รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

โครงการวิจัย : การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

กิจกรรม : การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

ชื่อการทดลอง :

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

The Use of Molecular Markers to Assess the Genetic Diversity of Waxy Corn for Plants Breeding.

ประสาน สืบสุข[1] กุหลาบ คงทอง[1] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[1]
จีราพร แก่นทรัพย์[1] กิตติภพ วายุภาพ[2]
กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว 186 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ที่เลือกใช้ทั้งหมด 24 คู่ ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 228 ตำแหน่ง ไพรเมอร์ต่างชนิดกันทำให้เกิดแบถดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งอาจมีความเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แต่ละไพรเมอร์มีโอกาสที่จะพบค่าความหลากหลาย (PIC) ตั้งแต่ 0.52-0.91 ผลการวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของข้าวโพดทั้งหมด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 1.00 ผลของการวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA แล้วเขียนแผนภูมิ Dendrogram ด้วยวิธีการของ SAHN ทำให้การจัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 5 กลุ่ม ความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวโพดด้วยผลของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จึงเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด และเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพด

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ 85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

[2/] สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

Abstract

The use of molecular markers to assess the genetic diversity of 186 waxy corn accessions. A total of 24 SSR primer pairs were applied in this study can detected a total of 228 polymorphic alleles. The polymorphism information contents (PIC) for SSR primer varied from 0.52-0.91. In this study showed a genetic similarity coefficient in the range of 0.70 