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชตัวอย่างด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAsecure Plant Kit (Tiangen®)

3.2 การสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมาย ISSR

สืบค้นจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุล *Curcuma*

3.3 ตรวจสอบไพรเมอร์ และหาอุณหภูมิช่วง annealing

3.4 ตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมาย ISSR

3.5 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH

1.1 การเปรียบเทียบสารเคมีต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ได้โครโมโซมระยะที่ต้องการ (Pretreatment)

1) เก็บตัวอย่างช่อดอก ในเวลา 08.00 น. - 10.00 น.

2) แกะดอกที่มีขนาด 0.1 - 1 ซม. ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำ

3) นำดอกตูมแช่ในสารเคมีต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดระยะการแบ่งเซลล์ที่ต้องการดังนี้ น้ำเย็น เป็นเวลาข้ามคืน, 0.05 เปอร์เซ็นต์ colchicine เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, 0.05 เปอร์เซ็นต์ colchicine เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 0.002M 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4) ย้ายตัวอย่างดอกไปแช่ในน้ำยาตรึง (fixation solution; acetic acid : ethanol = 1 : 3) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดอกไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

5) นำดอกหรืออับเรณูขนาดต่าง ๆ (0.2 - 0.6 ซม.) ที่ถูกชักนำด้วยสารต่าง ๆ มาตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ด้วยเทคนิค squash โดยวางอับเรณูบนสไลด์ หลังจากนั้นย่อยผนังเซลล์ด้วย 1 N HCl เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใช้กระดาษทิชชูซับกรดออก หยดสี aceto-orcein (2 เปอร์เซ็นต์ w/v orcein powder, 50 เปอร์เซ็นต์ v/v acetic acid) เป็นเวลา 3 นาที แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

6) ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

1.2 การหาขนาดของดอกและขนาดของอับเรณูที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมโครโมโซม

1) แกะดอกที่มีขนาดต่าง ๆ แล้วแช่ในน้ำยาตรึง ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) แกะอับเรณูจากดอกที่มีขนาดต่าง ๆ (0.2-0.6 ซม.) วัดและบันทึกขนาดของอับเรณู

3) ย่อยผนังเซลล์ของอับเรณูด้วย 1 N HCl เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใช้กระดาษทิชชูซับเอากรดออก

4) หยดสี aceto-orcein (2 เปอร์เซ็นต์ w/v orcein powder, 50 เปอร์เซ็นต์ v/v acetic acid) เป็นเวลา 3 นาที แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (การเตรียมสี aceto-orcein หน้า 101)

5) ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

1.3 การเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์

1.3.1 ย่อยอับเรณูด้วยเอนไซม์

1) แกะอับเรณูที่มีขนาดเหมาะสมประมาณ 4 - 5 ดอก แช่ในน้ำ 10 นาที เพื่อล้างน้ำยาตรึงออก

2) แช่อับเรณูในบัฟเฟอร์ citrate ความเข้มข้น 1X ประมาณ 10 นาที เพื่อปรับสภาพดอก

3). แช่อับเรณูในสารละลายเอนไซม์ (7 เปอร์เซ็นต์ Cellulase, 3 เปอร์เซ็นต์ Pectinase ในบัฟเฟอร์ citrate) ที่ระยะเวลา 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 นาที เพื่อหาระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

1.3.2 การเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์

1) หลังจากย่อยอับเรณูด้วยเอนไซม์แล้ว บดอับเรณูด้วยปลายปิเปต แล้วเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 300 µl

2) กรองใส่หลอด ไมโครทิวป์ ด้วยแผ่นกรอง ขนาด 41 µm (nylon membrane filter) จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

3) ดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้ง จากนั้นเติม Fixation solution (เย็นและเตรียมใหม่) 300 µl และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง

4) เติมน้ำยาตรึงประมาณ 30 - 40 µl เคาะเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์กลับมาแขวนลอยในสารละลายอีกครั้ง

5) นำสไลด์อังที่ไอน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที แล้วจึงหยดเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ลงบนสไลด์ 15 µl ต่อสไลด์ ทันที

6) ตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

7) หยดกรดอะซิติก (เข้มข้น) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงบนสไลด์บริเวณที่มีเซลล์ติดอยู่ แล้วนำสไลด์อังที่ไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที

8) ตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาข้ามคืน

9) เก็บสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

1.3.3 การย้อมโครโมโซมด้วยสีย้อม DAPI และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

1) นำโครโมโซมที่เตรียมได้มาย่อยอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ใน 2X SSC 25 µl และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2) แช่สไลด์ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเอนไซม์ RNaseA

3) หยดบัฟเฟอร์ proteinase K 200 µl ลงบนสไลด์ปิดด้วยพาราฟิล์ม บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

4. หยดเอนไซม์ proteinase K (5 µg/ml) 200 µl ลงบนสไลด์ปิดด้วยพาราฟิล์ม บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อยโปรตีนภายในเซลล์

5. แช่สไลด์ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเอนไซม์ proteinase K

6. ตรึงโครโมโซมให้ติดกับสไลล์โดยการแช่ในสาร Paraformaldehide (4 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

7. แช่สไลด์ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างสาร Paraformaldehide

8. แช่สไลด์ในเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อดึงน้ำออก

9. ตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

10. แช่สไลด์ในบัฟเฟอร์ Washing ที่มีสารเรืองแสง DAPI (0.1 µg/ml) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และเขย่าเบาๆ

11. แช่สไลด์ในบัฟเฟอร์ Washing ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และเขย่าเบา ๆ เพื่อล้างสารเรืองแสง DAPI ส่วนเกินออก

12. แช่สไลด์ในบัฟเฟอร์ PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ซับบัฟเฟอร์ PBS ให้สไลด์แห้ง

13. หยดสาร anti-fade 150 µl ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขนาด 24×40 mm เพื่อป้องกันการสลายของสารเรืองแสง DAPI

14. ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

1.4 การเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ทำโพรบและ Blocking DNA

1.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

1) ใช้ถุงดำคลุมต้นพืชตัวอย่างไม่ให้โดนแสงเป็นเวลา 1 คืน เพื่อไม่ให้ต้นพืชสังเคราะห์แสงเป็นการลดคาร์โบไฮเดรตปนเปื้อนในการสกัดดีเอ็นเอ

2) เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชที่เป็นพ่อแม่พันธุ์

3) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอของ Tiangen® ตามคำอธิบายของชุดสกัด

4. ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel electrophoresis) โดยใช้ เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ TBE เป็นเวลา 25 นาที

5) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260, 280 และ 230 nm

1.4.2 การเตรียม Blocking DNA

1) ตัดดีเอ็นเอ (~5 µg) ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 100 - 500 bp.

2) จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยการเติม สาร sodium acetate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 M และเติมเอทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 2 เท่า แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ทิ้งส่วนใส (supernatant) ล้างตะกอนโดยการเติมเอทานอล ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปั่นเหวียงด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 2 ครั้ง

5. ทิ้งส่วนใส แล้วทำให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

6. ละลายตะกอนกลับด้วยน้ำ 30 µl

7. ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific) ค่าการดูดกลืนแสง 260, 280 และ 230 nm และเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel electrophoresis) โดยใช้ เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ใน บัฟเฟอร์ TBE เป็นเวลา 25 นาที

1.5 การเตรียมโพรบ

1.5.1 การติดฉลากโพรบทางอ้อมด้วย hepten ชนิด biotin ด้วยเทคนิค Nick Translation

1) ใช้ดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์ 100 ng. ติดฉลากด้วยชุดสำเร็จรูป BioNick™ Labeling System (Invitrogen™, USA) โดยเติม dNTP mix ความเข้มข้น 1X เติม enzyme mix ความเข้มข้น 1X เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 10 µl

2) บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสาร EDTA (Stop buffer) 1 µl

1.5.2 การติดฉลากโพรบทางตรงด้วย Fluorescein-12-dUTP โดยใช้ชุดสำเร็จรูป nick translation mix (Roche™)

1) เตรียม Fluorophore labeling mix ความเข้มข้น 5X โดยเติม dATP, dCTP, dGTP อย่างละ 0.25 mM, dTTP 0.17 mM, Fluorescein-12-dUTP 0.08 mM และเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 50 µl

2) การติดฉลากโพรบโดยการเติมดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์ 1 µg เติม Fluorophore labeling mix ความเข้มข้น 1X และเติม nick translation mix (Roche, Switzerland) ความเข้มข้น 1X

3) บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นเติม EDTA ความเข้มข้น 0.5 mM และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

1.6 การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH

1.6.1 การเตรียมสไลด์

1) นำโครโมโซมที่เตรียมได้จากข้อ 1.3.2 มาย่อยอาร์เอ็นเอที่อยู่บนสไลด์โดยการเติมเอนไซม์ RNaseA ใน 2X SSC ความเข้มข้น 0.1 mg/ml 25 µl และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2) แช่สไลด์ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเอนไซม์ RNaseA

3) เติมบัฟเฟอร์ proteinase K 200 µl ปิดด้วยพาราฟิล์ม บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4) ย่อยโปรตีนที่อยู่บนสไลด์โดยการเติมเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 5 µg/ml 200 µl ปิดด้วยพาราฟิล์ม บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5) แช่สไลด์ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างเอนไซม์ proteinaseK

6) ตรึงโครโมโซมให้ติดกับสไลด์โดยการแช่ในสาร Paraformaldehide ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

7) แช่สไลด์ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้าง สาร Paraformaldehide

8) แช่สไลด์ในเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เพื่อดึงน้ำออก

9) ตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

10) แช่สไลด์ใน chromosome denaturation solution (70 เปอร์เซ็นต์ Formamide ใน 2X SSC) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

11) แช่สไลด์ในเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่เย็นจัด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.6.2 การ hybridization

1) หลังจากติดฉลากโพรบแล้ว ตกตะกอนดีเอ็นเอโพรบโดยเติม Salmon Sperm DNA ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 1 µl สาร sodium acetate 0.3 M และเติมเอทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 3 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด

2) แช่ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

3) ทิ้งส่วนใส แล้วละลายตะกอนกลับด้วยบัฟเฟอร์ Hybridization (2X SSCP, 10 เปอร์เซ็นต์ dextran sulphate, 50 เปอร์เซ็นต์ formamide) ปริมาตร 20 µl

4) ทำให้ดีเอ็นเอโพรบเสียสภาพ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ย้ายเข้าในที่เย็นทันที

5) นำดีเอ็นเอโพรบที่ได้หยดลงบนสไลด์ 20 µl ปิดด้วยพาราฟิล์มแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

1.6.3 การล้างโพรบที่จับกับโครโมโซมแบบไม่จำเพาะเจาะจง

1) แช่สไลด์ใน Formamide ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อล้างโพรบที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจง

2) แช่สไลด์ใน 2X SSC และ 1X SSC ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อล้างโพรบที่จับแบบไม่จำเพาะเจาะจง และแช่สไลด์ในสารละลาย 4X SSC ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

1.6.4 การตรวจสอบสัญญาณสำหรับการติดฉลากโพรบทางอ้อม

1) เตรียม Detection solution โดยการเติม Streptavidin-cy3 ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 1 µl ในบัฟเฟอร์ Blocking ปริมาตร 500 µl

2) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เก็บส่วนใส ใส่หลอดใหม่

3) นำ supernatant หยดลงบนสไลด์ปริมาตร 100 µlต่อสไลด์ แล้วปิดด้วยพาราฟิล์ม บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

1.6.5 การย้อมสี DAPI และตรวจสอบสัญญาณภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

1) แช่สไลด์ในบัฟเฟอร์ Washing ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และเขย่าเบา ๆ เพื่อล้าง Streptavidin-cy3 ส่วนเกินออก

2) แช่สไลด์ในบัฟเฟอร์ washing ที่มีสารเรืองแสง DAPI ความเข้มข้น (0.1 µg/ml) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และเขย่าเบาๆ

3) แช่สไลด์ในบัฟเฟอร์ Washing ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และเขย่าเบาๆ เพื่อล้างสารเรืองแสง DAPI ส่วนเกินออก

4) แช่สไลด์ในบัฟเฟอร์ PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ซับบัฟเฟอร์ PBS ให้สไลด์แห้ง

5) หยด anti-fade 150 µl ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขนาด 24×40 mm เพื่อป้องกันการสลายของสารเรืองแสง DAPI

6) ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

2. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยการนับจำนวนโครโมโซม

2.1 การเตรียมสไลด์ ตามวิธีของข้อ 1.3

2.2 การย้อมสไลด์ด้วยสาร DAPI ตามวิธีของข้อ 1.3.3

2.3 ตรวจสอบเซลล์และบันทึกภาพ โดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

2.4 นับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีจำนวนอย่างน้อย 10 เซลล์ต่อตัวอย่าง

3. การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค ISSR

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

1) ใช้ถุงดำคลุมต้นพืชตัวอย่างไม่ให้โดยแสงเป็นเวลา 1 คืน เพื่อไม่ให้ต้นพืชสังเคราะห์แสงเป็นการลดคาร์โบไฮเดรตปนเปื้อนในการสกัดดีเอ็นเอ

2) เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ และลูกผสมข้ามชนิด

3) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ ตามคำอธิบายของชุดสกัด

4) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel electrophoresis) โดยใช้ เจลอะกาโรส 1เปอร์เซ็นต์ กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ TBE เป็นเวลา 25 นาที

5) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260, 280 และ 230 nm

3.2 การสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมาย ISSR

สืบค้นจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุล *Curcuma* และ ใช้ไพรเมอร์ที่รายงานในงานวิจัยของ Taheri et al. (2012) และ Das et al. (2011) ที่ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในพืชสกุล *Curcuma* ดังแสดงในตารางที่ 5-6

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในงานวิจัยของ Taheri et al. (2012)

Serial number	Primer	Sequence (5'-3')	Tm	Ta
1	UBC_811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	57.2	64-54
2	UBC_812	$(GA)_8A$	54.8	62-52
3	UBC_818	CACACACACACACACAG	57.2	64-54
4	UBC_826	ACACACACACACACACC	57.2	64-54
5	UBC_834	$(AG)_8YT$	56.5	64-54
6	UBC_835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	58.8	66-56
7	UBC_841	GAGAGAGAGAGAGAGAY	58.8	66-56
8	UBC_842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	58.8	66-56
9	UBC_847	CACACACACACACACARC	58.8	66-56
10	UBC_848	CACACACACACACACARG	58.8	66-56
11	UBC_850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	58.8	66-56
12	UBC_880	GGAGAGGAGAGGAGA	56.2	63-53
13	I1	$(GA)_9C$	48.5	56-46
14	I2	$(GA)_9T$	48.0	55-45
15	I3	$(GA)_9A$	49.3	56-46
16	I7	$(CT)_8G$	44.9	52-42

Y = (C, T); R = (A, G). Tm = melting temperature (°C). Ta = anneling temperature (°C).

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลไพรเมอร์ สำหรับเครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในงานวิจัยของ Das et al. (2011)

ISSR primer	Sequence (5′–3′)
HB 12	CACCACCACGC
HB 13	GAGGAGGAGGC
HB 14	CTCCTCCTCGC
HB 15	GTGGTGGTGGC
P 3	AGAGAGAGAGAGAGAGTG
P 6	CCACCACCACCACCA
P 8	CACCACCACCACCAC
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
816	CACACACACACACACAT
817	CACACACACACACACAA
818	CACACACACACACACAG
824	TCTCTCTCTCTCTCTCG
825	ACACACACACACACACT
826	ACACACACACACACACC
844	CTCTCTCTCTCTCTCTAC
872	GATAGATAGATAGATA
17898A	CACACACACACAAC
17898B	CACACACACACAGT

3.3 ตรวจสอบไพรเมอร์ และหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์

1) เจือจางดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์ให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/µl

2) รวมดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์ เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบในตัวอย่างที่ศึกษา และอุณหภูมิช่วง annealing ในการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 10 ng

1X DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, USA) และไพรเมอร์ชนิด ISSR 0.4 µM โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 5 - 6 และมีปฏิกิริยา PCR ดังนี้

Initial denaturation	95 °C	3 นาที	
Denaturation	95 °C	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	Ta °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final Extension	72 °C	10 นาที	

3) ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ TBE เป็นเวลา 30 นาที

3.4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR

1) นำดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์ และลูกผสม มาทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 10 ng 1X DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, USA) และไพรเมอร์ ชนิด ISSR 0.4 µM โดยใช้ไพรเมอร์ และอุณหภูมิ annealing ที่ได้ทดสอบไปข้างต้น โดยมีขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

Initial denaturation	95 °C	3 นาที	
Denaturation	95 °C	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	Ta °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final Extension	72 °C	10 นาที	

2) ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ กำลังไฟฟ้า 100 โวลล์ ในบัฟเฟอร์ TBE เป็นเวลา 30 นาที

3) เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ระหว่างพันธุ์ แม่ พ่อ และลูกผสมต่าง ๆ

3.5 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 แล้วเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากทุกไพรเมอร์และทุกชนิดของตัวอย่าง

จากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรม TreeView (Page, 1996) และ FreeTree (Hampl et al., 2001)

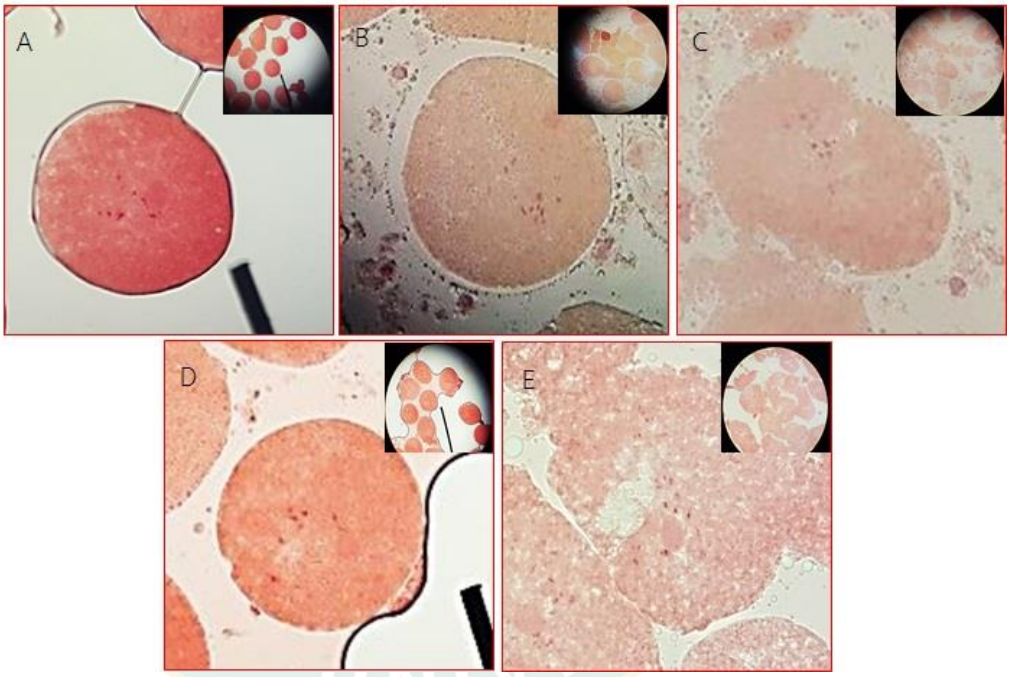
บทที่ 4
ผลการวิจัย และวิจารณ์

4.1 ผลการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH

4.1.1 ผลการเปรียบเทียบสารเคมีต่าง ๆ เพื่อชักนำให้ได้โครโมโซมระยะที่ต้องการ (Pretreatment)

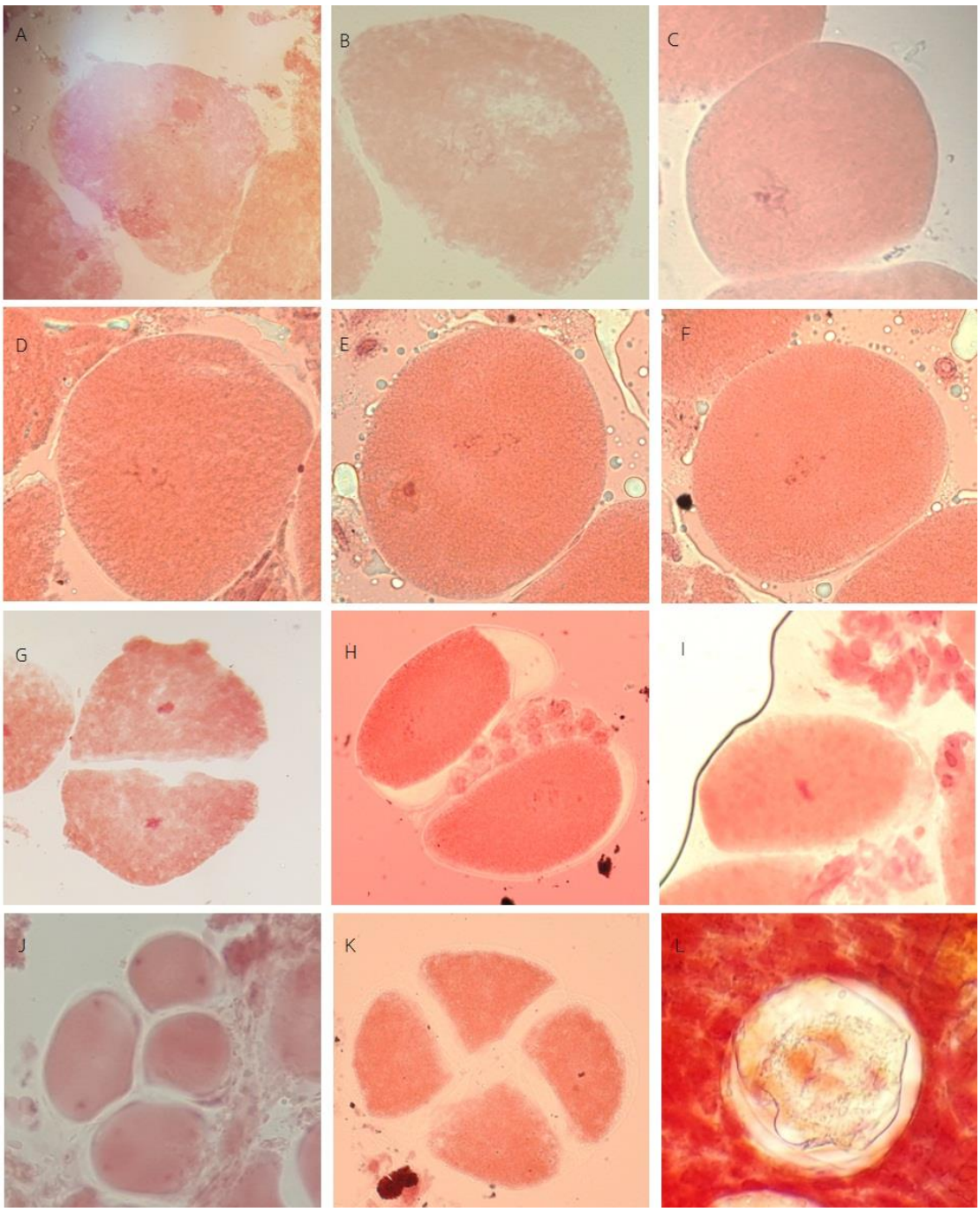
ในการตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค GISH จะต้องเตรียมโครโมโซมจากเซลล์ในระยะที่เหมาะสม คือระยะโปรเมทาเฟส หรือเมทาเฟส สำหรับเซลล์ที่แบ่งเซลล์แบบไมโทซิส หรือระยะโปรเฟส 1 (ดิโพลทีนและไดอะไคเนซีส) สำหรับเซลล์ที่แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส มีการใช้สารเคมีหลายชนิดเพื่อชักนำให้ได้เซลล์ระยะที่ต้องการหรือทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจนขึ้น เช่น สารโคลชิซิน (colchicine) ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเส้นใยสปินเดิล (Spindle fiber) ทำให้เห็นโครโมโซมกระจายตัวไม่เรียงตัวที่แนวกลางเซลล์ในระยะเมทาเฟส สาร 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน (8 - hydroxyquinoline) จะทำให้บริเวณเซนโทรเมียร์คอดเล็กกว่าเดิม และทำให้โครโมโซมขดตัวแน่นขึ้น โดยสารชักนำที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ สาร 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน สารโคลชิซิน และน้ำเย็น (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000) ผลการทำ Pretreatment โดยใช้ตัวอย่างเป็นปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. (ตารางที่ 7) พบว่าการเหนี่ยวนำด้วยสาร 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน ขนาดดอก 4 mm ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm พบเซลล์ระยะโปรเฟส 1 (ดิโพลทีนและไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 10D ระยะเมทาเฟส 1, เทโลเฟส 1 และการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 แต่ไม่ทราบว่าอยู่ในระยะใดเนื่องจากไม่เห็นโครโมโซมภายในเซลล์ เห็นเพียงแต่เซลล์เป็นรูปวงรีเท่านั้น จึงสันนิษฐานว่าเป็นการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเมื่อสังเกตจากดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า 4 mm จะพบระยะการแบ่งไซโทพลาสซึม (Cytokinesis) สำหรับการเหนี่ยวนำด้วยสารโคลชิซิน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขนาดดอก 3 - 4 mm ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm พบเซลล์ระยะโปรเฟส 1 (พาคีทีน ดิโพลทีนและไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 10B และเมื่อชักนำด้วยสารโคลชิซินเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ขนาดดอก 3 mm ขนาดอับเรณู 1 mm ระยะการแบ่งเซลล์ที่พบ คือระยะอินเตอร์เฟส และ โปรเฟส 1 ช่วงต้น ๆ ลักษณะเซลล์เห็นเป็นเซลล์กลม ๆ ไม่เห็นเป็นเส้นใยโครมาตินอยู่ภายในเซลล์ ที่ขนาดดอก 4 mm ขนาดอับเรณู 3 mm พบเซลล์ระยะโปรเฟส 1 (พาคีทีน ดิโพลทีนและไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 10C ดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า 4 mm จะเห็นเป็นระยะการแบ่งไซโทพลาสซึม (Cytokinesis) และ ละอองเกสร สำหรับการเหนี่ยวนำด้วยน้ำเย็น ที่ขนาดดอก 3 - 4.5 mm ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm พบระยะ โปรเฟส 1 (พาคีทีน ดิโพลทีนและไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 10A นอกจากนี้ยังพบระยะ เมทาเฟส 1 ที่ขนาดดอก 4.5 mm ขนาดอับเรณู 3 mm อีกด้วย ดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า 4.5 mm จะพบละอองเกสรจาก

ผลของการเหนี่ยวนำโดยใช้สารเคมีต่าง ๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากตัวควบคุม (fixative) พบเซลล์ระยะดิโพลทีนและไดอะไคเนซีส ที่ขนาดดอกเท่า ๆ กัน คือ ขนาดดอก 4 - 5 mm ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm สำหรับรูปเซลล์ในระยะอื่นๆ แสดงดังภาพที่ 11 จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าระยะการแบ่งเซลล์ของดอกอาจขึ้นอยู่กับขนาดดอกและขนาดอับเรณูมากกว่าการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงไม่ทำ Pretreatment เมื่อเก็บดอกแล้วจะเก็บรักษาเซลล์ในน้ำยาตรึงเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามอาจจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บช่อดอกมาทดลอง หรือการได้รับแสงแดดของแต่ละช่อดอกที่ไม่เท่ากัน และสภาพอากาศในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างดอกแตกต่างกัน จึงอาจทำให้เกิดระยะการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป (สราวุฒิ, 2008)



ภาพที่ 10 แสดงเซลล์ระยะไดอะไคเนซิส ของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. โดยการเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิค squash

A) เหนี่ยวนำด้วยน้ำเย็น B) เหนี่ยวนำด้วยสาร colchicine เป็นเวลา 3 ชั่งโมง C) เหนี่ยวนำด้วยสาร colchicine เป็นเวลา 6 ชั่วโมง D) เหนี่ยวนำด้วยสาร 8-hydroxyquinoline E) ที่เก็บไว้ใน fixative กำลังขยายภาพ 400 เท่า



ภาพที่ 11 แสดงเซลล์ระยะต่าง ๆ ของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. โดยการเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิค squash

A) ระยะอินเตอร์เฟส I B) ระยะเลฟโททีน C) ระยะไซโกทีน D) ระยะพาคีทีน E) ระยะดิโพลทีน F) ระยะไดอะไคเนซีส G) ระยะอินเตอร์เฟส II H) ระยะโปรเฟส II I) ระยะเมทาเฟส II J) ระยะเทโลเฟส II K) เทแทรด (tetrad) L) microspore กำลังขยายภาพ 400 เท่า

ตารางที่ 7 ระยะการแบ่งเซลล์ของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. ในดอกและอับเรณูขนาดต่าง ๆ เมื่อถูกชักนำด้วยสารเคมี

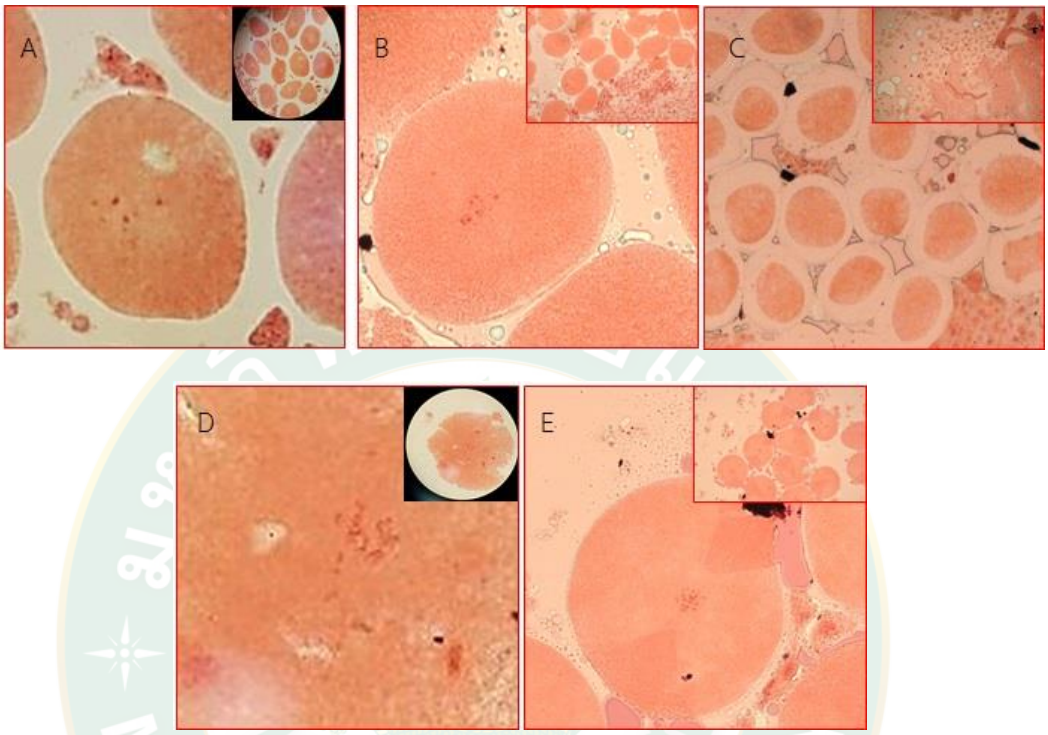
สารทดสอบ (Pretreatmeat)	ขนาดดอก (mm)	ขนาดอับเรณู (mm)	ระยะที่พบ
Fixative (ตัวควบคุม)	5	4	การแบ่งไซโทพลาสซึมและละอองเกสร
	4	3	พาคีทีน, ดิโพลทีน, ไดอะไคเนซีส, โปรเฟส 2 และ เมทาเฟส 2
	3	2	ดิโพลทีน
0.002 M 8 –hydroxy-quinoline	4	4	การแบ่งไซโทพลาสซึม
	4	3.5	การแบ่งไซโทพลาสซึม
	4	3	ไซโกทีน, พาคีทีน, ดิโพลทีน, ไดอะไคเนซีส, เมทาเฟส 2, เทโลเฟส 2 และไมโอซิส 2
	4	2.5	พาคีทีน, ดิโพลทีน และไดอะไคเนซีส
	4	2	พาคีทีน, ดิโพลทีน และไดอะไคเนซีส
	3	3	พาคีทีน
0.05 เปอร์เซ็นต์ (w/v) colchicine 3 ชั่วโมง	4	3	พาคีทีน และดิโพลทีน
	4	2	ดิโพลทีน และไดอะไคเนซีส
	3	2	พาคีทีน และไดโพลทีน
0.05 เปอร์เซ็นต์ (w/v) colchicine 6 ชั่วโมง	5	3.5	การแบ่งไซโทพลาสซึม และละอองเกสร
	5	4	ละอองเกสร
	4	3	พาคีทีน, ดิโพลทีน และไดอะไคเนซีส
	3	1	* โปรเฟส 1 ช่วงต้นๆ
น้ำเย็น	5	4	ละอองเกสร
	4.5	3	ดิโพลทีน, ไดอะไคเนซีส และ เมทาเฟส 1
	4	3	พาคีทีน ไดโพลทีนและไดอะไคเนซีส
	4	2.5	พาคีทีน และดิโพลทีน
	3	2	พาคีทีน

หมายเหตุ : * ระยะโปรเฟส 1 ช่วงต้น ๆ ในที่นี้ หมายถึง ระยะที่เห็นเซลล์กลม ๆ แต่ไม่เห็นโครโมโซมภายในเซลล์เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ระยะไมโอซิส 2 สังเกตเห็น 2 เซลล์ติดกัน ลักษณะเซลล์เป็นวงรีแต่ไม่เห็นโครโมโซมภายในเซลล์ จึงสันนิษฐานว่าเป็นระยะไมโอซิส 2 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.1.2 ผลการหาขนาดของดอก และขนาดของอับเรณูที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมโครโมโซม

จากการทดลองที่ 4.1.1 พบว่า ระยะการแบ่งเซลล์อาจขึ้นอยู่กับขนาดดอกและขนาดอับเรณู ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการทดสอบว่าดอกและอับเรณูขนาดเท่าใดของพืชแต่ละชนิดที่จะพบเซลล์ระยะดิโพลทีนและไดอะไคเนซีส เมื่อนำดอกของตัวอย่างที่มีขนาดแตกต่างกันมาตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคกด (squash) แล้วสังเกตเซลล์ระยะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระยะการแบ่งเซลล์ที่พบในดอกขนาดต่าง ๆ ในพืชแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่า ปทุมมาสปีชีส์ C. *alismatifolia* Gagnep. ที่ขนาดดอก 4 - 5 mm ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm พบเซลล์ระยะที่ต้องการคือระยะ โปรเฟส 1 (พาคีทีน, ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 12A ส่วนดอกที่มีขนาด 4 mm ขนาดอับเรณู 1 mm จะพบเซลล์ไมโอซิสเป็นเซลล์กลม ๆ แต่ไม่เห็นโครโมโซมภายในเซลล์ คาดว่าน่าจะเป็นระยะอินเตอร์เฟส หรือ โปรเฟส 1 ช่วงต้นๆ ส่วนดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 mm จะเห็นเป็นระยะการแบ่งไมโอซิส 2 สำหรับกระเจียวสปีชีส์ C. *aurantiaca* Van ที่ขนาดดอก 4 mm ขนาดอับเรณู 2.5 - 3 mm พบระยะโปรเฟส 1 (ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 12B ส่วนดอกที่มีขนาด 4 mm ขนาดอับเรณู 2 mm จะพบเซลล์ที่มีลักษณะกลม แต่ไม่เห็นโครโมโซมภายในเซลล์ คาดว่าน่าจะเป็นระยะโปรเฟส 1 ช่วงต้น ๆ ส่วนดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า 4 mm จะเห็นเป็นระยะการแบ่งไมโอซิส 2 และ ละอองเกสร สำหรับลูกผสม SWEPL ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ SW กับกระเจียวพันธุ์ EPL ที่ขนาดดอก 4 mm ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm พบเซลล์ระยะโปรเฟส 1 (พาคีทีน, ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 12D นอกจากนี้ยังพบระยะโปรเฟส 1 ที่ไม่ทราบระยะแน่นอน เนื่องจากไม่เห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน ดอกที่มีขนาด 4 mm แต่มีอับเรณู 1 mm จะพบระยะโปรเฟส 1 ช่วงต้น ๆ ส่วนดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า 4 mm จะเห็นเป็นระยะการแบ่งไมโอซิส 2 และ ละอองเกสร เมื่อตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ในลูกผสม BKS (ลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ BR กับกระเจียวพันธุ์กระเจียวส้ม) ที่มีขนาดดอกต่าง ๆ พบว่าดอกที่ขนาดดอก 4 mm ขนาดอับเรณู 3 mm พบเซลล์ระยะโปรเฟส 1 (ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส) ดังภาพที่ 12E ดอกที่มีขนาดเล็กกว่า 4 mm จะพบระยะโปรเฟส 1 ช่วงต้น ๆ ส่วนดอกที่มีขนาดใหญ่กว่า 4 mm จะเห็นเฉพาะละอองเกสร สำหรับลูกผสม WTEPL (ลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ WT กับกระเจียวพันธุ์ EPL) และลูกผสม WTUsa (ลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ WT กับกระเจียวพันธุ์ Usa) พบว่าดอกที่มีขนาดดอก 4 mm อับเรณูขนาด 2 - 3 mm พบเซลล์ระยะโปรเฟส 1 (พาคีทีน, ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส) เหมือนกับคู่ผสมอื่น ๆ ส่วนกระเจียวสปีชีส์ *C. roscoeana* wall. ดอกที่มีขนาดเล็กหรือดอกที่มีขนาดใหญ่ไม่พบระยะการแบ่งเซลล์ ดังภาพที่ 12C เนื่องจากเห็นเพียงแต่เซลล์กลม ๆ เท่านั้น ไม่พบโครโมโซมภายในเซลล์ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าดอกขนาดประมาณ 4 - 5 mm ที่มีขนาดอับเรณูประมาณ 2 - 3

mm เหมาะสมที่จะนำมาเตรียมโครโมโซมของพืชตัวอย่าง ได้แก่ ปทุมมาสปีชีส์ C. *alismatifolia* Gagnep กระเจียวสปีชีส์ C. *aurantiaca* Van ลูกผสม SWEPL, WTEPL, WTUsa และ BKS



ภาพที่ 12 แสดงเซลล์ระยะไดอะไคเนซิส ของพืชตัวอย่าง
A) ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. B) กระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. C) กระเจียวสปีชีส์ *C. roscoeana* wall. D) ลูกผสม SWEPL E) ลูกผสม BKS กำลังขยายภาพ 400 เท่า

ตารางที่ 8 ระยะการแบ่งเซลล์ที่พบจากพืชตัวอย่างที่มีดอกและอับเรณูขนาดต่างๆ

พ่อแม่พันธุ์ และลูกผสม	ขนาดดอก (mm)	ขนาดอับเรณู (mm)	ระยะที่พบ
ปทุมมา *C. alismatifolia* Gagnep.	5.5	3	ไมโอซิส 2
	5	3	ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส
	5	2	พาคีทีน, ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส
	4	2	ดิโพลทีน ไดอะไคเนซีส และ โปรเฟส 2
	4	1	*โปรเฟส 2 ช่วงต้น ๆ
กระเจียว C. *aurantiaca* Van	8	4	ละอองเกสร
	7	4	ละอองเกสร
	6	4	ละอองเกสร
	6	3	ไมโอซิส 2 และ ละอองเกสร
	4.5	2.5	ดิโพลทีน
	4	3	ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส
	4	2	*โปรเฟส 2 ช่วงต้น ๆ
ลูกผสม SWEPL	5	4	ไมโอซิสII และ ละอองเกสร
	4	3	ดิโพลทีน ไดอะไคเนซีส และ โปรเฟส 2 เทโลเฟส 2 และ ละอองเกสร
	4	2.5	ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส
	4	2	พาคีทีน, ดิโพลทีน และ ไดอะไคเนซีส และ โปรเฟส 2
	3	2	ไมโอซิส 2
	2	1.5	*โปรเฟส 2 ช่วงต้น ๆ
ลูกผสม BKS	6	4	ละอองเกสร
	5	3.5	ละอองเกสร
	4	3	ดิโพลทีน ไดอะไคเนซีส และ ไมโอซิส 2
	3	2	พาคีทีน
	2.5	1	*โปรเฟส 2 ช่วงต้น ๆ

หมายเหตุ : *ระยะโปรเฟส 1 ช่วงต้นๆ ในที่นี้ หมายถึง ระยะการแบ่งเซลล์ที่เห็นเซลล์กลม แต่ไม่เห็นโครโมโซมภายในเซลล์เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ระยะไมโอซิส 2 สังเกตเห็น 2 เซลล์ติดกัน ลักษณะเซลล์เป็นวงรีแต่ไม่เห็นโครโมโซมภายในเซลล์ จึงสันนิษฐานว่าเป็นระยะไมโอซิส 2 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

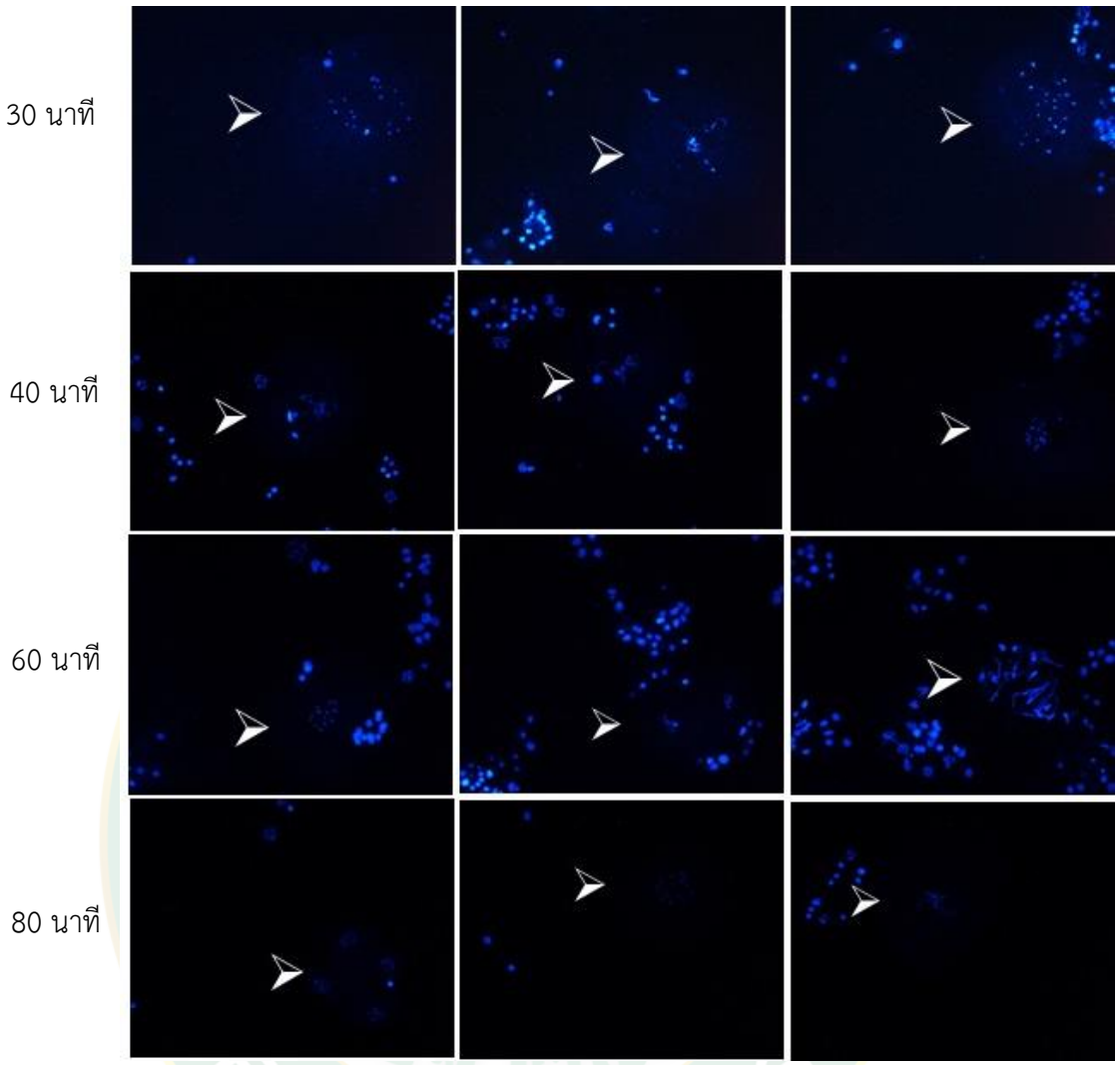
4.1.3 ผลการเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์

เมื่อได้ขนาดดอกและขนาดอับเรณูที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคหยดโปรโตพลาสต์โดยนำอับเรณูย่อยด้วยเอนไซม์ที่ระยะเวลาแตกต่างกันโดยใช้ตัวอย่างดอกจากปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์ ภาพที่ 13 แสดงเซลล์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลาต่าง ๆ โดยพบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เวลา 30 นาที มีจำนวนเซลล์เดี่ยวทั้งหมดประมาณ 3,083 เซลล์ โดยการนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ทั้งเซลล์ไมโทซิสและไมโอซิส มีเซลล์ไมโทซิสที่มีระยะโปรเพสที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนเพียง 1 เซลล์เท่านั้น และ 3,051 เซลล์ อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส เซลล์ส่วนใหญ่ยังไม่แยกเป็นเซลล์เดี่ยว สำหรับเซลล์ไมโอซิสมีเซลล์ที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนเห็นไซโทพลาสซึมบาง ๆ 30 เซลล์ ส่วนเซลล์ที่ย่อยแล้วยังเห็นไซโทพลาสซึมชัดเจนเห็นโครโมโซมไม่ชัดมีเพียง 1 เซลล์

การย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 40 นาที มีจำนวนเซลล์เดี่ยวทั้งหมด 8,886 เซลล์ ไม่มีเซลล์ไมโทซิสที่มีระยะโปรเพสที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนแต่มีเซลล์ไมโทซิสที่เป็นเซลล์เดียวในระยะอินเตอร์เฟส 8,836 เซลล์ และยังมีส่วนที่ยังไม่แยกเป็นเซลล์เดียวอยู่ สำหรับเซลล์ไมโอซิสมีเซลล์ที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนเห็นไซโทพลาสซึมบาง ๆ 29 เซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่โครโมโซมยังไม่ขดแน่น และพบเซลล์จำนวน 21 เซลล์เป็นเซลล์ที่ย่อยไม่ดีเห็นไซโทพลาสซึมบางแต่เห็นขอบเขตของเซลล์ชัดเจนนั้นแสดงว่ายังย่อยได้ไม่ดี

การย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีจำนวนเซลล์เดี่ยวทั้งหมด 3,707 เซลล์ มีเซลล์ไมโทซิสที่ย่อยได้ดีและอยู่ในระยะโปรเฟสเพียง 2 เซลล์ และ 3,628 เซลล์ อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส สำหรับเซลล์ไมโอซิสมีเซลล์ที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนเห็นไซโทพลาสซึมบาง ๆ 56 เซลล์ ซึ่งเห็นโครโมโซมเป็นไบวาเลนท์ชัดเจนในระยะไดอะไคนีซีส นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่ย่อยไม่ดีเห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน และเห็นไซโทพลาสซึมชัดเจน 21 เซลล์

การย่อยด้วยเอนไซม์ เวลา 80 นาทีมีจำนวนเซลล์เดี่ยวทั้งหมด 4,792 เซลล์ มีเซลล์ไมโทซิสที่ย่อยได้ดีและอยู่ในระยะโปรเฟสเพียง 1 เซลล์ และ 4,762 เซลล์ อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ แล้ว สำหรับเซลล์ไมโอซิสมีเซลล์ที่สามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนเห็นไซโทพลาสซึมบาง ๆ แต่เห็นขอบเขตชัดเจน มี 29 เซลล์ บางเซลล์ขดตัวแน่นเห็นโครโมโซมเป็นแท่งชัดเจน บางเซลล์เป็นเส้นใย แต่ก็ยังมีเซลล์ไมโอซิสบางส่วนที่ซ้อนทับกันอยู่แต่ไม่มาก

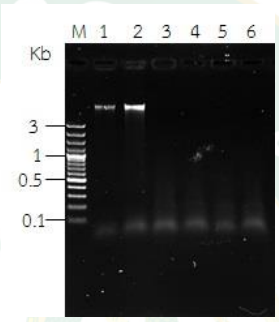


ภาพที่ 13 การเตรียมโครโมโซมด้วยเทคนิคการหยดโปรโตพลาสต์ของปทุมมาสปีชีส์ *Curcuma alismatifolia* Gagnep. โดยย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 30, 40, 60 และ 80 นาที ย้อมด้วยสี DAPI ลูกศรแสดงการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส

จากผลการหาระยะเวลาในการย่อยที่เวลา 30, 40, 60 และ 80 นาที สามารถสรุปได้ว่า ระยะเวลาในการย่อยที่ 60 นาที เป็นระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเห็นเซลล์ที่ต้องการ คือ ระยะดิโพลทีนและระยะไดอะไคนีซีสมากที่สุด และสามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจนเห็นไซโทพลาสซึมบาง และเซลล์ไมโทซิสส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว

4.1.4 ผลการเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ทำโพรบ และ Blocking DNA

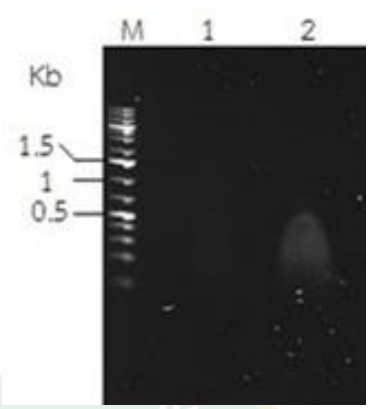
ขนาดดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการใช้เตรียมโพรบ และ blocking DNA คือ ขนาดประมาณ 500 - 1,500 คู่เบส และ 100 - 500 คู่เบส ตามลำดับ จากการตัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep และ กระเจียวสปีชีส์ C. *aurantiaca* Van ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ เป็นเวลา 2 นาที แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 - 700 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 14 ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็น blocking DNA แต่เป็นขนาดที่ค่อนข้างเล็กสำหรับใช้ในการเตรียมโพรบ



ภาพที่ 14 การเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ทำโพรบ และ Blocking DNA สำหรับเทคนิค GISH
1 คือ ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep.; 2 คือ ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ของกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van.; 3-6 คือ ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 2 นาที ของกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

4.1.5 ผลการเตรียมโพรบ

จากผลการติดฉลากโพรบแบบทางอ้อมด้วย hapten ชนิด biotin ด้วยเทคนิค Nick Translation พบว่าการนำดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดมาติดฉลากสามารถติดฉลากได้ดีกว่าการนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาติดฉลากดังแสดงในภาพที่ 15 จะพบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอที่ตัดและไม่ได้ตัดมาติดฉลากจะได้แถบดีเอ็นเอหลังติดฉลากมีขนาดประมาณ 100 - 500 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโพรบที่เหมาะสม คือ ประมาณ 500 - 1,500 คู่เบส จึงจะเหมาะสมสำหรับการเข้าคู่สมกับโครโมโซมอย่างจำเพาะเจาะจง แต่ดีเอ็นเอที่ไม่ได้ตัดจะเห็นแถบดีเอ็นเอที่เข้มกว่า จึงมีความเป็นไปได้ว่าการทำ GISH โดยใช้ดีเอ็นเอที่ไม่ได้ตัดมาทำโพรบจะสามารถตรวจสอบลูกผสมได้ ในการทดลองต่อไปจะกล่าวถึงการใช้ดีเอ็นเอที่ตัดและไม่ตัดใช้เป็นโพรบในการทำ GISH

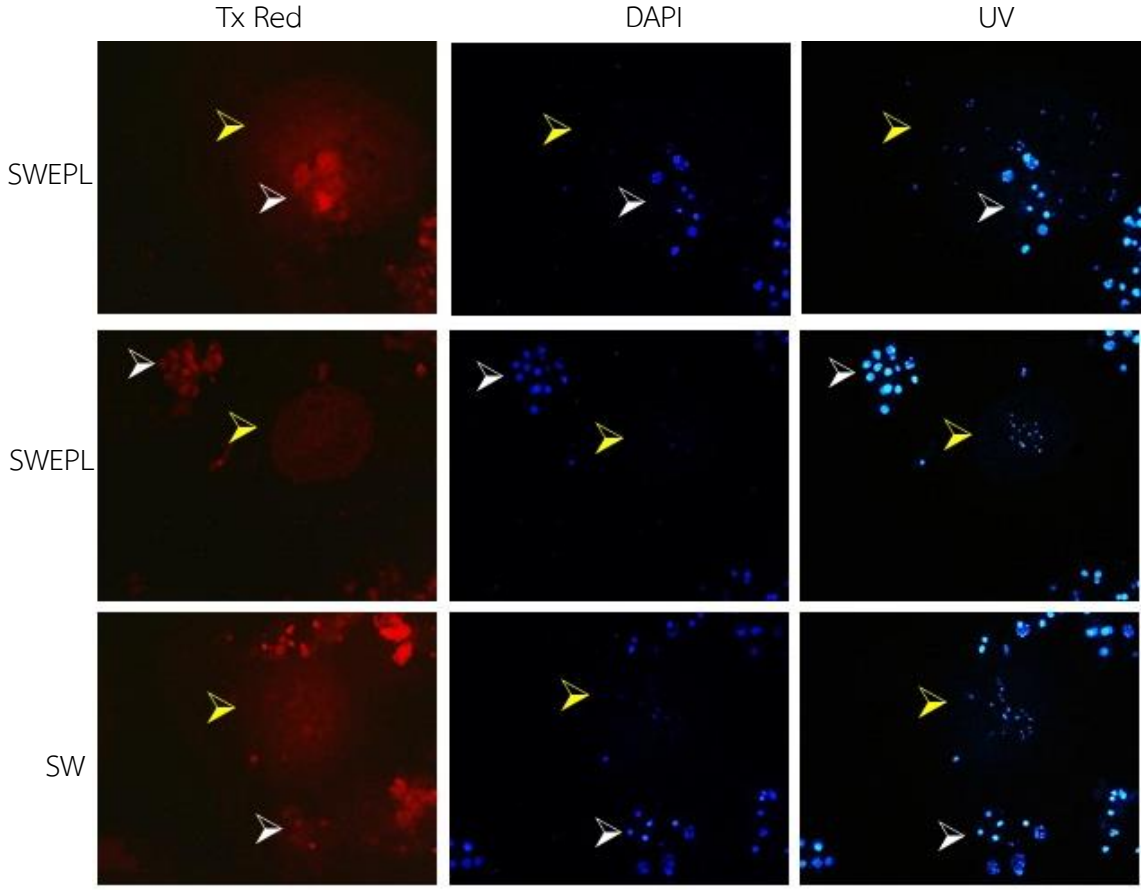


ภาพที่ 15 การติดฉลากโพรบแบบทางอ้อม
1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. ที่ถูกตัดด้วย autoclave ติดฉลากด้วย biotin; 2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep.; ที่ไม่ถูกตัด ติดฉลากด้วย biotin; M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder

4.1.6 ผลการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเทคนิค GISH

4.1.6.1 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค GISH โดยใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอถูกตัดก่อนติดฉลาก

การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค GISH ในตัวอย่างดอกลูกผสม SWEPL โดยใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดก่อนติดฉลากของสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep พบว่า สามารถมองเห็นโครโมโซมในระยะไดอะไคนีซีสได้อย่างชัดเจนและสังเกตเห็นไซโทพลาสซึมบางภายใต้ฟิลเตอร์ UV และ DAPI แต่เมื่อมองภายใต้ฟิลเตอร์ Tx Red ซึ่งเป็นฟิลเตอร์ที่ใช้ตรวจสอบการเรืองแสงของโมเลกุล Cy3 ดังนั้นหากพบการเรืองแสงสีแดงของ Cy3 ภายใต้ฟิลเตอร์ TxRed แสดงว่าเป็นตำแหน่งที่โพรบจับอยู่ แต่เมื่อสังเกตเซลล์ต่างๆโดยใช้ฟิลเตอร์ TxRed ไม่พบการเรืองแสงสีแดงของ Cy3 บนโครโมโซมในระยะไดอะไคนีซีส หรือโครโมโซมในระยะการแบ่งเซลล์อื่น ๆ แต่พบการเรืองแสงสีแดงในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมเซลล์ระยะอินเตอร์เฟสในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 16) ซึ่งแสดงถึงการจับของโพรบที่ไม่จำเพาะเจาะจง อาจเป็นเพราะว่าใช้โพรบที่มีขนาดเล็กเกินไปทำให้โพรบจับกับโครโมโซมแบบไม่จำเพาะเจาะจง จึงทำให้โพรบสามารถจับกับทุกส่วนของโครโมโซม และไซโทพสาสซึม ดังนั้นจึงอาจใช้โพรบที่ไม่ถูกตัดเพื่อจะทำให้โพรบมีขนาดใหญ่ขึ้น และจะเพิ่มความจำเพาะเจาะจงได้



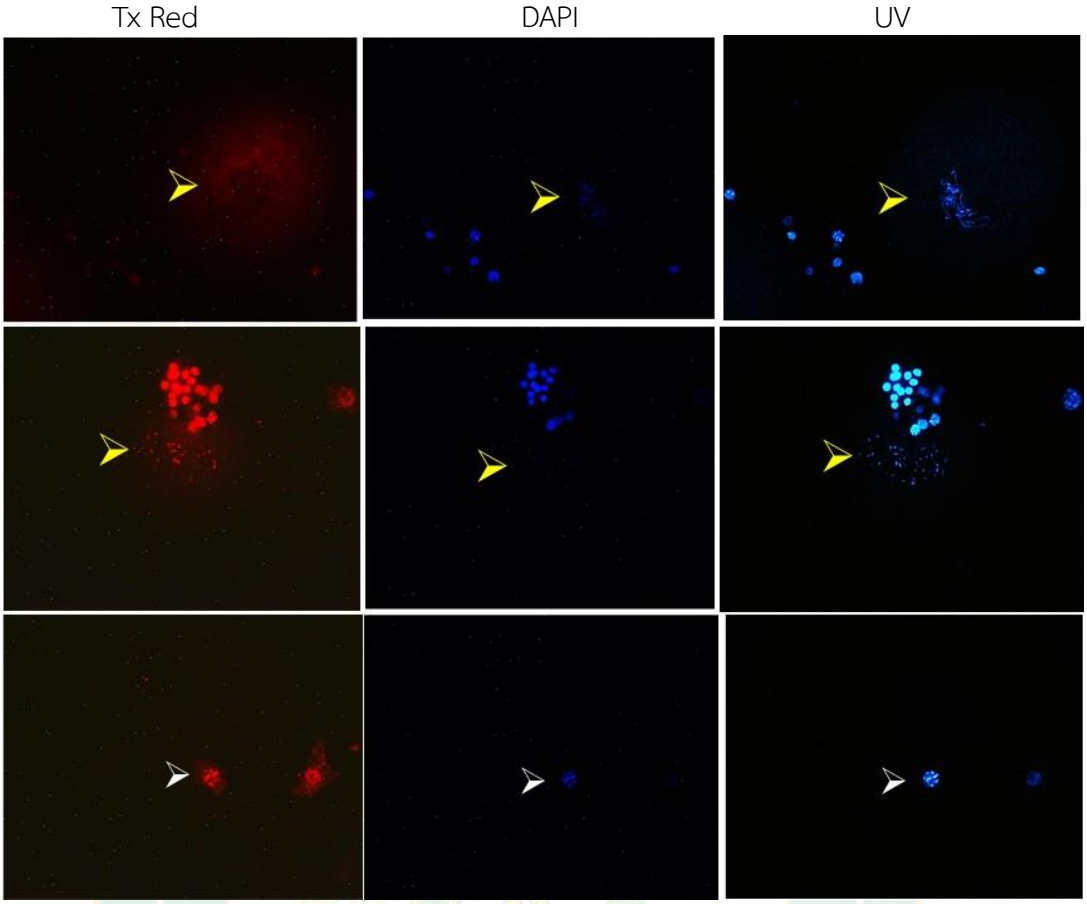
ภาพที่ 16 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค GISH โดยใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดของปทุมมาสปีชีส์ *Curcuma alismatifolia* Gagnep ในลูกผสม SWEPL และปทุมมาสปีชีส์ *Curcuma alismatifolia* Gagnep (SW) กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซิส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซิส

4.1.6.2 การตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค GISH โดยใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอไม่ถูกตัดก่อนติดฉลาก

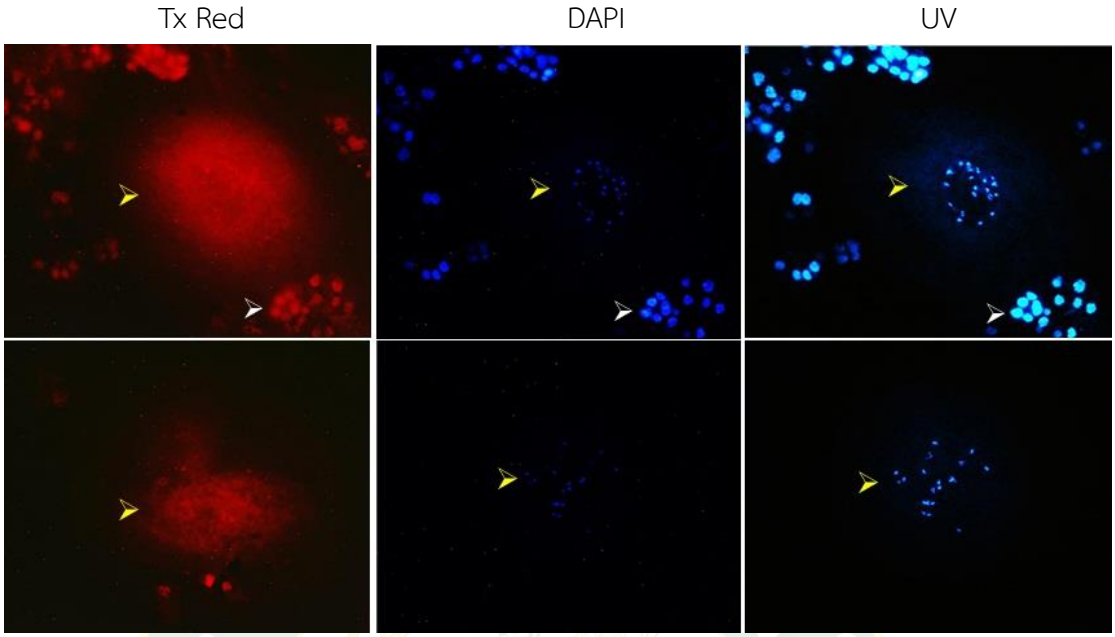
ผลการศึกษาการทำ GISH ของลูกผสม WTEPL ซึ่งใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. เมื่อตรวจสอบเซลล์ภายใต้ฟิลเตอร์ UV และ DAPI พบเซลล์ไมโอซิสที่เห็นโครโมโซมชัดเจนทั้งโครโมโซมที่เป็นเส้นใย และที่เป็นแท่ง เห็นไซโทพลาสซึมบาง ๆ สำหรับเซลล์ไมโทซิสเห็นนิวเคลียสของระยะอินเตอร์เฟสชัดเจน มีทั้งเซลล์เดี่ยวและเป็นกลุ่ม เมื่อดูภายใต้ฟิลเตอร์ Tx Red พบการเรืองแสงสีแดงของ Cy3 ทั้งนิวเคลียสของเซลล์ระยะอินเตอร์เฟส (ไมโทซิส) และบนโครโมโซมทุกแท่งของเซลล์ไมโอซิส แสดงว่าโพรบจับกับโครโมโซมแบบไม่จำเพาะเจาะจง สำหรับเซลล์ที่เห็นโครโมโซมเป็นเส้นใย เมื่อดูภายใต้ฟิวเตอร์ Tx

Red ไม่พบการเรืองแสงสีแดงของ Cy3 อาจเป็นเพราะโครโมโซมที่เป็นเส้นใยนั้นบางมากจึงมองไม่เห็นการเรืองแสงสีแดงของ Cy3 ดังแสดงในภาพที่ 17

นอกจากนี้ยังทดสอบเทคนิค GISH โดยใช้เซลล์ที่เตรียมจากกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. ซึ่งใช้โพรบจีโนมของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าจะไม่เกิดการจับกันระหว่างโพรบของปทุมมากับโครโมโซมของกระเจียว จากผลการทดลองพบการเรืองแสงสีแดงของสาร Cy3 ในเซลล์ระยะไดอะไคเนซีส และเซลล์ไมโอซิสอื่น ๆ แต่กลับเห็นเซลล์ระยะอินเตอร์เฟสและเซลล์ไมโทซิสด้วย ซึ่งแสดงถึงการจับกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง จึงจับได้ทั้งในบริเวณไซโทพลาสซึมและบริเวณนิวเคลียส ดังแสดงในภาพที่ 18 จากปัญหาที่ได้กล่าวมาข้างต้นการใช้โพรบที่ไม่ถูกตัดก็ยังไม่สามารถเข้าจับกับโครโมโซมแบบจำเพาะเจาะจงได้ อาจเป็นเพราะจีโนมของปทุมมาและกระเจียวใกล้เคียงกันมาก การใช้ blocking DNA (ดีเอ็นเอขนาดเล็ก ๆ ที่เตรียมจากกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van.) และ Salmon Sperm DNA ในบัฟเฟอร์สำหรับการไฮบริไดซ์อาจช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของโพรบ (เตรียมจากปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep.) ต่อโครโมโซมของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep ได้ โดย blocking DNA จากกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. จะเข้าจับกับชิ้นดีเอ็นเอของโพรบหรือบริเวณโครโมโซมของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep ที่มีลำดับเบสคล้ายกัน และ Salmon Sperm DNA ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นลำดับเบสซ้ำ ๆ ดังนั้นโพรบที่เหลืออยู่จะเป็นโพรบที่จำเพาะต่อลำดับเบสของปทุมมาเท่านั้น จากงานวิจัยของ Melo et al. (2015) มีการใช้ blocking DNA ในปริมาณที่แตกต่างกันทั้งปริมาณ 60 เท่า และ 100 เท่าของปริมาณโพรบเพื่อตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดของพืชสกุล *Passiflora* ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการทดลองใช้ blocking DNA และ Salmon Sperm DNA ในปริมาณต่าง ๆ ด้วยเช่นกันซึ่งจะกล่าวผลการทดลองในหัวข้อต่อไป



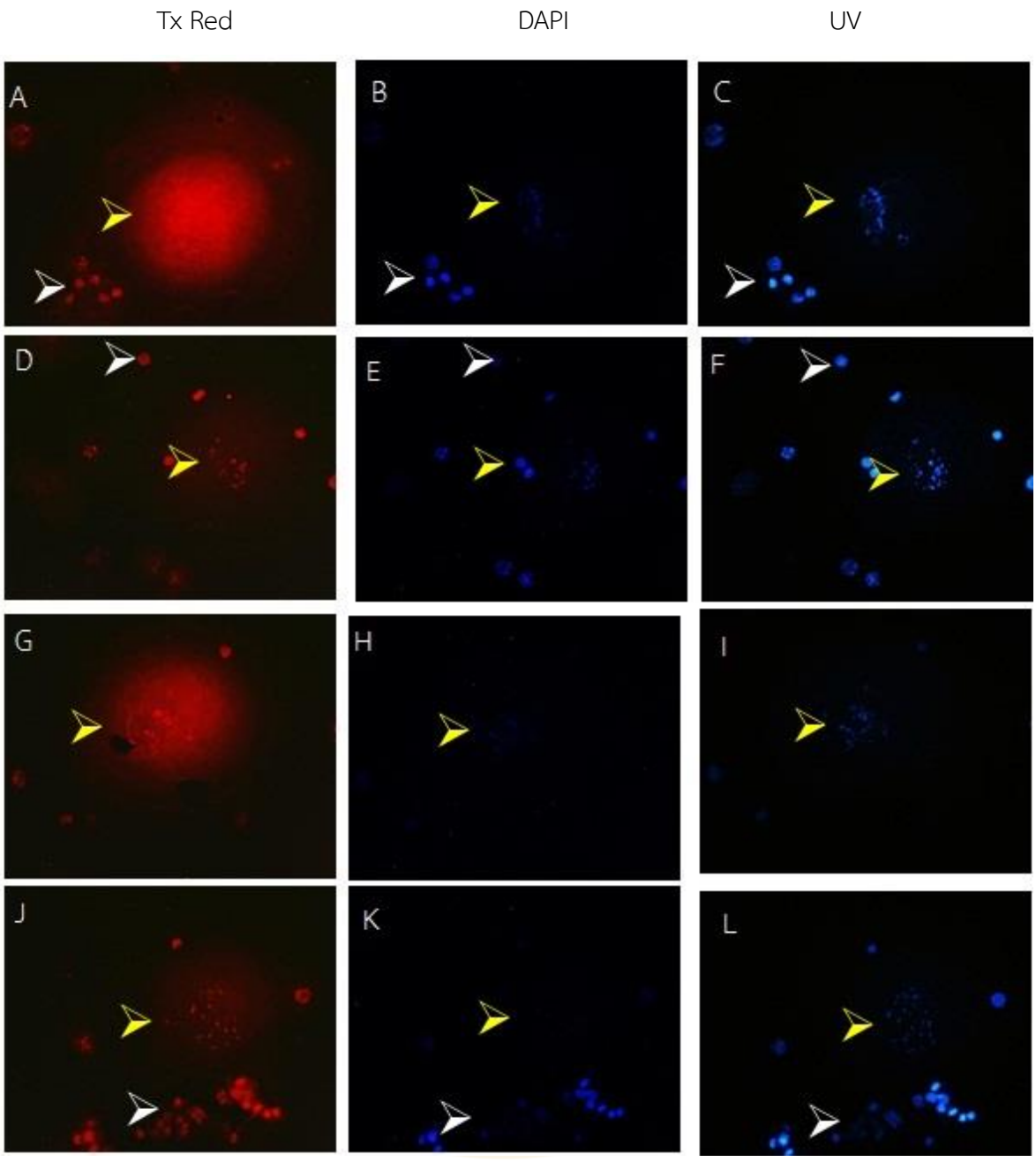
ภาพที่ 17 การทำ GISH โดยใช้ตัวอย่างดอกจากลูกผสม WTEPL ใช้โพรบที่ไม่ถูกตัด ซึ่งใช้โพรบเป็นปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซีส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซีส

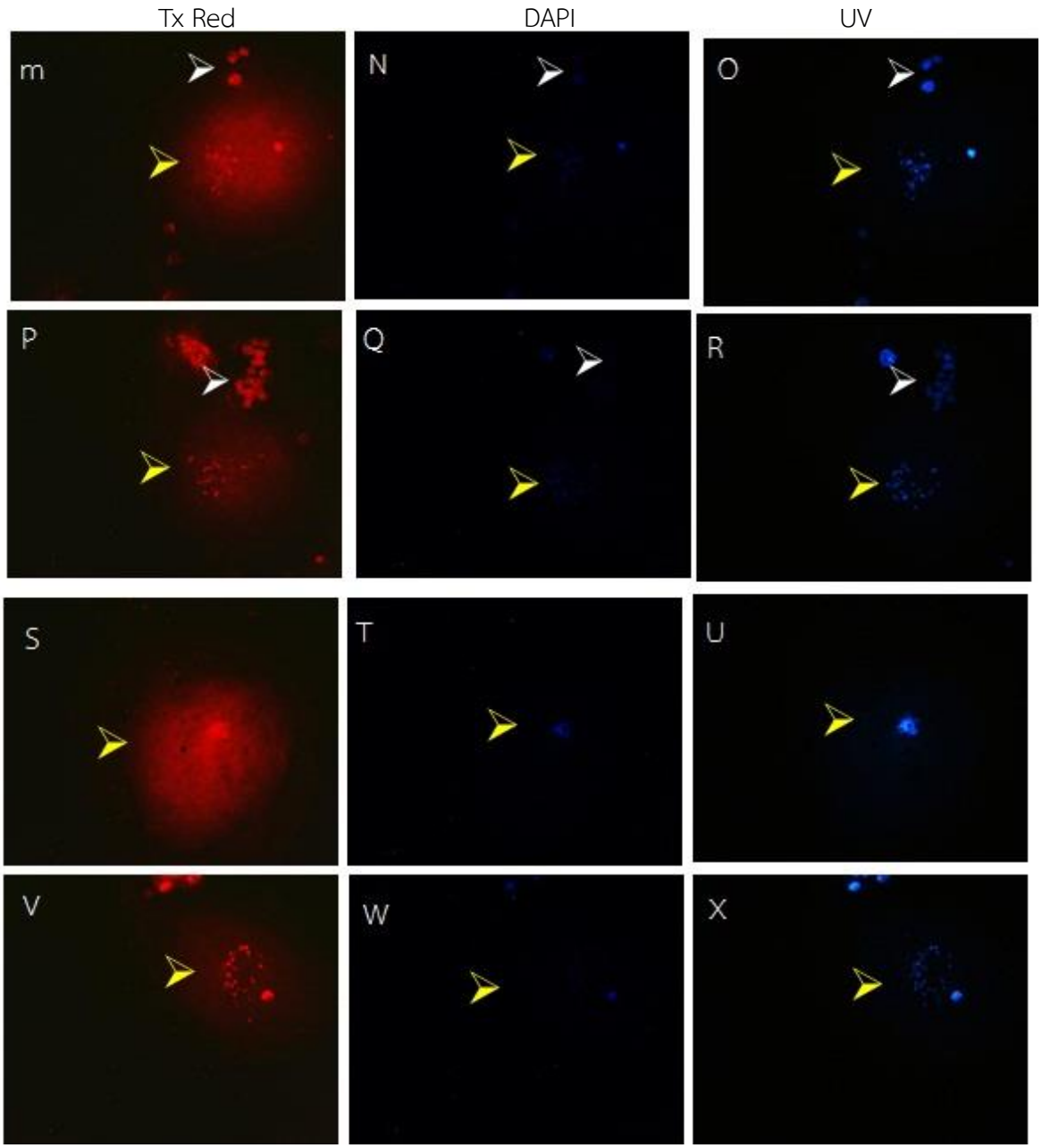


ภาพที่ 18 การทำ GISH โดยใช้ตัวอย่างดอกจากกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ใช้โพรบที่ไม่ถูกตัดของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซีส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซีส

4.1.6.3 ผลของ blocking DNA และ Salmon sperm DNA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค GISH

ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างโครโมโซมที่เตรียมจากลูกผสม WTEPL ใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep และใส่ blocking DNA และ Salmon sperm DNA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 19 พบว่า ตัวอย่างที่ใส่โพรบอย่างเดียว (ภาพที่ 19A - F) สังเกตเห็นไซโทพลาสซึมติดสีแดงเข้มของ Cy3 และสังเกตเห็นการเรืองแสงสีแดงบริเวณโครโมโซมเล็กน้อย สำหรับตัวอย่างที่ใส่ blocking DNA 20 เท่า (ภาพที่ 19G - L) 40 เท่า (ภาพที่ 19M - R) และใส่ Salmon sperm DNA (ภาพที่19S - X) พบการเรืองแสงของ Cy3 บนไซโทพลาสซึมลดลงและเห็นโครโมโซมติดสีแดงของ Cy3 บนโครโมโซมชัดเจนขึ้น

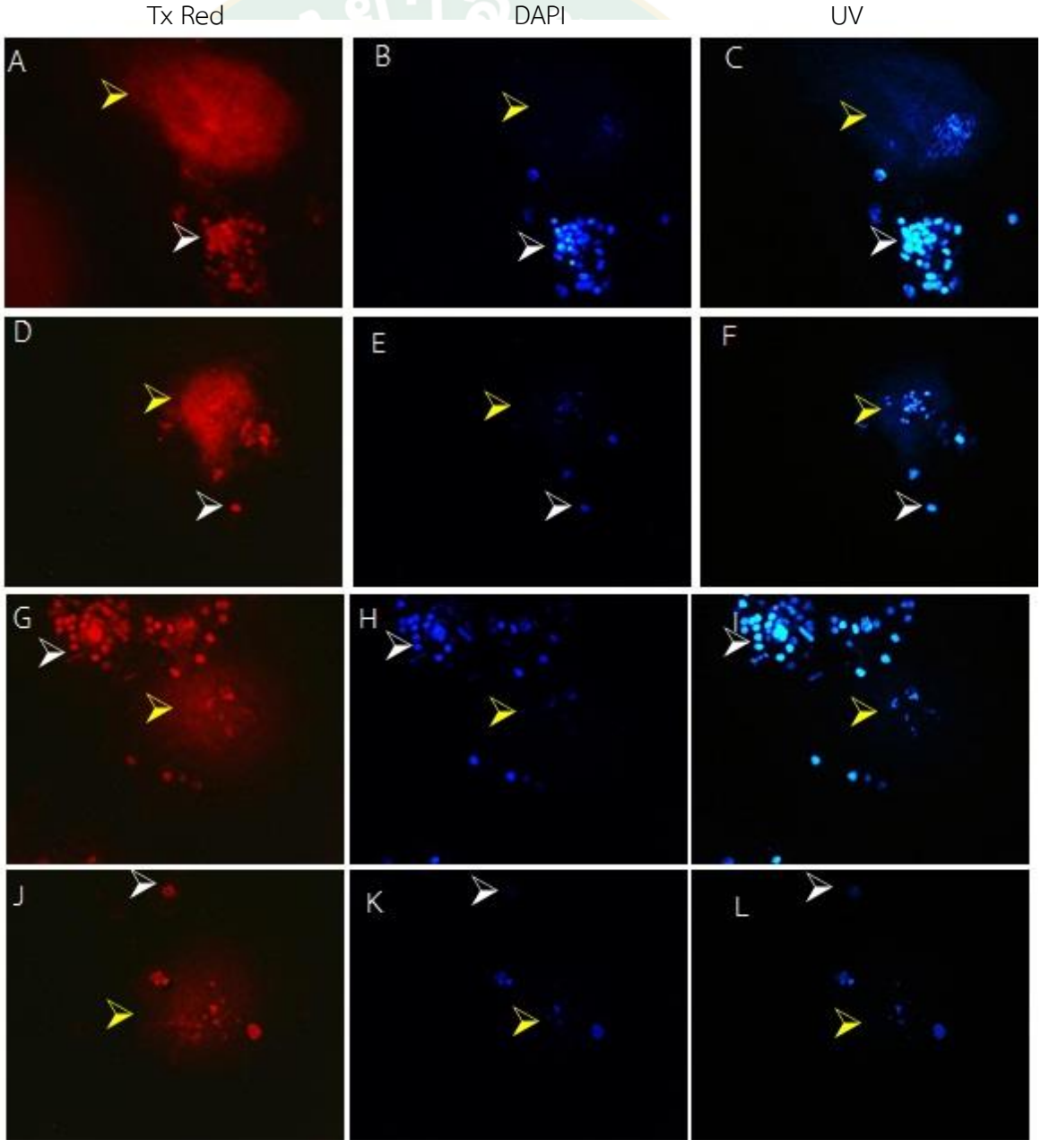

Tx Red
DAPI
UV
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

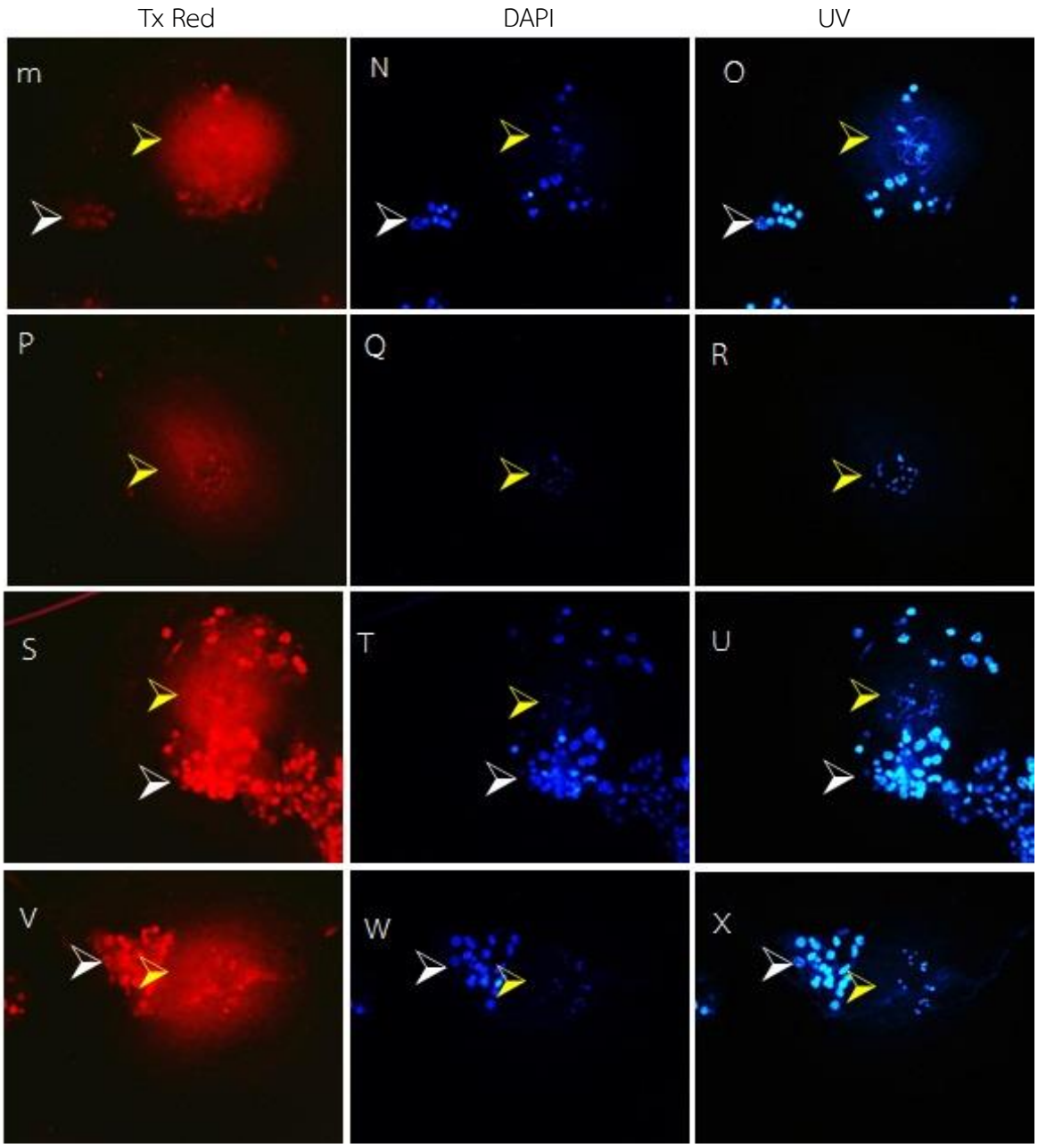


ภาพที่ 19 การทำ GISH จากตัวอย่างลูกผสม WTEPL ใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep.

A – F) ไม่ใช้ blocking DNA และ Salmon sperm DNA G – L) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 20 เท่าของโพรบ M – R) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 40 เท่าของโพรบ S –X) ใช้ Salmon sperm DNA 10µg กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซีส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซีส

นอกจากนี้ยังทดสอบผลของ blocking DNA และ Salmon sperm DNA ในตัวอย่างโครโมโซมของกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van โดยใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมา ซึ่งไม่ควรพบการเรืองแสงของสี Cy3 เมื่อทดสอบแล้ว พบว่ามีการเรืองแสงของ Cy3 บนโครโมโซมนิวเคลียส และเซลล์ของกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. ในทุกความเข้มข้นของ blocking DNA และ Salmon sperm DNA (ดังแสดงภาพที่ 20) แสดงว่าโพรบสามารจับกับโครโมโซมของกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ได้ อาจเป็นเพราะปริมาณ blocking DNA และ Salmon sperm DNA ที่ใช้ไม่เพียงพอที่จะเพิ่มความจำเพาะเจาะจงของโพรบได้

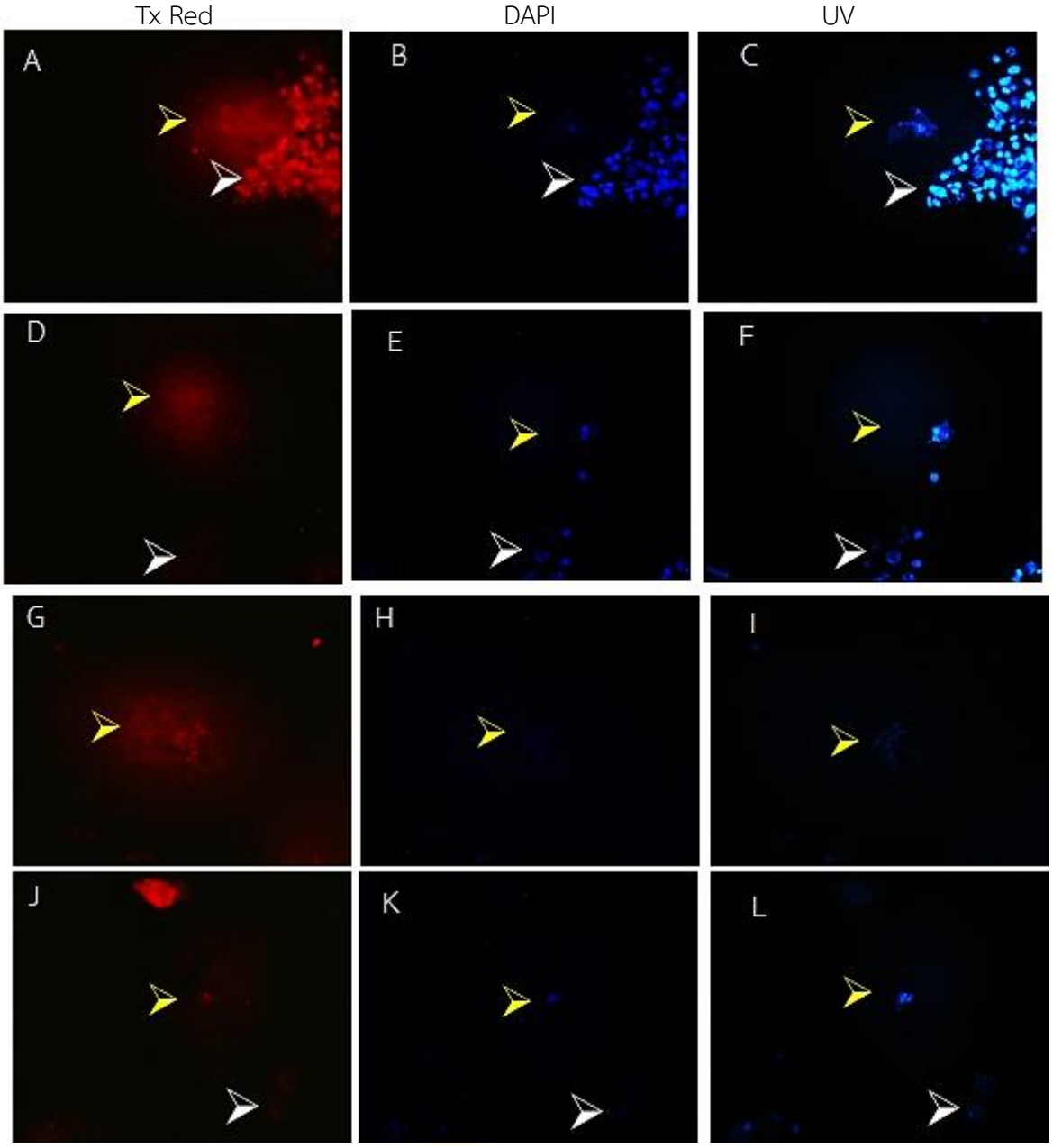


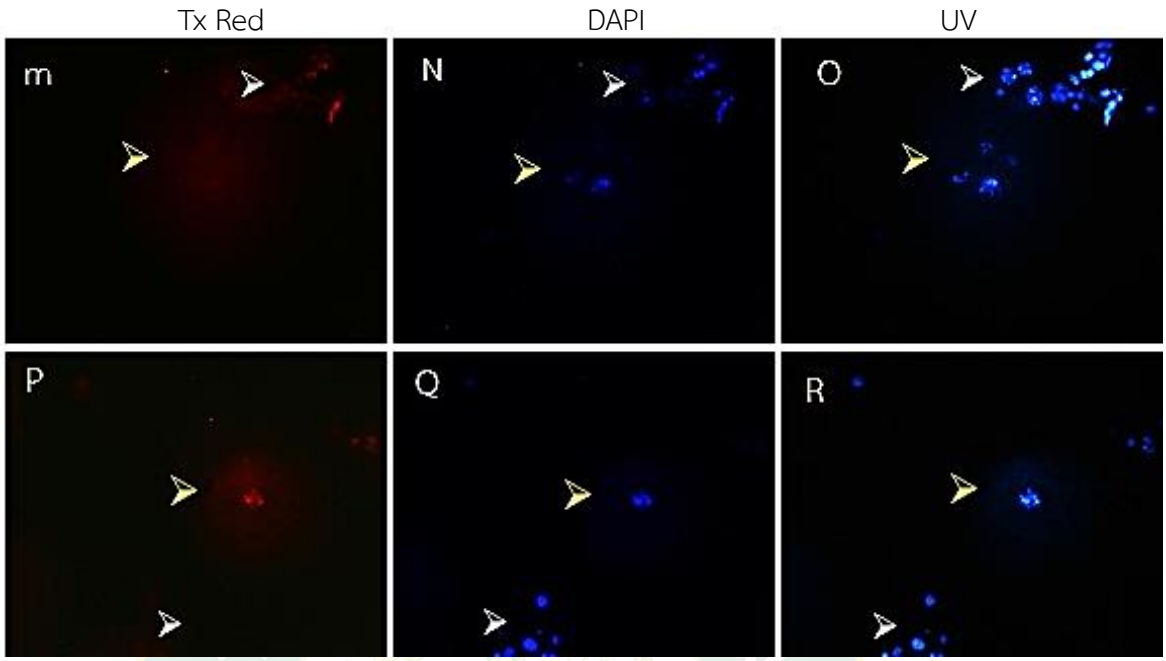


ภาพที่ 20 การทำ GISH จากตัวอย่างกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep.

A – F) ไม่ใช้ blocking DNA และ Salmon sperm DNA G – L) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 20 เท่าของโพรบ M – R) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 40 เท่าของโพรบ S –X) ใช้ Salmon sperm DNA 10µg กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซีส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซีส

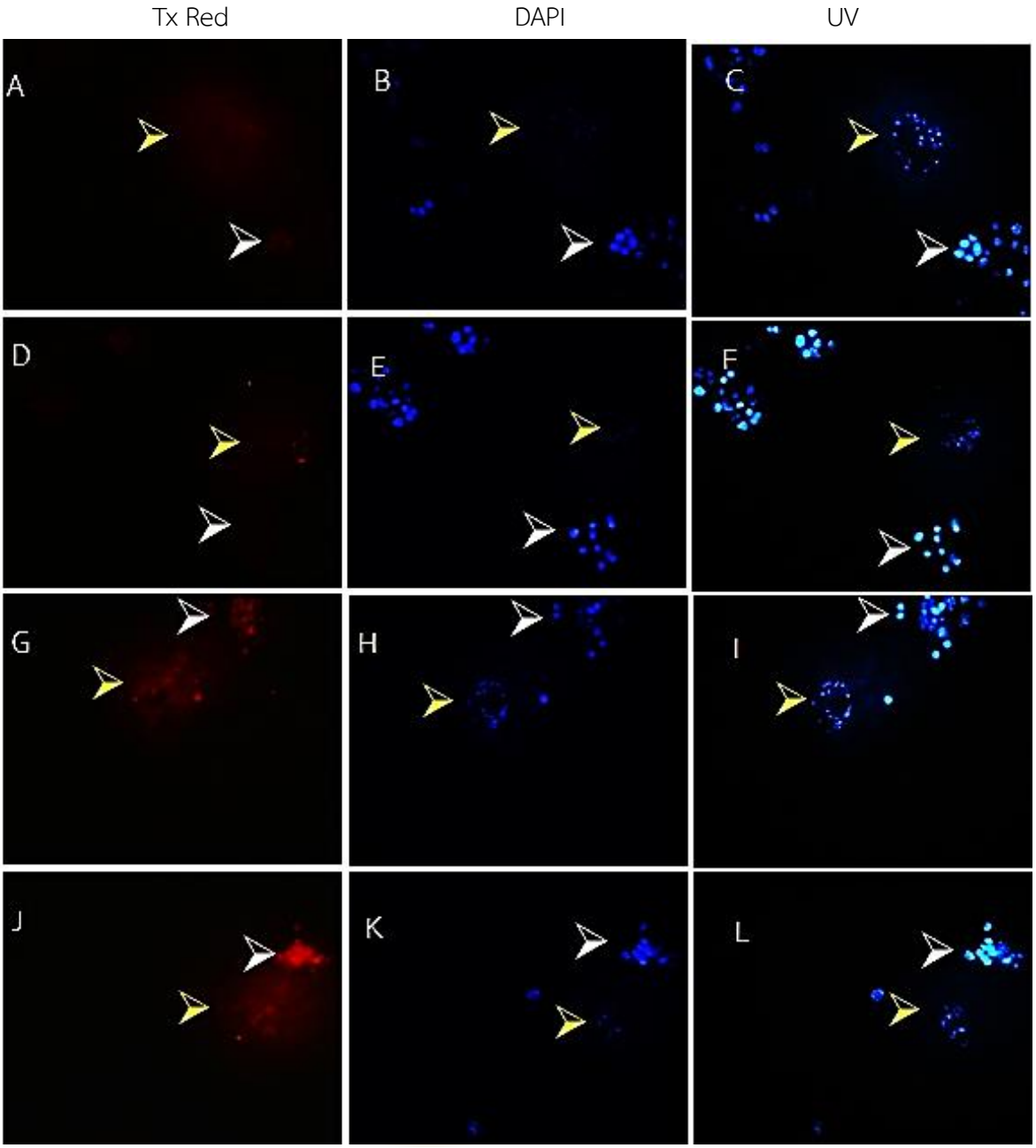
เมื่อทราบว่าการใช้ blocking DNA และ Salmon sperm DNA ช่วยลดการจับกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของโพรบต่อไซโทพลาสซึม และโครโมโซมได้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบใช้ปริมาณ blocking DNA มากขึ้น และใช้ Salmon sperm DNA ร่วมด้วยในตัวอย่างโครโมโซมของลูกผสม WTEPL และ กระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van (ใช้เป็นตัวควบคุม) และใช้โพรบเป็นปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep ซึ่งให้ผลดังนี้ (ภาพที่ 21) ในตัวอย่างที่ไม่ใส่โพรบ blocking DNA และ Salmon sperm DNA (ภาพที่ 21A - F) พบว่าสาร SA-Cy3 สามารถติดไซโทพลาสซึม และโครโมโซมได้ นั่นแสดงว่าสาร SA-Cy3 สามารถติดแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับเซลล์และโครโมโซมได้ ดังนั้นจึงควรหาสภาวะในการตรวจสอบ (detection) และล้างสีส่วนเกินออกให้เข้มงวดกว่าสภาวะที่ใช้ตอนนี้ สำหรับตัวอย่างที่ใส่โพรบ 20 ng + 40x blocking DNA + 10 µg Salmon sperm DNA (ภาพที่21 G – L) พบการเรืองแสงของสาร Cy3 บนโครโมโซมที่เห็นได้ชัดเจนกว่าตัวอย่างที่ไม่ใส่โพรบแต่ก็ยังติดไซโทพลาสซึมอยู่ด้วย สำหรับตัวอย่างที่ใส่โพรบ 20 ng + 80x blocking DNA + 10 µg Salmon sperm DNA (ภาพที่21 M – R) พบการเรืองแสงของสาร Cy3 บนโครโมโซมชัดเจนมากขึ้น และพบการเรืองแสงของสาร Cy3 บริเวณไซโทพลาสซึมน้อยมาก แต่อย่างไรก็ตาม โพรบยังคงติดบนโครโมโซมทุกแท่งของลูกผสม แสดงว่าการใช้ blocking DNA ร่วมกับ Salmon sperm DNA ยังไม่สามารถเพิ่งความจำเพาะเจาะจงของโพรบได้ นอกจากนี้พบว่าการใช้สาร SA-Cy3 อย่างเดียวก็สามารถจับกับไซโทพลาสซึมและโครโมโซมได้ อาจเป็นเพราะใช้ความเข้มงวดของเกลือในการล้างไม่เพียงพอ ดังนั้นการใช้ความเข้มงวดของเกลือในการล้างมากขึ้นร่วมกับการล้างที่อุณหภูมิสูงมากขึ้น หรือใช้สาร formamide ที่ความเข้มข้นต่ำในการล้าง ซึ่งสาร formamide เป็นสารที่ทำให้โครโมโซมเสียสภาพธรรมชาติ อาจจะทำให้โพรบที่จับกับโครโมโซมแบบไม่จำเพาะเจาะจงหลุดออกได้

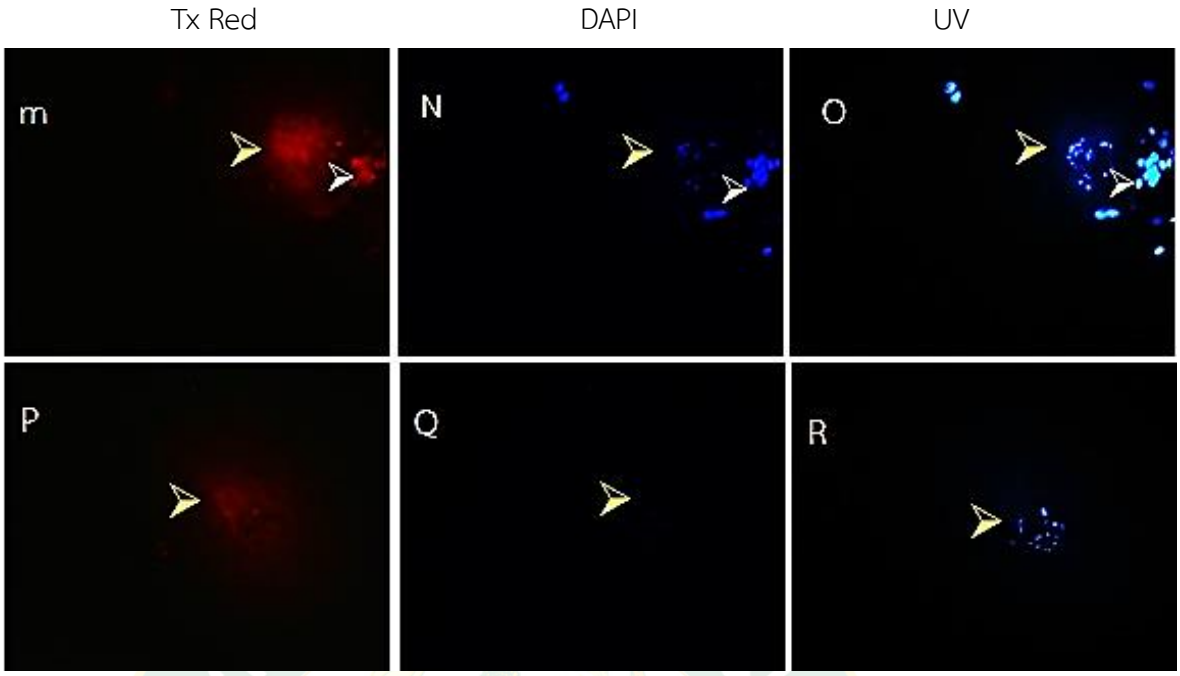

Tx Red
DAPI
UV
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L



ภาพที่ 21 ผลการทำ GISH จากลูกผสม WTEPLใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep.
A – F) ไม่ใช้โพรบ blocking DNA และ Salmon sperm DNA G – L) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 40 เท่าของโพรบ ร่วมกับ Salmon sperm DNA 10µg M – R) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 80 เท่าของโพรบ ร่วมกับ Salmon sperm DNA 10µg กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซล์ไมโอซิส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซิส

ผลการทำ GISH โดยใช้ตัวอย่างดอกจากกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ซึ่งใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep พบว่าตัวอย่างที่ไม่ใส่โพรบ blocking DNA และ Salmon sperm DNA มีการเรืองแสงของสาร Cy3 บริเวณไซโทพลาสซึม และบนโครโมโซมอยู่บ้างเล็กน้อย (ภาพที่ 22A - F) สำหรับตัวอย่างที่ใส่โพรบ 20 ng + 40x blocking DNA + 10 µg Salmon sperm DNA พบการเรืองแสงของสาร Cy3 บนโครโมโซม ความเข้มของสีที่ติดโครโมโซมใกล้เคียงกับไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 22G - L) สำหรับตัวอย่างที่ใส่โพรบ 20 ng + 80x blocking DNA + 10 µg Salmon sperm DNA พบการเรืองแสงของสาร Cy3 บนโครโมโซมอยู่เล็กน้อย ความเข้มของสีใกล้เคียงกับไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 22 M - R)


Tx Red
DAPI
UV
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L



ภาพที่ 22 ผลการทำ GISH ของกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ใช้โพรบเป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของปทุมมาสปีชีส์ (*C. alismatifolia* Gagnep.)
A – F) ไม่ใช้โพรบ blocking DNA และ Salmon sperm DNA G – L) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 40 เท่าของโพรบ ร่วมกับ Salmon sperm DNA 10µg M – R) ใช้ blocking DNA ปริมาณ 80 เท่าของโพรบ ร่วมกับ Salmon sperm DNA 10µg กำลังขยาย 400 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงเซลล์ไมโอซิส ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ไมโทซิส

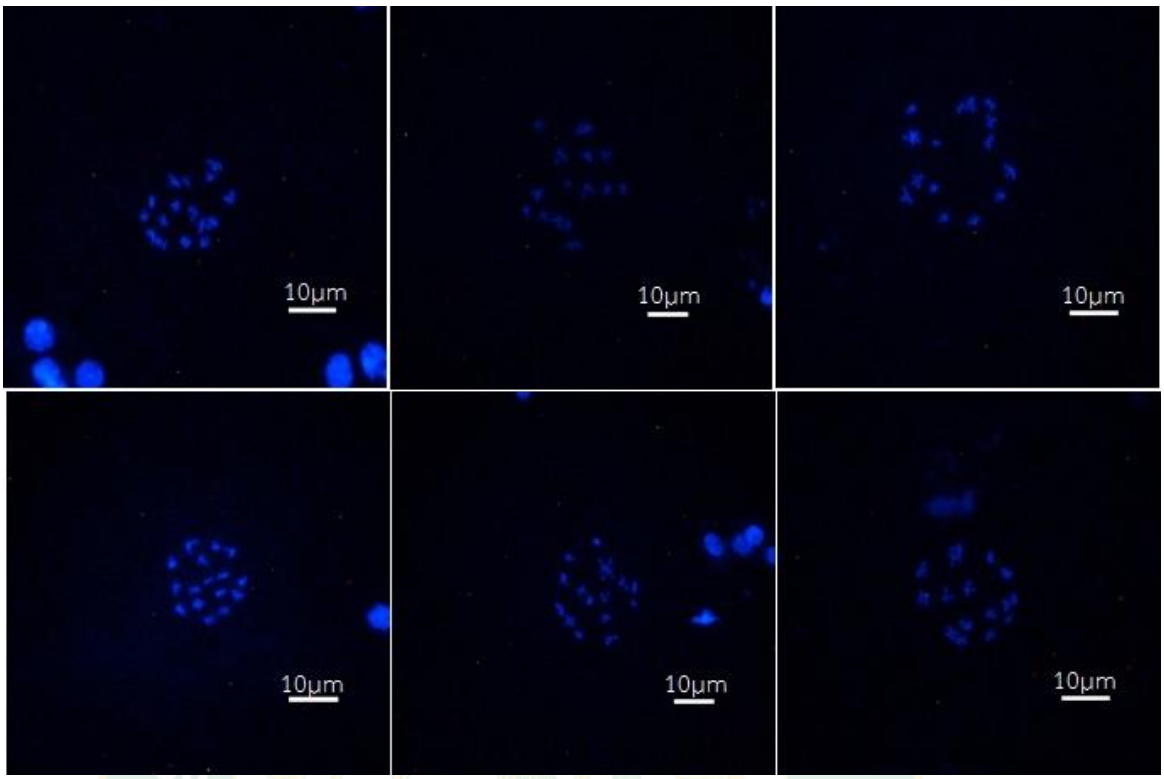
จากผลการศึกษาการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยวิธี GISH ไม่มีสภาวะใดที่สามารถตรวจสอบการเป็นลูกผสมได้ เนื่องจากโพรบไม่สามารถจับกับโครโมโซมได้อย่างจำเพาะเจาะจง อาจเกิดจากปัญหาต่าง ๆ ในขั้นตอนการทำ GISH เช่น การทำให้โครโมโซมเสียสภาพธรรมชาติไม่สมบูรณ์ การล้างส่วนที่จับกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงออกไม่หมด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีในการตรวจสอบลูกผสมวิธีอื่น ได้แก่ การนับจำนวนโครโมโซม และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบลูกผสม เป็นต้น

4.2. การตรวจสอบลูกผสมโดยวิธีนับจำนวนโครโมโซม

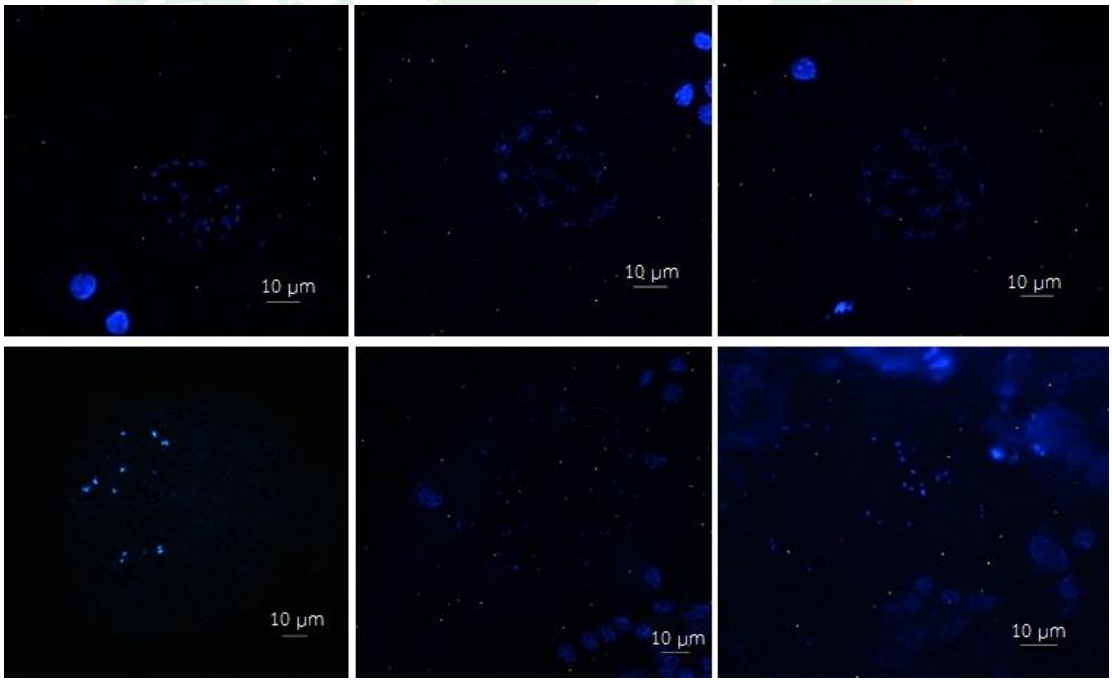
การศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชสามารถศึกษาได้จากส่วนของปลายราก คือการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และศึกษาจากส่วนของดอกตูม คือการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ในวิทยานิพนธ์นี้ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากดอกตูม เนื่องจากดอกปทุมมา กระเจียว และลูกผสม มีลักษณะเป็นช่อดอก ดังนั้นจึงมีดอกจำนวนมาก และแต่ละช่อดอกมีดอกแตกต่างกันหลายขนาดจึงสามารถหาระยะการแบ่งเซลล์ตามที่ต้องการเพื่อจะศึกษาจำนวนโครโมโซมได้โดยง่าย แต่สำหรับปลายรากเนื่องจาก

ปทุมมา กระเจียว และลูกผสมเป็นพืชหัวจึงมีรากที่เป็นปลายขาวขุ่นน้อย และการที่จะนำรากมาทำการทดลองเป็นไปได้ยากจึงเลือกใช้ดอกตูมแทน

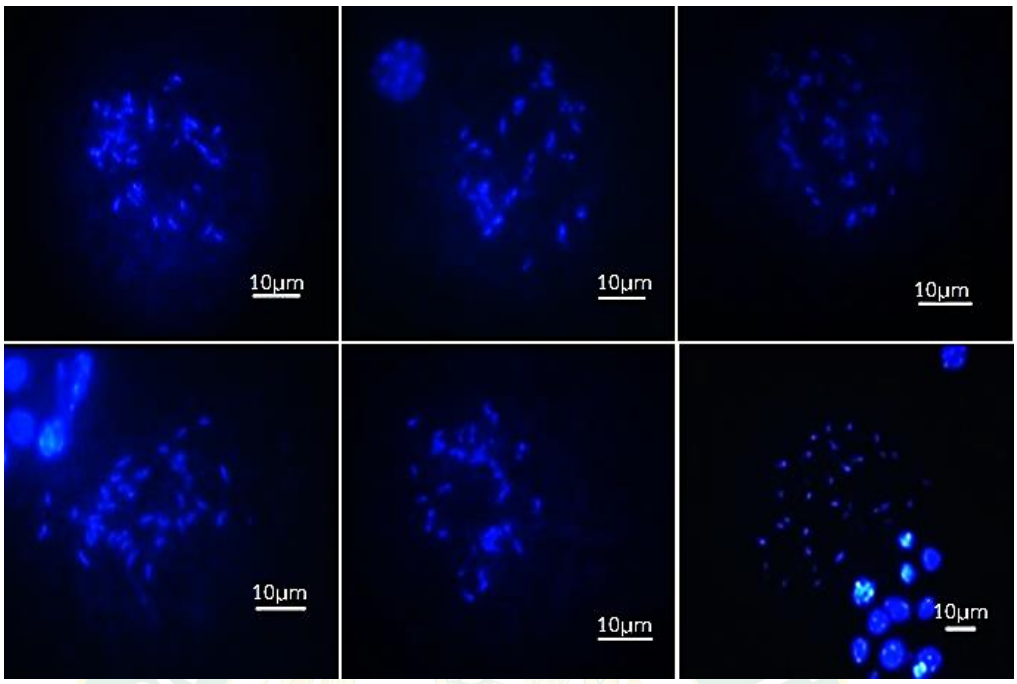
การตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาและกระเจียวโดยวิธีนับจำนวนโครโมโซมจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ต้องมีการศึกษาขนาดดอกและขนาดอับเรณูที่มีระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่เหมาะสม คือระยะไดอะไคเนซิส พบว่าขนาดดอกที่เหมาะสมในการศึกษาโดยวิธีนับจำนวนโครโมโซม ของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. คือ 4 mm. ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm. สำหรับกระเจียว สปีชีส์ *C. aurantiaca* Van Zip. คือ 4 - 4.5 mm. ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm. และลูกผสมข้ามชนิด SWEPL คือ 4 - 5.5 mm. ขนาดอับเรณู 2 - 3 mm จากนั้นเตรียมโครโมโซมโดยวิธีการหยดโปรโตพลาสต์ และย้อมด้วยสี DAPI พบว่า ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. มีเซลล์ระยะไดอะไคเนซิสจำนวนมาก และมองเห็นโครโมโซมเป็นแท่งชัดเจน สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้หลังจากนับจำนวนโครโมโซม 10 เซลล์ พบว่ามี 16 ไบวาเลนท์ (ภาพที่ 23) เนื่องจากเซลล์ระยะไดอะไคเนซิสที่ศึกษานี้โครโมโซมจะขดตัวสั้นทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจน และมีการเข้าคู่กันของโครโมโซมคู่เหมือน เรียกว่าไบวาเลนท์ ดังนั้น ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. ที่ศึกษาจึงมีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 สอดคล้องกับงานวิจัยของลลิตา และคณะ (2557) ที่นับจำนวนโครโมโซมของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep จากปรายราก พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 สำหรับกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van พบเซลล์ระยะดิโพลทีนและไดอะไคเนซิสจำนานมาก แต่ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้เนื่องจากโครโมโซมซ้อนทับกันและบางเซลล์โครโมโซมกระจายมากเกินไปทำให้มองเห็นโครโมโซมได้ไม่ครบ (ภาพที่ 24) แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานก่อนหน้านี้ถึงจำนวนโครโมโซมของกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 42 (Leong-Škorničková et al., 2007) ส่วนลูกผสมข้ามชนิด SWEPL โครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ เนื่องจากการเข้าคู่กันต้องเกิดจากโครโมโซมคู่เหมือน จึงนับโครโมโซมจาก ระยะไดอะไคเนซิส ซึ่งพบเซลล์ระยะไดโพลทีนและไดอะไคเนซิสหลายเซลล์มองเห็นโครโมโซมกระจายไม่ซ้อนทับกันแต่ก็ยังมีบางเซลล์ที่เห็นโครโมโซมซ้อนทับกันอยู่ จึงนับจำนวนโครโมโซมในเซลล์ทั้งหมด 10 เซลล์ พบจำนวนโครโมโซม 2n = 37 (ภาพที่ 25) ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโครโมโซมของต้นพ่อแม่พันธุ์ คือ ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32, n = 16 และกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 42, n = 21 ดังนั้นลูกผสมจะมีจำนวนโครโมโซม 2n = 37 สำหรับในลูกผสมอื่น ๆ ได้แก่ WTEPL, WTUsa และ BKS ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ เนื่องจากการการเตรียมโครโมโซมไม่สามารถทำให้โครโมโซมกระจายไม่ซ้อนทับกันได้



ภาพที่ 23 เซลล์ระยะไดอะไคเนซิสย้อมด้วยสี DAPI ของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep.



ภาพที่ 24 เซลล์ระยะไดอะไคเนซิสย้อมด้วยสี DAPI ของปทุมมาสปีชีส์ *C. aurantiaca Van* Zip.

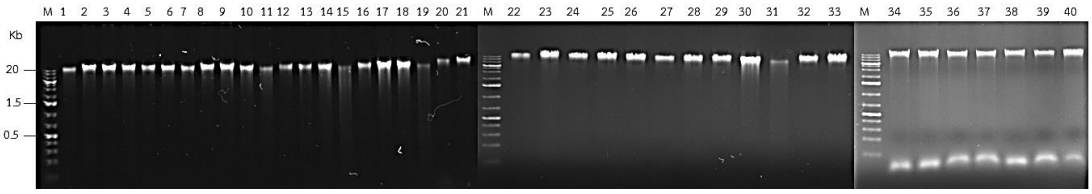


ภาพที่ 25 เซลล์ระยะไดอะไคเนซิสย้อมด้วยสี DAPI ของลูกผสม SWEPL

4.3. ผลการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเครื่องหมาย ISSR

4.3.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างพืชทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ได้แก่ ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. กระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. กระเจียวสปีชีส์ *C. roscoeana* wall. ลูกผสม SWEPL ลูกผสม WTEPL ลูกผสม WTUsa และลูกผสม BKS แสดงในภาพที่ 26 พบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี มีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่คุณภาพไม่ดีเห็นแถบดีเอ็นเอเป็นปื้น (smear) และแถบบาง เช่น ตัวอย่างที่ 11, 19, 20 และ 31 เป็นต้น ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะตัวอย่างที่คุณภาพดีมาศึกษาเท่านั้น ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษา หรือใช้ในการทดลองต่อไปแสดงในตารางที่ 9



ภาพที่ 26 ผลการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม
หมายเลข 1,21, 34, 35, 36, 37 และ 40 คือกระเจียวพันธุ์ EPL; หมายเลข 2, 3, 4, 20, 22, 23, 24, 38 และ39 คือปทุมมาพันธุ์ Snow white (SW); หมายเลข 5, 6, 7 และ 25 คือ ปทุมมาพันธุ์ Big red (BR); หมายเลข 8, 9, 10 และ 26 คือ ปทุมมาพันธุ์ White Tung (WT); หมายเลข 11, 27 และ 29 คือ กระเจียวพันธุ์กระเจียวส้ม (KS); หมายเลข 12 และ 28 คือ กระเจียวพันธุ์อุษา (Usa); หมายเลข 13, 14, 15 และ 30 คือ ลูกผสม WTEPL เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ White Tung กับพันธุ์ EPL; หมายเลข 16, 17 และ 18 คือ ลูกผสม WTUsa เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ White Tung กับพันธุ์อุษา; หมายเลข 19 และ 31 คือ ลูกผสม BKS เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ Big red กับพันธุ์กระเจียวส้ม; หมายเลข 32 และ 33 คือ ลูกผสม SWEPL เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ Snow white กับพันธุ์ EPL; M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder

จากการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสง พบว่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิก พบว่าพืชตัวอย่างแต่ละชนิดมีความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกอยู่ระหว่าง 62.3-266.0 ng/µl ค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} เป็นค่าที่บอกถึงคุณภาพของกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ หากเป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าระหว่าง 1.7-1.8 หากมีค่าต่ำกว่าค่าที่เหมาะสมแสดงว่าอาจมีโปรตีนปนเปื้อน หรือหากมีค่าสูงกว่าแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน ในสารละลายดีเอ็นเอของพืชตัวอย่าง พบว่ามีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.96- 2.45 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าที่เหมาะสมแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นหากมีการสกัดดีเอ็นเอครั้งต่อไปควรเพิ่มปริมาณ RNaseA หรือเพิ่มเวลาในการย่อยอาร์เอ็นเอให้นานขึ้น สำหรับค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{230} เป็นค่าที่บอกถึงคุณภาพของดีเอ็นเอและการปนเปื้อนของสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ฟีนอล และ EDTA ค่าที่เหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์อยู่ที่ประมาณ 1.8 และ 2.0 ตามลำดับ (Scientific, 2009) แต่พบว่าสารละลายดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างมีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{230}อยู่ระหว่าง 0.45-1.41 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่เหมาะสมแสดงว่าอาจมีสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตปนเปื้อน ซึ่งจากตัวอย่างทั้งหมด กระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. มีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{230} น้อยกว่าตัวอย่างอื่น คือ 0.45 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอแบบ mCTAB กำจัดโปรตีนโดยใช้สาร phenol : chloroform : isoamyl

alcohol จึงอาจมีสารฟีนอลปนเปื้อนมาได้ วิธีที่แก้ไขการปนเปื้อนของฟีนอลก็อาจจะใช้สาร chloroform : isoamyl : alcohol ล้างฟีนอลออกหลาย ๆ ครั้งอาจจะทำให้การปนเปื้อนของฟีนอลลดลงได้ แต่สำหรับการปนเปื้อนของแป้งอาจต้องเลือกใช้ใบอ่อนมาก ๆ และมีการคลุมต้น 1 วันก่อนสกัดดีเอ็นเอ เพื่อลดการสังเคราะห์แสง และลดการเก็บสะสมแป้งในใบ

ตารางที่ 9 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง	ต้น	ความเข้มข้นกรดนิวคลีอิก (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
C. alismatifolia Gagnep	SW1	117	2.34	1.165	2.01	0.76
	SW2	103.2	2.065	1.011	2.04	0.69
	SW3	111.2	2.224	1.106	2.01	0.76
	SW4	62.5	1.251	0.589	2.12	0.47
	SW5	127.9	2.558	1.285	1.99	1.07
	SW6	105.6	2.112	1.079	1.96	1.28
	BR1	85.5	1.71	0.836	2.05	0.82
	BR2	116.2	2.323	1.156	2.01	0.82
	BR3	85.5	1.709	0.856	2	0.86
	BR4	94.5	1.89	0.951	1.99	1.2
	WT1	117.7	2.355	1.177	2	0.94
	WT2	96.1	1.922	0.964	1.99	0.99
	WT3	71.7	1.434	0.693	2.07	0.72
	WT4	105.6	2.113	1.065	1.98	0.68
C. aurantiaca Van.	EPL1	75.1	1.501	0.724	2.07	0.76
	EPL2[A]	82.0	N/A	N/A	N/A	N/A
	EPL3	266.0	5.319	2.174	2.45	0.45
	USA1	67.9	1.359	0.639	2.13	0.8
	USA2	107.7	2.154	1.08	1.99	1.41
C. roscoeana wall.	KS1	116.1	2.322	1.165	1.99	0.91
	KS2	67.7	1.355	0.662	2.05	0.74
Hybrids	SWEPL1	95.2	1.903	0.926	2.05	0.56
	SWEPL2	116.5	2.33	1.171	1.99	0.77
	WTEPL1	100.3	2.006	1.01	1.99	1.32
	WTEPL2	64.2	1.284	0.62	2.07	0.79
	WTEPL3	77.6	1.552	0.758	2.05	0.92
	WTUsa1	118	2.359	1.187	1.99	0.92
	WTUsa2	132.1	2.642	1.349	1.96	1.24
	WTUsa3	103.5	2.071	1.047	1.98	1.29
	BKS1	62.3	1.246	0.588	2.12	0.6

หมายเหตุ : [A] คือ ได้รับดีเอ็นเอมาจาก อาจารย์ ดร. นฤมล เข็มกลัดเงิน จึงไม่มีข้อมูลคุณภาพของดีเอ็นเอ

4.3.2 การตรวจสอบไพรเมอร์ และหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

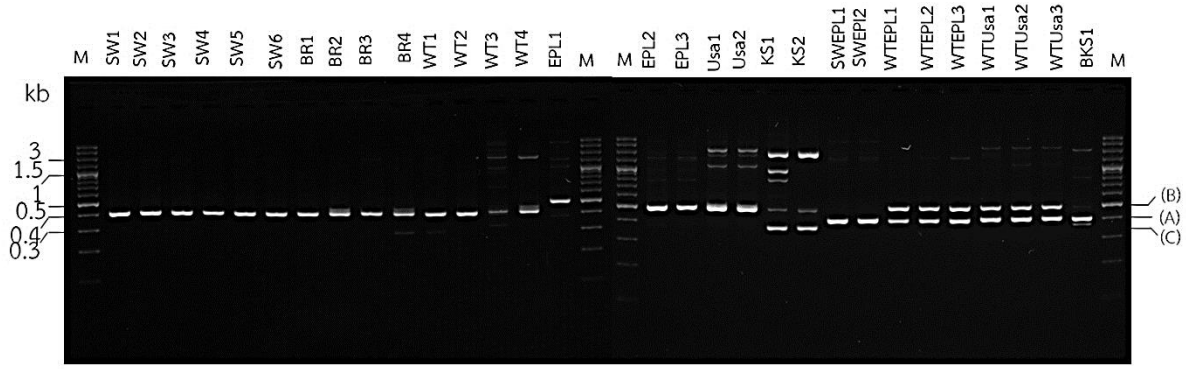
เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดสามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างได้และควรใช้อุณหภูมิ annealing เท่าใด ดีเอ็นเอของตัวอย่างสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep., *C. aurantiaca* Van. และ *C. roscoeana* wall. ถูกนำมารวมกันและใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด ISSR และ อุณหภูมิ annealing ตามงานวิจัยของ Degani et al. (2003), Taheri et al. (2012) และ Das et al. (2011) ผลการทดลองพบว่ามีหลายไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มากและน้อยเกินไปจึงเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมและคาดว่าจะสามารถจำแนกความเป็นลูกผสมของแต่ละคู่ผสมได้ ดังตารางที่ 10 ซึ่งแสดงไพรเมอร์และอุณหภูมิ annealing ที่จะถูกใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างต่อไป

ตารางที่ 10 ข้อมูลไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ 5'→ 3'	อุณหภูมิ Annealing (°C)	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง
808	$(AG)_8C$	58	10	10	100%
809	$(AG)_8G$	58	7	7	100%
811	$(GA)_8C$	52	6	6	100%
812	$(GA)_8A$	52	10	10	100%
816	$(CA)_8T$	56	11	11	100%
817	$(CA)_8A$	58	3	3	100%
818	$(CA)_8G$	52	3	3	100%
826	$(AC)_8C$	56	5	4	80%
836	$(AG)_8YA$	55	10	10	100%
891	$HVH(TG)_7$	55	7	7	100%
Total	-	-	72	71	98%

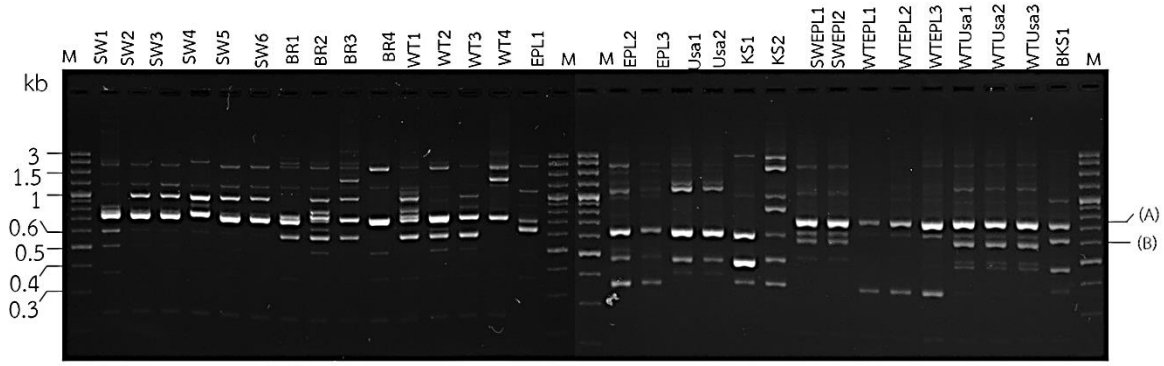
4.3.3 การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปทุมมา กระเจียว และลูกผสม จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 808 ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 - 2,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งหมด 10 แถบ (ภาพที่ 27) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) เท่านั้น (ภาพที่27A) แถบที่มีขนาด 500 คู่เบสจำเพาะต่อกระเจียว (*C. aurantiaca* Van. และ *C. roscoeana* wall.) (ภาพที่ 27B, C) วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่าในลูกผสมทุกตัวอย่างจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ที่จำเพาะต่อพันธุ์แม่ปทุมมา ลูกผสม BKS ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 350, 500, และ 1,500 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์พ่อกระเจียวส้ม (KS) ลูกผสม WTEPL และ WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์พ่อกระเจียว พันธุ์ EPL และ พันธุ์ Usa แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ 808 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบการเป็นลูกผสมของลูกผสม BKS, WTEPL และ WTUsa ได้ แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบลูกผสม SWEPL ได้ เพราะไม่พบแถบดีเอ็นเอของพ่อพันธุ์ EPL ในลูกผสม



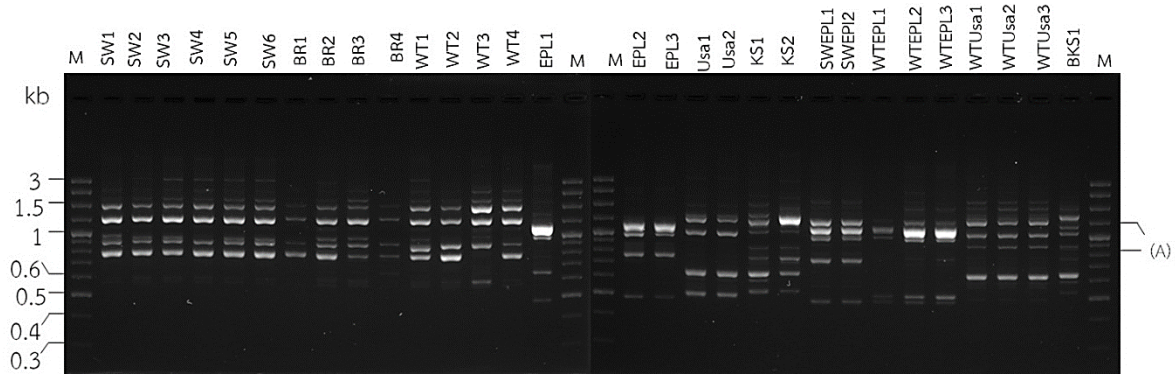
ภาพที่ 27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 808 (A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (B) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกระเจียว (*C. aurantiaca* Van. และ *C. roscoeana* wall.) (C) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกระเจียว (*C. roscoeana* wall.) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 809 ดังแสดงในภาพที่ 28 เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 250 - 2,000 คู่เบส ความหลากรูปทั้งหมดจำนวน 7 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส (2 - 3 แถบที่มีขนาดใกล้เคียงกัน) จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (ภาพที่ 28A) แถบที่มีขนาด 600 คู่เบสจำเพาะต่อกระเจียว (*C. aurantiaca* Van. และ *C. roscoeana* wall.) (ภาพที่ 28B) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 750 คู่เบสที่จำเพาะต่อพันธุ์ปทุมมาปรากฏในลูกผสมทุกคู่ และลูกผสม SWEPL ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 250 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมา (พันธุ์ Snow White) เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนพันธุ์พ่อในลูกผสมพบว่า ลูกผสม BKS ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 350, 600, 1,110 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ ลูกผสม WTEPL ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 350 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ EPL และลูกผสม WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์พ่อกระเจียว พันธุ์ Usa แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ 809 สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้เกือบทุกคู่ผสมยกเว้น ลูกผสม SWEPL ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์พ่อ



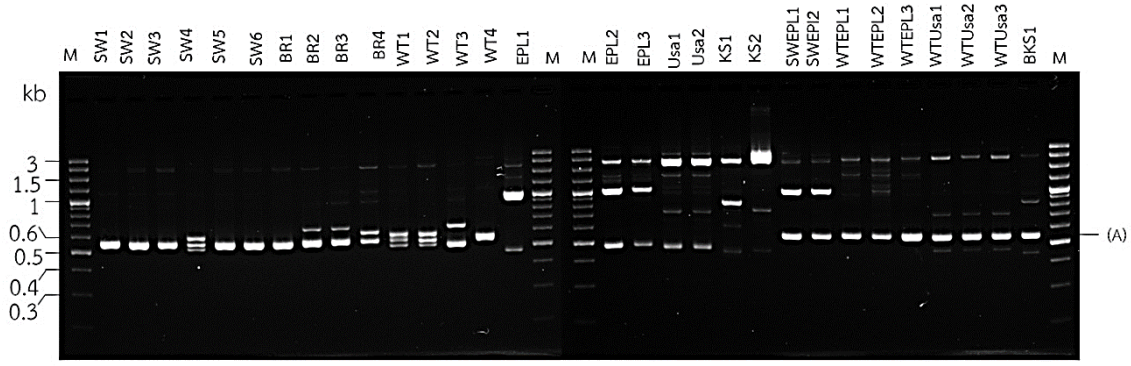
ภาพที่ 28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 809 (A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (B) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกระเจียว (*C. aurantiaca* Van. และ *C. roscoeana* wall.) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 811 ดังแสดงในภาพที่ 29 ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 400 - 2,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งหมด 6 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 850 และ 1,200 คู่เบส จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (ภาพที่ 29A) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ดังนี้ ลูกผสม BKS ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500, 600 และ 1,000 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวส้ม แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมาพันธุ์ Big red ลูกผสม SWEPL ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 450, 900 และ 1,000 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ EPL และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,200 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมาพันธุ์ Snow White ลูกผสม WTEPL ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 480 และ 1,000 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ EPL และ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,200 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมาพันธุ์ White Tung (WT) ลูกผสม WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 450, 600 และ 1,000 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ Usa และ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 850 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมาพันธุ์ White Tung (WT) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ 811 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมของลูกผสมที่ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ได้ทุกคู่



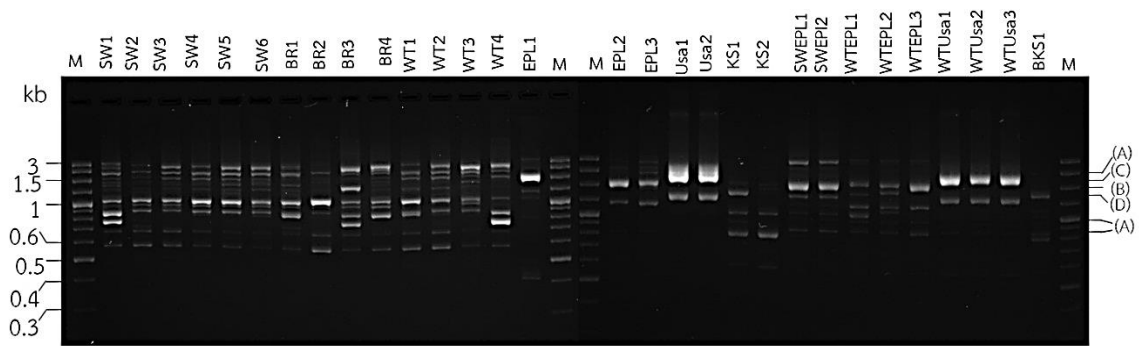
ภาพที่ 29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 811 (A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 812 ดังแสดงในภาพที่ 30 ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 400 - 2,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ 10 แถบ ที่มีความหลากรูปทั้งหมด 10 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (ภาพที่ 30A) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ดังนี้ ลูกผสม BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมา นอกจากนี้ยังบอกถึงความเป็นลูกผสมข้ามชนิดได้ 2 คู่ผสม คือ ลูกผสม SWEPL ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ EPL และ ลูกผสม WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ Usa



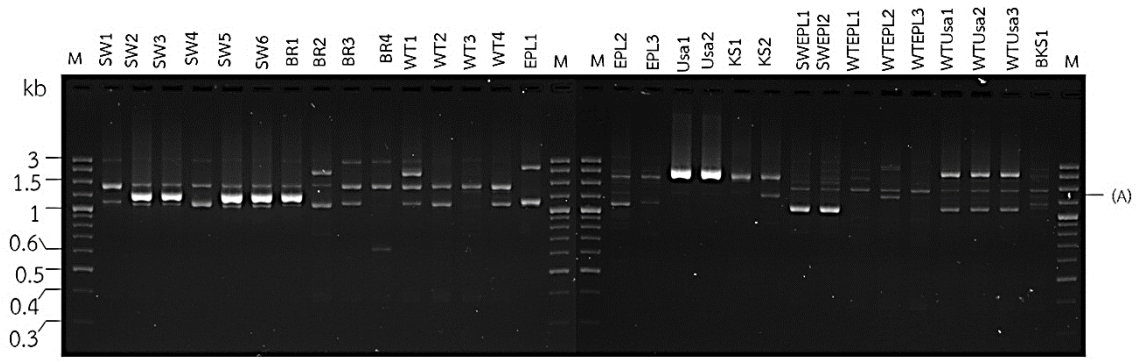
ภาพที่ 30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 812
(A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมาและลูกผสม (*C. alismatifolia* Gagnep) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 816 (ภาพที่ 31) ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 500 - 3,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งหมด 11 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อพบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 550, 850, 1,000 และ 2,000 คู่เบส จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (ภาพที่ 31A) แถบที่มีขนาด 1,500 คู่เบสจำเพาะต่อกระเจียวพันธุ์ EPL (ภาพที่ 31 B) แถบที่มีขนาด 1,700 คู่เบสจำเพาะต่อกระเจียวพันธุ์ Usa (ภาพที่ 31 C) แถบที่มีขนาด 1,300 คู่เบส จำเพาะต่อกระเจียวพันธุ์กระเจียวส้ม (KS) (ภาพที่ 31 D) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ดังนี้ ลูกผสม BKS ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียว ลูกผสม WTEPL ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมาพันธุ์ White Tung (WT) ลูกผสม WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ Usa และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมา พันธุ์ White Tung ซึ่งสรุปได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสมได้ 2 คู่ผสม คือ ลูกผสม BKS และ WTUsa ส่วนลูกผสม WTEPL พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่เหมือนพันธุ์แม่เท่านั้น



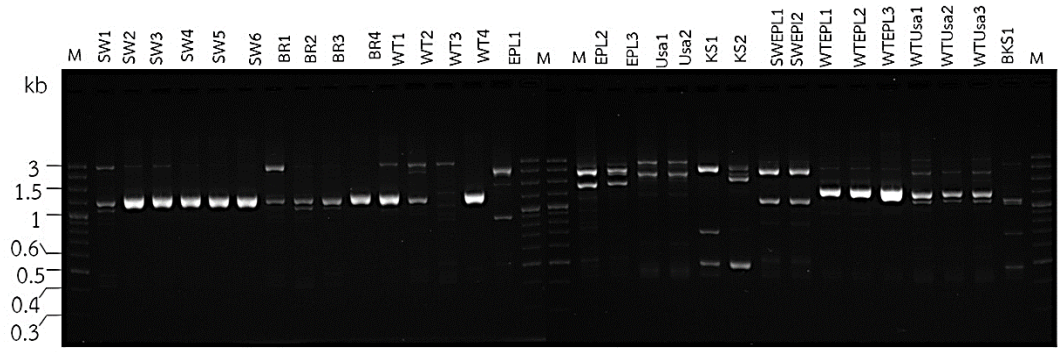
ภาพที่ 31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 816
(A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (B) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกระเจียว (*C. aurantiaca* Van.) พันธุ์ EPL (C) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกระเจียว (*C. aurantiaca* Van.) พันธุ์ Usa (D) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกระเจียวส้ม (*C. roscoeana* wall.) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 817 ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 1,000 - 2,000 คู่เบส (ภาพที่ 32) และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งหมดจำนวน 3 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (ภาพที่ 32A) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบแถบดีเอ็นเอของแม่พันธุ์ปทุมมาขนาด 1,300 คู่เบส ในลูกผสมทุกคู่ คือ BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa สำหรับลูกผสม BKS กับ WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวส้ม และพันธุ์ Usa จึงสามารถสรุปได้ว่า ไพรเมอร์ 817 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อปทุมมา และลูกผสมทุกคู่ผสม นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์พ่อ 2 คู่ผสม คือ BKS กับ WTUsa



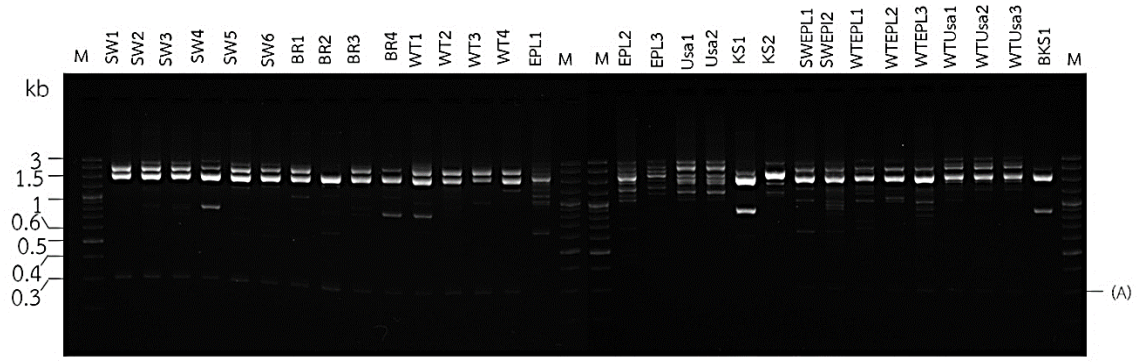
ภาพที่ 32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 817 (A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมาและลูกผสม (*C. alismatifolia* Gagnep) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 818 (ภาพที่ 33) ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 500 - 3,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งหมดจำนวน 3 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ใด เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้คือลูกผสม SWEPL ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ EPL



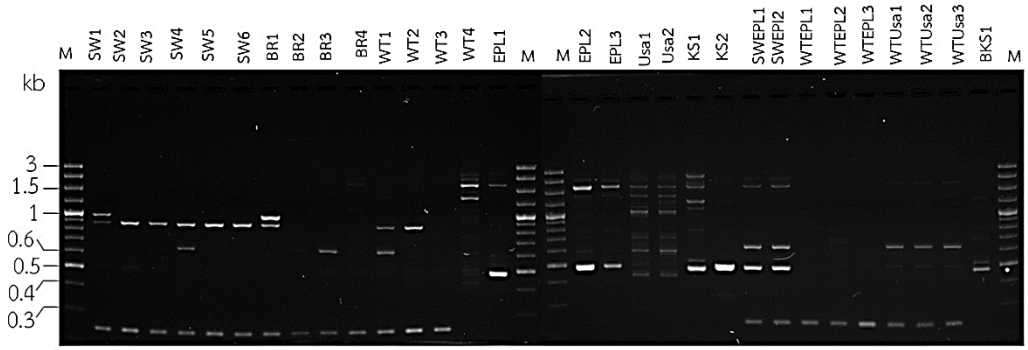
ภาพที่ 33 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 818
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 826 (ภาพที่ 34) ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 500 - 2,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งสิ้น 4 แถบ จากทั้งหมด 5 แถบ คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส จำเพาะต่อปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) (ภาพที่ 34A) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ดังนี้ ลูกผสม BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์แม่ปทุมมา นอกจากนี้ ลูกผสม BKS ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์กระเจียวส้ม และลูกผสม WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ Usa แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ 826 สามารถทำให้เกิดแถบที่จำเพาะต่อปทุมมาและลูกผสม และสามารถตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดได้ 2 คู่ผสม คือ ลูกผสม BKS และ WTUsa



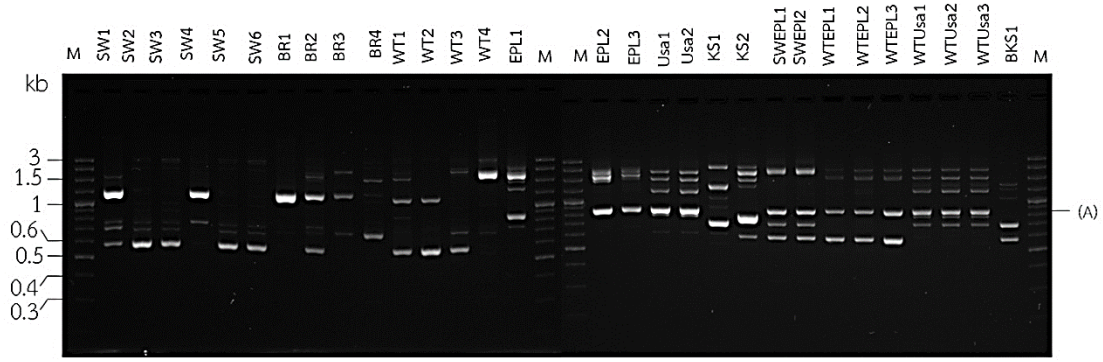
ภาพที่ 34 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 826 (A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมาและลูกผสม (*C. alismatifolia* Gagnep) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 836 (ภาพที่ 35) ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 200 - 2,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งหมดจำนวน 10 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ใด เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้คือลูกผสม SWEPL ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 250 คู่เบส เหมือนพันธุ์แม่ปทุมมาพันธุ์ Snow White (SW) และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 480 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ EPL



ภาพที่ 35 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 836 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder.

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปทุมมา กระเจียว และลูกผสม จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 891 (ภาพที่ 36) ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 500 - 2,000 คู่เบส และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งหมดจำนวน 5 แถบ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส จำเพาะต่อกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van พันธุ์ EPL และพันธุ์ Usa (ภาพที่ 36A) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ดังนี้ ลูกผสม SWEPL, WTEPL และ WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์พ่อกระเจียวพันธุ์ EPL และพันธุ์ Usa และ ลูกผสม WTUsa ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส เหมือนพันธุ์พ่อกระเจียวและพันธุ์ Usa ซึ่งสรุปได้ว่าไพรเมอร์ 891 ทำให้เกิดแถบที่จำเพาะต่อกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van ได้ และสามารถตรวจสอบลูกผสมที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์พ่อได้ 3 คู่ผสม คือ ลูกผสม SWEPL, WTEPL และ WTUsa



ภาพที่ 36 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 891 (A) คือ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van พันธุ์ EPL และพันธุ์ Usa M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp. Plus DNA Ladder

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปทุมมา กระเจียว และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 250 - 3,000 คู่เบส และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปทั้งสิ้น 71 แถบ จากทั้งหมด 72 แถบ (ตารางที่ 10) คิดเป็น 98.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Das et al. (2011) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Curcuma* ที่พบบริเวณตอนเหนือของอินเดียโดยใช้เครื่องหมาย ISSR ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปถึง 98.55 เปอร์เซ็นต์ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์นี้พบว่าไพรเมอร์ 816 ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดถึง 11 แถบ รองลงมา คือ ไพรเมอร์ 808, 836 และ 812 ให้แถบดีเอ็นเอ 10 แถบ (ภาพที่ 40, 36, 44 และ 39 ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่า ไพรเมอร์ 826 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง (monomorphic band) (ภาพที่ 43) เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่าทั้ง10 ไพรเมอร์ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ (ตารางที่ 11) โดยพบว่าลูกผสม BKS ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ Big Red กับกระเจียวพันธุ์กรเจียวส้ม_มีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนพ่อ จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ 808, 809, 811, 816, 817 และ 826 เหมือนแม่ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 812, 817 และ 826 ลูกผสม SWEPL ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow White กับกระเจียวพันธุ์ EPL มีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์พ่อ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ 811, 812, 818, 836 และ 891 เหมือนพันธุ์แม่ จำนวน 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 811, 812, 817, 826 และ 836 ลูกผสม WTEPL ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ White Tung กับกระเจียวพันธุ์ EPL มีมีไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ จำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 811 และ 891 เหมือนพันธุ์แม่ จำนวน 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 811, 812, 816, 817 และ 826 และลูกผสม WTUsa ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ White Tung (WT) กับกระเจียวพันธุ์อุษา มีไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ จำนวน 8 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ 808, 809, 811, 812, 816, 817, 826 และ 891 เหมือนพันธุ์แม่ จำนวน 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 811, 812, 816, 817 และ 816 ซึ่งสามารถใช้บอกการเป็นลูกผสมที่แท้จริงได้

รายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการจำแนกและการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดโดย Anuntalabhochai et al. (2007) ได้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมของปทุมมาด้วยเครื่องหมาย HAT-RAPD และเครื่องหมาย SCAR ซึ่งสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงต่อพืชกลุ่มปทุมมา แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมหากใช้ต้นพ่อเป็นพืชชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ ธีรนิติ (2555) ได้ประยุกต์ใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* และ *Eucurcuma* โดยพบเพียง 1 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถบอกความเป็นลูกผสมได้ 1 คู่ผสม เท่านั้น (คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca*)

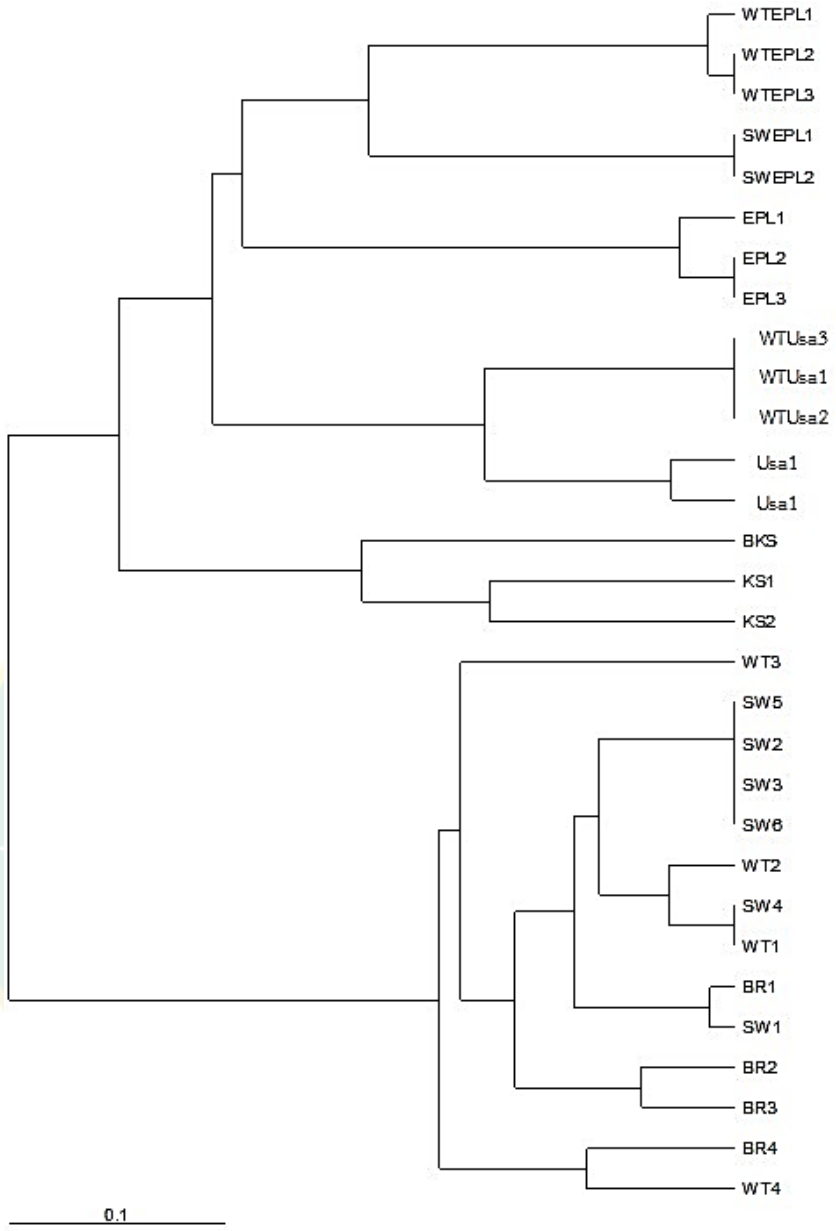
จากทั้งหมด 7 คู่ผสม ในงานวิทยานิพนธ์สามารถประยุกต์ใช้เครื่องหมาย ISSR ในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมทั้งหมด 4 คู่ผสม ซึ่งเป็นคู่ผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*) และพืชกลุ่มกระเจียว (*C. aurantiaca* และ *C. roscoeana*) โดยพบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอของลูกผสมที่เหมือนต้นพ่ออย่างน้อย 4 ไพรเมอร์ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมในพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว และอาจประยุกต์ใช้เครื่องหมายนี้เพื่อตรวจสอบลูกผสมคู่อื่น ๆ ในพืชกลุ่มนี้

ตารางที่ 11 แถบดีเอ็นเอของลูกผสม BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa ที่ปรากฏเหมือนพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในแต่ละไพรเมอร์

ไพรเมอร์	พันธุ์พ่อ/พันธุ์แม่	ขนาด (คู่เบส)			
		BKS	SWEPL	WTEPL	WTUsa
808	พ่อ	350/500/1,500	-	500	500
	แม่	400	400	400	400
809	พ่อ	350/600/1,000	-	350	1,100
	แม่	750	750/250	750	750
811	พ่อ	500/600/1,000	450/900/1,000	480/1,000	450/600/1,000
	แม่	-	1,200	1,200	850
812	พ่อ	-	900	-	450
	แม่	550	550	550	550
816	พ่อ	750	-	-	1,500
	แม่	-	-	850	850
817	พ่อ	2,000	-	-	2,000
	แม่	1,300	1,300	1,300	1,300
818	พ่อ	-	1,700	-	-
	แม่	-	-	-	-
826	พ่อ	1,600	-	-	2,000
	แม่	300	300	300	300
836	พ่อ	-	480	-	-
	แม่	-	250	-	-
891	พ่อ	-	830	830	830/1,200
	แม่	-	-	-	-

4.3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชตัวอย่างที่ศึกษา

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR ด้วยโปรแกรม FREE TREE และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของปทุมมา กระเจียว และลูกผสมได้ ดังแสดงในภาพที่ 38 พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างแต่ละสปีชีส์ออกจากกันได้ และสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มของปทุมมา (C. *alismatifolia* Gagnep.) ทั้งหมด กลุ่ม 2 เป็นกลุ่มของกระเจียว (C. *aurantiaca Van.*และ *C. roscoeana* wall.) และลูกผสม สำหรับกลุ่มที่ 2 สามารถแยกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ 2.1 กลุ่มของสปีชีส์ *C. roscoeana* wall. พันธุ์กระเจียวส้ม (KS) และลูกผสม BKS ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มชัดเจนจาก 2.2 กลุ่มของสปีชีส์ C. *aurantiaca* Van. พันธุ์ EPL และลูกผสม SWEPL, WTEPL และ 2.3 กลุ่มของสปีชีส์ C. *aurantiaca Van.* พันธุ์อุษา (Usa) และลูกผสม WTUsa ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Záveská et al. (2012) ที่ทั้ง 3 สปีชีส์อยู่ต่างกลุ่มกันจากการแบ่งกลุ่มในดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (cpDNA)



ภาพที่ 37 แผนภูมิความสัมพันธ์ของปทุมมา (SW, BR และ WT) กระเจียว (EPL, Usa และ KS) และลูกผสม (BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa) ที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR

เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ของตัวอย่างทั้งหมด พบว่าอยู่ระหว่าง 0.05 - 1.00 (ตารางที่ 12) เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. มีค่าระหว่าง 0.45 - 1.00 ภายในสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. มีค่าระหว่าง 0.92 - 1.00 ภายในสปีชีส์ *C. roscoeana wall*. มีค่า 0.73 จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ค่อนข้างสูง และ *C. alismatifolia* Gagnep. มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษานี้เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมีความห่างกันมากที่สุดใน 3 สปีชีส์นี้ และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่น้อยที่สุดคือ 0.45 แสดงว่าพืชตัวอย่างในสปีชีนี้มีความห่างไกลกันกว่าสปีชีส์อื่น เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน ระหว่างสปีชีส์ของ *C. alismatifolia* Gagnep. กับ *C. aurantiaca* Van. และ *C. alismatifolia* Gagnep. กับ *C. roscoeana* wall. มีค่าระหว่าง 0.04 - 0.21 และ 0.12 - 0.24 ตามลำดับ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง *C. aurantiaca* Van. กับ *C. roscoeana* wall. มีค่าระหว่าง 0.4 - 0.57 จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายนอกสปีชีส์ต่ำกว่าภายในสปีชีส์แสดงว่าคู่ผสมที่นำมาผสมพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม โดยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง *C. alismatifolia* Gagnep. กับ *C. aurantiaca* Van. หรือ *C. roscoeana* wall. มีค่าสูงกว่า *C. aurantiaca* Van. กับ *C. roscoeana* wall. ดังนั้นหากผสมระหว่าง *C. alismatifolia* Gagnep. กับ *C. aurantiaca* Van. หรือ *C. roscoeana* wall. จะให้ลูกที่มีความหลากหลายและอาจมีความแตกต่างจากพ่อแม่มากกว่าลูกผสมระหว่าง *C. aurantiaca* Van. กับ *C. roscoeana* wall. เมื่อเปรียบเทียบแต่ละคู่ผสม ดังนี้ ลูกผสม WTEPL เป็นลูกผสมระหว่าง *C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ White tung (WT) และ *C. aurantiaca* Van. พันธุ์ EPL มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ EPL คือ 0.56 - 0.62 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ White tung (WT) มีค่าระหว่าง 0.50 - 0.54 ลูกผสม SWEPL เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ SW และพันธุ์ EPL มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ EPL คือ 0.55 - 0.56 และมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ SW มีค่าระหว่าง 0.45-0.5 ซึ่งแสดงว่าลูกผสมได้รับดีเอ็นเอมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง ลูกผสม WTUsa เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ WT และพันธุ์ Usa มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ Usa มีค่าระหว่าง 0.74-0.77 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ WT มีค่าระหว่าง 0.36 - 0.46 ลูกผสม BKS เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ BR และพันธุ์ KS มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ KS ระหว่าง 0.55 - 0.71 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์ BR ระหว่าง 0.31 - 0.35 แสดงให้เห็นว่าลูกผสม WTUsa และ BKS มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับพันธุ์แม่มากกว่าพันธุ์พ่อ ในงานวิจัยของ Taheri et al. (2012) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ C. *alismatifolia* Gagnep. พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.40 - 0.58 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. มีค่าระหว่าง 0.45 - 1.00 สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายนอกสปีชีส์ Saha et al. (2016) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Curcuma* พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.40 - 0.78 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ของสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van กับ *C. roscoeana*

wall. ซึ่งเป็นพืชสกุลย่อยเดียวกัน แต่สำหรับพืชต่างสกุลย่อยกันจะมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ห่างไกลกันมาก

ตารางที่ 12 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนปทุมมา (SW, BR และ WT) กระเจียว (EPL, Usa และ KS) และลูกผสม (BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR

	SW1	SW2	SW3	SW4	SW5	SW6	BR1	BR2	BR3	BR4	WT1	WT2	WT3	WT4	EPL1	EPL2	EPL3	Usa1	Usa2	KS1	KS2	SWEPL1	SWEPL2	WTEPL1	WTEPL2	WTEPL3	WTUsa1	WTUsa2	WTUsa3	BKS
SW1																														
SW2	0.9																													
SW3	0.9	1																												
SW4	0.91	0.91	0.91																											
SW5	0.88	0.98	0.98	0.89																										
SW6	0.9	1	1	0.91	0.98																									
BR1	0.95	0.9	0.9	0.86	0.88	0.9																								
BR2	0.84	0.84	0.84	0.84	0.82	0.84	0.79																							
BR3	0.84	0.84	0.84	0.84	0.86	0.84	0.84	0.86																						
BR4	0.84	0.79	0.79	0.84	0.77	0.79	0.84	0.86	0.82																					
WT1	0.91	0.91	0.91	1	0.89	0.91	0.86	0.84	0.84	0.84																				
WT2	0.91	0.86	0.86	0.96	0.89	0.86	0.86	0.8	0.84	0.84	0.96																			
WT3	0.78	0.78	0.78	0.79	0.76	0.78	0.73	0.76	0.81	0.71	0.79	0.79																		
WT4	0.44	0.74	0.74	0.71	0.73	0.74	0.74	0.77	0.77	0.86	0.71	0.71	0.76																	
EPL1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.15	0.05	0.05	0.1	0.21																
EPL2	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.09	0.1	0.14	0.05	0.05	0.1	0.19	0.92															
EPL3	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.1	0.1	0.14	0.05	0.05	0.1	0.19	0.92	1														
Usa1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.12	0.08	0.08	0.12	0.16	0.16	0.08	0.12	0.12	0.2	0.5	0.55	0.55													
Usa2	0.08	0.08	0.08	0.08	0.12	0.08	0.08	0.12	0.16	0.16	0.08	0.12	0.12	0.2	0.45	0.51	0.51	0.96												
KS1	0.13	0.13	0.13	0.12	0.12	0.13	0.13	0.16	0.12	0.2	0.12	0.12	0.12	0.24	0.4	0.51	0.51	0.48	0.48											
KS2	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18	0.19	0.14	0.23	0.18	0.18	0.18	0.18	0.24	0.22	0.46	0.57	0.57	0.57	0.57	0.73										
SWEPL1	0.47	0.47	0.47	0.45	0.5	0.47	0.43	0.42	0.5	0.46	0.44	0.49	0.48	0.46	0.55	0.56	0.56	0.34	0.34	0.37	0.36									
SWEPL2	0.47	0.47	0.47	0.45	0.5	0.47	0.43	0.42	0.5	0.46	0.44	0.49	0.48	0.46	0.55	0.56	0.56	0.34	0.34	0.37	0.36	1								
WTEPL1	0.55	0.55	0.55	0.05	0.54	0.55	0.51	0.54	0.54	0.54	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.61	0.61	0.37	0.38	0.37	0.54	0.73	0.73							
WTEPL2	0.52	0.52	0.52	0.05	0.51	0.52	0.48	0.51	0.51	0.51	0.5	0.5	0.49	0.51	0.57	0.62	0.62	0.38	0.38	0.35	0.51	0.71	0.71	0.98						
WTEPL3	0.52	0.52	0.52	0.05	0.51	0.52	0.48	0.51	0.51	0.51	0.5	0.5	0.49	0.51	0.57	0.62	0.62	0.38	0.38	0.35	0.51	0.71	0.71	0.98	1					
WTUsa1	0.39	0.39	0.39	0.38	0.42	0.39	0.39	0.38	0.46	0.45	0.38	0.41	0.36	0.46	0.42	0.42	0.47	0.77	0.74	0.41	0.45	0.62	0.62	0.62	0.63	0.63				
WTUsa2	0.39	0.39	0.39	0.38	0.42	0.39	0.39	0.38	0.46	0.45	0.38	0.41	0.36	0.46	0.42	0.42	0.47	0.77	0.74	0.41	0.45	0.62	0.62	0.62	0.63	0.63	1			
WTUsa3	0.39	0.39	0.39	0.38	0.42	0.39	0.39	0.38	0.46	0.45	0.38	0.41	0.36	0.46	0.42	0.42	0.47	0.77	0.74	0.41	0.45	0.62	0.62	0.62	0.63	0.63	1	1		
BKS	0.36	0.36	0.36	0.35	0.35	0.36	0.32	0.35	0.31	0.35	0.35	0.35	0.32	0.39	0.26	0.28	0.29	0.32	0.35	0.71	0.55	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52	0.5	0.5	0.5	

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยวิธี GISH ไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้ในทุกๆ คู่ผสม อาจเป็นเพราะ 1) ในขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม ระยะเวลาในการย่อยไซโทพลาสซึมไม่เพียงพอยังเห็นไซโทพลาสซึมอยู่ แต่อย่างไรก็ตามถ้าใช้ระยะเวลาในการย่อยมากกว่านี้จะไม่สามารถมองเห็นโครโมโซมอยู่รวมกันเป็น 1 เซลล์ แต่จะเห็นโครโมโซมกระจายอยู่ทั่วสไลด์ไม่สามารถจำแนกได้ว่าโครโมโซมนั้นมาจากเซลล์ใด วิธีการแก้ไขอาจใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนเพิ่มเติมหลังจากการเตรียมโครโมโซม 2) ในขั้นตอนการทำให้โครโมโซมเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ใช้เวลาในการ denature หรือความเข้มข้นของสาร formamide น้อยเกินไปจึงอาจทำให้โครโมโซมไม่เสียสภาพธรรมชาติ แต่ถ้าใช้เวลาในการ denature หรือความเข้มข้นของสาร formamide มากกว่านี้ จะทำลายโครโมโซมทำให้ไม่สามารถมองเห็นโครโมโซมได้ วิธีการแก้ไขอาจใช้ความเข้มข้นของสาร formamide ที่เหมาะสม หรือใช้เวลาในการ denature มากขึ้น ควบคู่กับการหาสภาวะของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้โครโมโซมเสียสภาพธรรมชาติ 3) ในขั้นตอนการล้างโพรบที่จับกับโครโมโซมแบบไม่จำเพาะเจาะจงออกหลังจากการ hybridization อาจยังไม่พอจึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นสัญญาณการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอโพรบกับโครโมโซมได้ วิธีการแก้ไขอาจใช้ความเข้มงวดของเกลือในการล้างมากขึ้น

จากผลการศึกษาการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยวิธีการนับจำนวนโครโมโซม สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้ 1 คู่ผสม คือ ลูกผสม SWEPL จากการนับจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 10 เซลล์ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 37 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเป็นลูกผสมจริงที่โครโมโซมครึ่งหนึ่งมาจากพ่อกระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. (2n = 42) และอีกครึ่งหนึ่งมาจากแม่ของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. (2n = 32) ส่วนลูกผสมอื่น ได้แก่ WTEPL, WTUsa และ BKS ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ เนื่องจากวิธีการเตรียมโครโมโซมทำให้โครโมโซมไม่กระจายเป็นแท่งเดี่ยว ๆ ลักษณะโครโมโซมยังขดแน่นไม่พอจึงทำให้โครโมโซมซ้อนทับกันจึงไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ และอาจจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาหรือสภาพอากาศในการเก็บตัวอย่างดอกในแต่ละวันที่ไม่เหมาะสมจึงทำให้ได้ระยะการแบ่งเซลล์ที่ไม่เหมาะสม วิธีการแก้ไขอาจจะหาระยะเวลาและสภาพอากาศที่เหมาะสม เช่น วันที่มีแดดออกเพราะแสงแดงจะกระตุ้นให้เกิดระยะการแบ่งเซลล์ได้_หรือหาสภาวะและสารเคมีที่เหมาะสมในการทำ Pretreatmeat เพื่อให้ได้ระยะการแบ่งเซลล์ตามที่ต้องการ และหาวิธีการเตรียมโครโมโซมเพื่อให้ได้โครโมโซมที่กระจาย

จากผลการศึกษาการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดด้วยเครื่องหมาย ISSR สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้ทุกคู่ผสม แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR เหมาะสมในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดในพืชที่ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ และอาจนำเครื่องหมายนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมคู่อื่น ๆ ในพืชกลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ที่ได้จากการศึกษานี้อาจนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรม เพื่อใช้ในการคัดเลือกคู่ผสมในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมาย ISSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ภายในสปีชีส์ได้ อาจต้องใช้ไพรเมอร์มากขึ้น หรือใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นร่วมด้วย

บรรณานุกรม

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. **แก่นเกษตร**, 40, 299-308.

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี. 2549. **เอกสารประกอบการสอน วิชา พส522 การปรับปรุงพันธุ์พืชขั้นสูง 2.** เชียงใหม่: คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ธีรนิติ พวงกฤษ. 2555. **การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม *Eucurcuma* และ *Paracurcuma***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ปราโมทย์ คำนวล. 2543. **การจำแนกพันธุ์ลูกผสมสตรเบอร์รี่ โดยวิธีสัณฐานวิทยา และอิเล็กโทรโฟรีซีส**. เชียงใหม่ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุทศาสตร์การพัฒนางานวิจัยปทุมมา พ.ศ.2559-2563. ม.ป.ป. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiHsK6sz5rVAhVBGpQKHVnJBJIQFgghMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.doa.go.th%2Fhortold%2Fimages%2Fstories%2Fstrategyplanthort%2Fstrategypratumma.doc&usg=AFQjCNGSQzvtGJkwYzNxK_2_8_OQFgmtJlOw (22 มิถุนายน 2560).

ลลิตา คำแท่ง, สุรพล แสนสุข, ปิยะพร แสนสุข และ แก้วสุดารัตน์ ถนนแก้ว. 2557. จำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ขิงในอุทยานแห่งชาติภูแลนคา จังหวัดชัยภูมิ. น. 367-372 **ใน การประชุมวิชาการ มหาสารคามวิจัย**.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2540. **ปทุมมาและกระเจียว (*Curcuma*) ไม้ประดับ**. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2557. การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์. **Thai Journal of Science and Technology**, 3(2), 102-112.

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์. 2547. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

สราวุฒิ สิทธิกุล. 2008. คาริโอไทป์ของพืชในวงศ์ Amaryllidaceae. **Rajabhat Journal of Sciences, Humanities & Social Sciences**, 9(1-2): 1-15.

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

โสระยา ร่วมรังษี. 2558. **สรีรวิทยา ไม้ดอกประเภทหัว**. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อลงกลด แทนออมทอง. 2554. **พันธุศาสตร์เซลล์**. ขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อังคณา เทียนกล่ำ. 2551. **ไม้ดอกประเภทหัว**. กรุงเทพฯ: คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.

Anuntalabhochai, S., Sitthiphrom, S., Thongtaksin, W., Sanguansermsri, M. & Cutler, R. 2007. Hybrid detection and characterization of *Curcuma* spp. using sequence characterized DNA markers. **Scientia horticulturae**, 111(4), 389-393.

Basha, S. & Sujatha, M. 2009. Genetic analysis of Jatropha species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. **Euphytica**, 168(2), 197-214.

Blears, M., De Grandis, S., Lee, H. & Trevors, J. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 21(3), 99-114.

Bradshaw, H., Villar, M., Watson, B., Otto, K., Stewart, S. & Stettler, R. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus. III*. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 89(2-3), 167-178.

Brammer, S. P., Vasconcelos, S., Poersch, L. B., Oliveira, A. R., & Brasileiro-Vidal, A. C. 2013. Genomic in situ hybridization in Triticeae: a methodological approach. In B. R. Anderson (Ed.) **Plant Breeding from Laboratories to fields** (pp. 1-22). online.

Das, A., Kesari, V., Satyanarayana, V. M., Parida, A. & Rangan, L. 2011. Genetic relationship of *Curcuma* species from Northeast India using PCR-based markers. **Molecular biotechnology**, 49(1), 65-76.

Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. & Peter, K. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. **Scientia Horticulturae**, 108(4), 414-422.

Dongre, A. & Parkhi, V. 2005. Identification of cotton hybrid through the combination of PCR based RAPD, ISSR and microsatellite markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 14(1), 53-55.

Gasser, R. B., Hu, M., Chilton, N. B., Campbell, B. E., Jex, A. J., Otranto, D. & Zhu, X. 2006. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. **Nature protocols**, 1(6), 3121.

Goldman, J. 2008. The use of ISSR markers to identify Texas bluegrass interspecific hybrids. **Plant Breeding**, 127(6), 644-646.

Hampl, V., Pavlícek, A. & Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 51(3), 731-735.

Kumar S., (2017) Molecular markers [online] source : https://www.slideshare.net/VikasSingh639/molecular-markers-75788487 (27 September 2019)

Leong-Škorničková, J., Šída, O., Jarolímová, V., Sabu, M., Fér, T., Trávníček, P. & Suda, J. 2007. Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). **Annals of Botany**, 100(3), 505-526.

Liu, L.-Q. & Gu, Z.-J. 2011. Genomic in situ hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae). **Plant Science**, 180(3), 554-559.

Liu, W.-L., Shih, H.-C., Weng, I.-S., Ko, Y.-Z., Tsai, C.-C., Chou, C.-H. & Chiang, Y.-C. 2016. Characterization of genomic inheritance of intergeneric hybrids between *Ascocenda* and *Phalaenopsis* cultivars by GISH, PCR-RFLP and RFLP. **PloS one**, 11(4), e0153512.

Melo, C., Silva, G. & Souza, M. 2015. Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genet Mol Res**, 14(1), 2176-2188.

mahadwala P.(2017) Restriction fragment length polymorphism restriction endonuclease and pcr [online] source : https://www.slideshare.net/pratikmahadwala/rflp-wrt-restriction-enzymes-and-pcr. (27 September 2019)

Nair, N., Selvi, A., Sreenivasan, T., Pushpalatha, K. & Mary, S. 2006. Characterization of intergeneric hybrids of Saccharum using molecular markers. **Genetic resources and crop evolution**, 53(1), 163-169

Olson, M., Hood, L., Cantor, C., & Botstein, D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. **Science**, 245(4925), 1434-1435.

Page, R. D. 1996. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Bioinformatics**, 12(4), 357-358.

Plant molecular biology. 2017. [online] source : https://pmblab.wordpress.com/ (27 September 2019)

Saha, K., Sinha, R. K., Basak, S. & Sinha, S. 2016. ISSR fingerprinting to ascertain the genetic relationship of *Curcuma* sp. of Tripura. **American Journal of Plant Sciences**, 7(02), 259.

Schwarzacher, T. & Heslop-Harrison, P. 2000. Practical in situ hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd.

Scientific, T. F. 2009. Nanodrop 2000/2000c spectrophotometer. V1. 0 **user manual**.

Sims, D. 2006. The lily yearbook of the North American lily society. **Lily Yearbook of the North American Lily Society, Inc.**, 59.

Suwannoi, S., Kanchanaketu, T., Kusolkumbot, P., Sangduen, N. & Hongtrakul, V. 2012. DNA methylation and genetic study of interspecific hybridization in *Jatropha curcas* L. **Genomics and Genetics**, 4(2), 94-105.

Taheri, S., Abdullah, T., Abdullah, N. & Ahmad, Z. 2012. Genetic relationships among five varieties of *Curcuma alismatifolia* (Zingiberaceae) based on ISSR markers. **Genet. Mol. Res**, 11(3), 3069-3076.

Yang, X., Scheffler, B. E. & Weston, L. A. 2006. Recent developments in primer design for DNA polymorphism and mRNA profiling in higher plants. **Plant Methods**, 2(1), 4.

Záveská, E., Fér, T., Šída, O., Krak, K., Marhold, K. & Leong-Škorničková, J. 2012. Phylogeny of *Curcuma* (Zingiberaceae) based on plastid and nuclear sequences: Proposal of the new subgenus Ecomata. **Taxon**, 61(4), 747-763.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสาร

1. การเตรียมบัฟเฟอร์ Hybridization

1.1 เตรียม stock 4X SSCP ประกอบด้วย 4X SSC (เจือจางจาก 20X SSC) และ 0.08 M NaH_2PO_4 จากนั้นปรับ pH 6.5

1.2 เตรียม stock dextran sulphate ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

1.3 เตรียม Formamide ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

1.4 เจือจาง 4X SSCP ให้ได้ 2X SSCP, เจือจาง dextran sulphate ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ dextran sulphate ความเข้มข้น 10เปอร์เซ็นต์, เจือจาง Formamide ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ Formamide ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

2. การเตรียมโคลซิซีน ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

2.1 เตรียม stock โคลซิซีน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งโคลซิซีน 50 mg ละลายในน้ำ 10 ml

2.2 เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ก่อนใช้งาน

3. การเตรียม 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 2 mM

3.1เตรียม stock 8-hydroxyquinoline ความเข้มข้น 10 mM โดยการชั่ง 8-hydroxyquinoline 710 mg ละลายในน้ำ 50 ml

3.2เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า ก่อนใช้งาน

4 การเตรียมสีย้อมจิมซ่า (Giemsa's solution)

4.1 เตรียมสีย้อมจิมซ่า ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยการดูดสี Giemsa's จาก stock giemsa stain มา 5 ml ละลายใน บัฟเฟอร์ 45 ml

5. การเตรียมสีย้อม aceto-orcein

5.1 เตรียม stock solution อุ่นกรดอะซิติกเข้มข้น แล้วใส่ออร์ซีนลงไป 2.2 g ละลายให้เข้ากัน ปล่อยให้เย็น

5.2 เตรียม working solution ทำการเจือจางสารละลายเป็น 45เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำแล้วทำการกรองสีก่อนใช้ทุกครั้ง

ภาคผนวก ข

การให้สัญลักษณ์แถบดีเอ็นเอ

SW1	SW2	SW3	SW4	SW5	SW6	BR1	BR2	BR3	BR4	WT1	WT2	WT3	WT4	EPL1	EPL2	EPL3	USA1	USA2	KS1	KS2	SWF1EPL1	SWF1EPL2	WTF1EPL1	WTF1EPL2	WTF1EPL3	WTUsa1	WTUsa2	WTUsa3	BKS1
ไพรเมอร์ 808																													
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรเมอร์ 809																													
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
ไพรเมอร์ 811																													
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

ไพรเมอร์ 812																														
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรเมอร์ 816																														
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ 817																														
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ไพรเมอร์ 818																														
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
ไพรเมอร์ 826																														
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ไพรเมอร์ 836																														
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
ไพรเมอร์ 891																														
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	

หมายเหตุ : SW คือ ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Snow White

BR คือ ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Big Red

WT คือ ปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep พันธุ์ White Tung

EPL คือ กระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. พันธุ์ EPL

Usa คือ กระเจียวสปีชีส์ *C. aurantiaca* Van. พันธุ์อุษา

KS คือ กระเจียวสปีชีส์ *C. roscoeana* wall. พันธุ์กระเจียวส้ม (KS)

SWEPL คือ ลูกผสมข้ามชนิด SWEPL

WTEPL คือ ลูกผสมข้ามชนิด WTEPL

WTUsa คือ ลูกผสมข้ามชนิด WTUsa

BKS คือ ลูกผสมข้ามชนิด BKS

0 คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

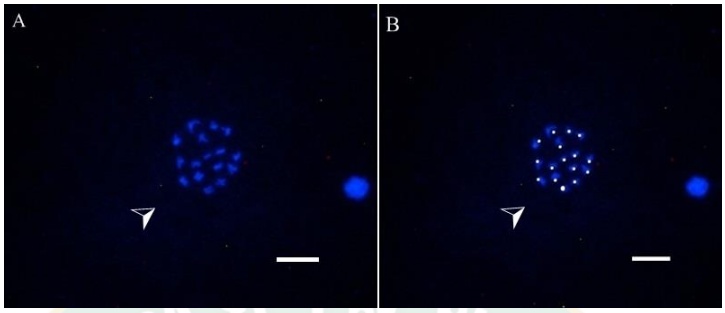
1 คือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

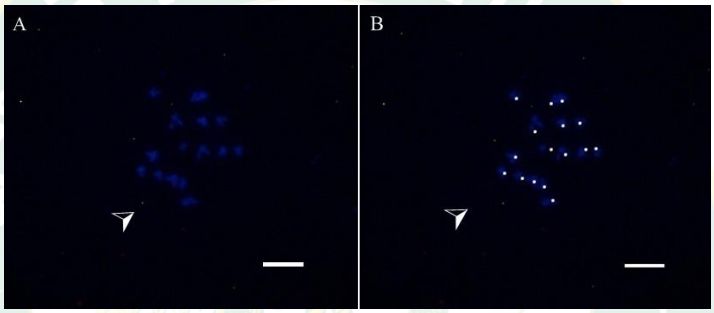
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

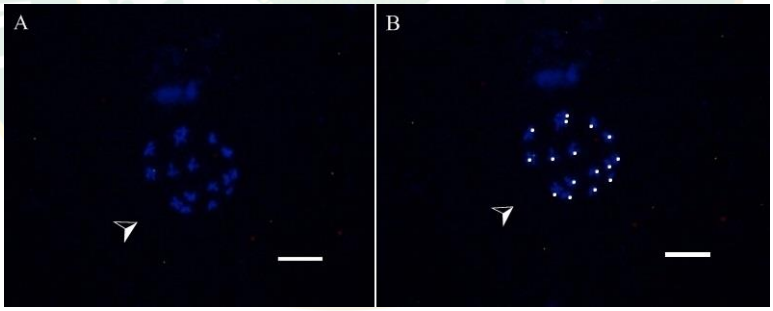
ภาคผนวก ค.

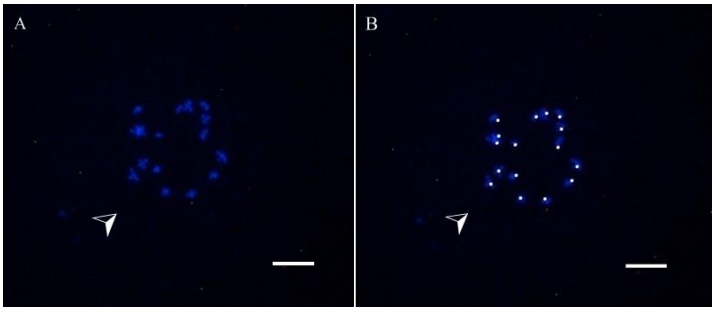
การนับจำนวนโครโมโซม

การนับจำนวนโครโมโซมของปทุมมาสปีชีส์ *C. alismatifolia* Gagnep. (2 = 32)

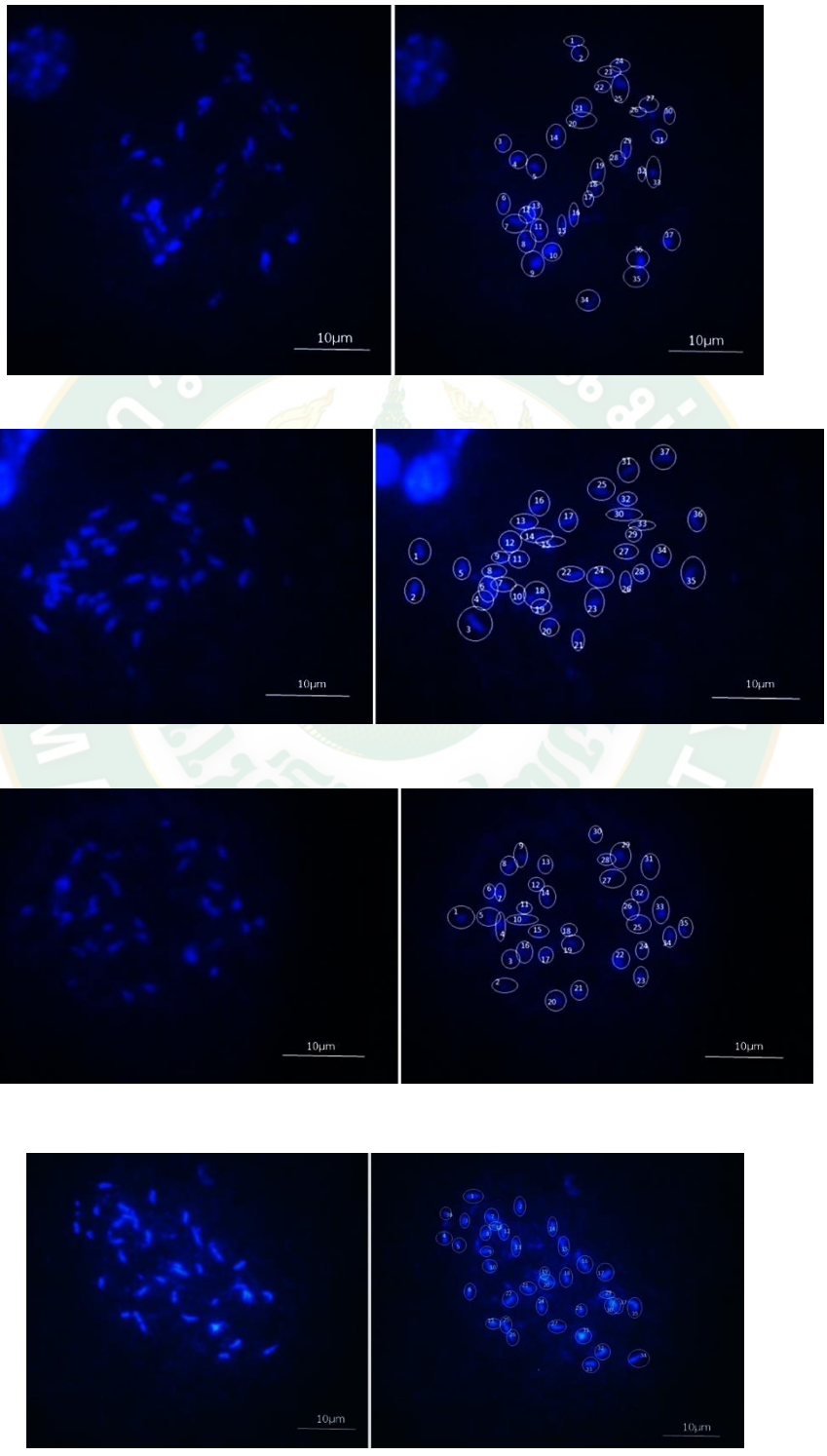








การนับจำนวนโครโมโซมของลูกผสม SWEPL (2n = 37)

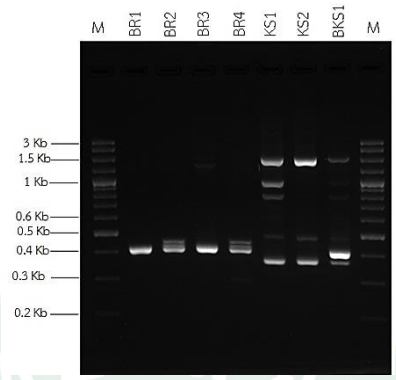


ภาคผนวก ง.

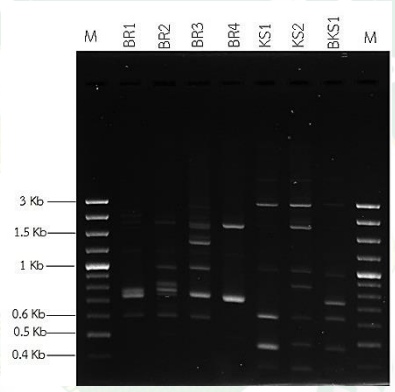
การตรวจสอบลูกผสมโดยเครื่องหมาย ISSR

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด BKS (C. *alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Big red (BR) x *C. roscoeana* wall. พันธุ์กระเจียวส้ม (KS)) โดยใช้ไพรเมอร์808, 809และ 811ตามลำดับ

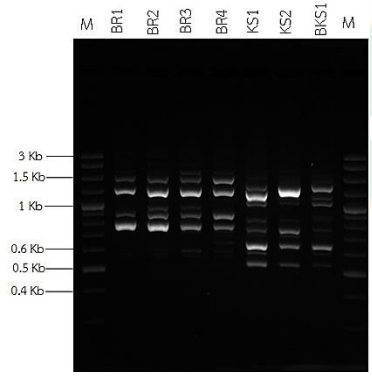
ไพรเมอร์ 808



ไพรเมอร์ 809

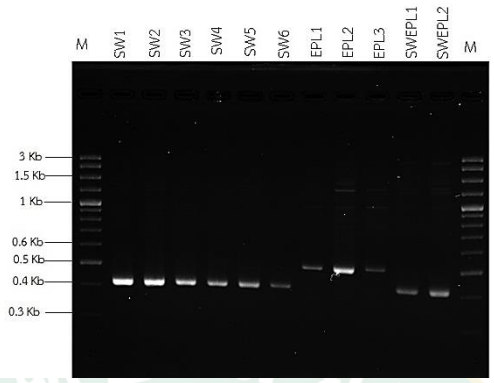


ไพรเมอร์ 811

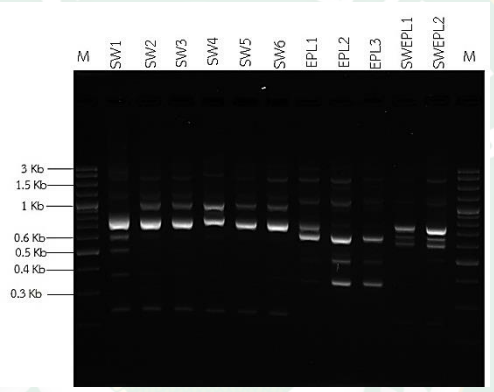


ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด SWEPL (*C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Snow white (SW) x *C. Aurantiaca* Van.พันธุ์ EPL) โดยใช้ไพรเมอร์ 808, 809, 811,812และ 836ตามลำดับ

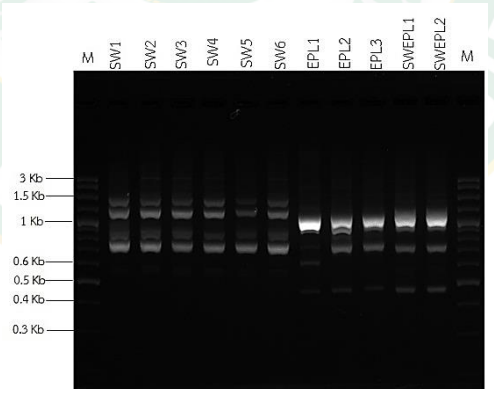
ไพรเมอร์ 808



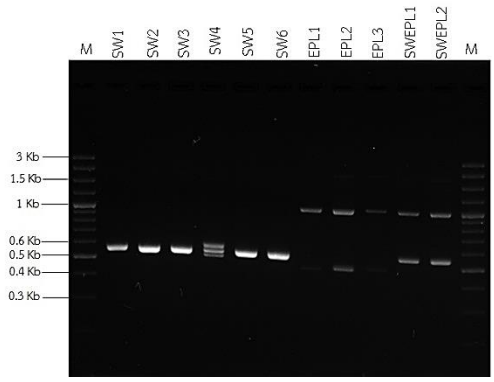
ไพรเมอร์ 809



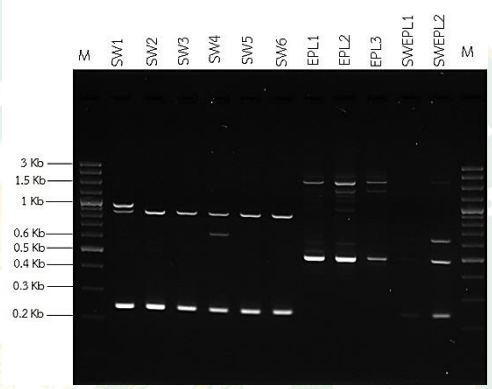
ไพรเมอร์ 811



ไพรเมอร์ 812

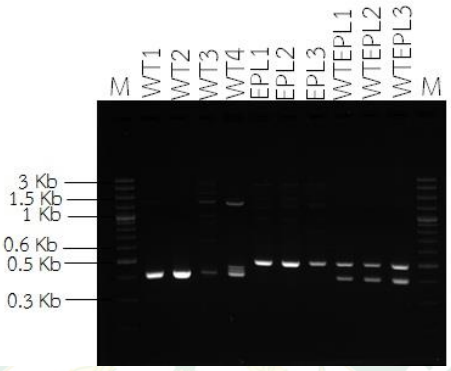


ไพรเมอร์ 836

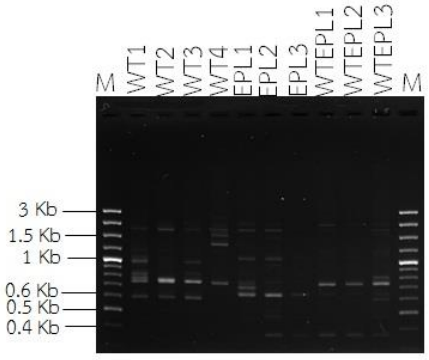


ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด WTEPL (C. *alismatifolia* Gagnep.พันธุ์ White Tung (WT) x C. *aurantiaca* Van.พันธุ์ EPL) โดยใช้ไพรเมอร์ 808, 809, 811และ 891 ตามลำดับ

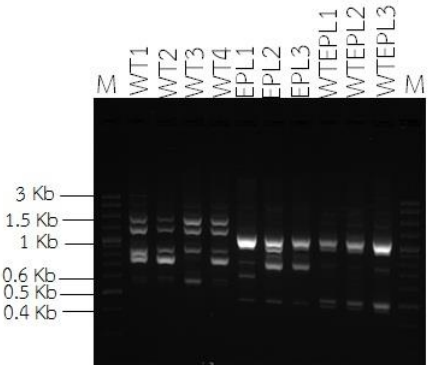
ไพรเมอร์ 808



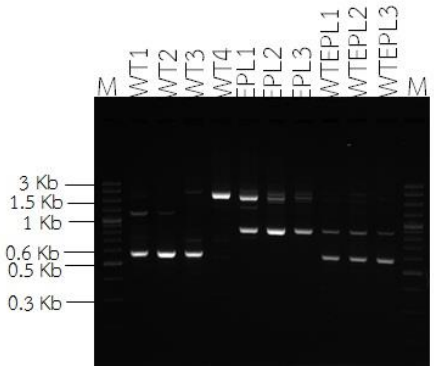
ไพรเมอร์ 809



ไพรเมอร์ 811

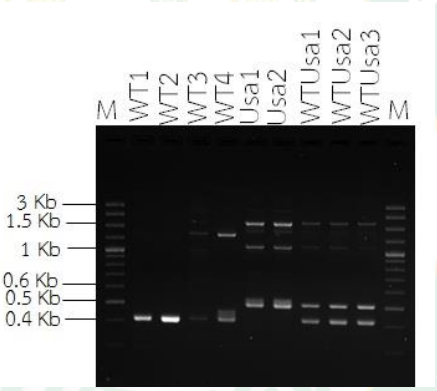


ไพรเมอร์ 891

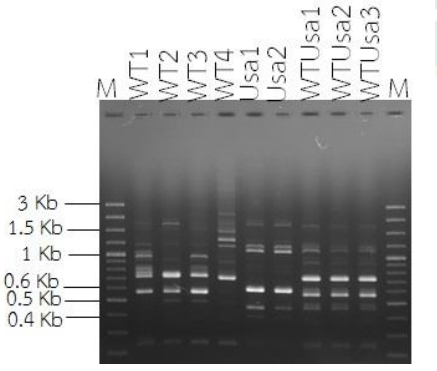


ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิดWTUsa (C. *alismatifolia* Gagnep.พันธุ์ White Tung (WT) x C.*aurantiaca* Van.พันธุ์อุษา (Usa)) โดยใช้ไพรเมอร์ 808, 809และ 811 ตามลำดับ

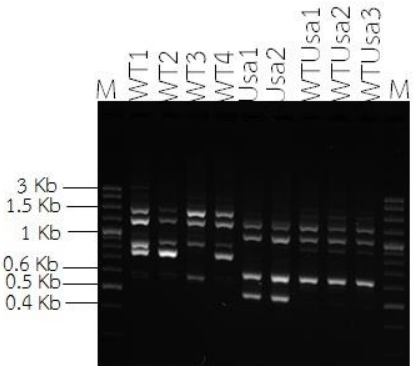
ไพรเมอร์ 808



ไพรเมอร์ 809



ไพรเมอร์ 811


M
WT1
WT2
WT3
WT4
Usa1
Usa2
WTUsa1
WTUsa2
WTUsa3
M
3 Kb
1.5 Kb
1 Kb
0.6 Kb
0.5 Kb
0.4 Kb

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นาย สถาพร สุขจิตร

เกิดเมื่อ 6 กันยายน พ.ศ. 2536

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2555-2558 ปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาเกษตรเคมี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2549-2554 มัธยมศึกษาตอนต้น-ปลาย โรงเรียนท่าตะโกพิทยาคม จังหวัดนครสวรรค์

ประวัติการทำงาน 2019 Thai Journal of Science and Technology - Research Article : Application of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers for Verification of Interspecific Hybrids between Paracurcuma and Eucurcuma

2017 National Genetics Conference – Poster presented : Interspecific hybrid detection of siam tulip and its relatives using chromosome counting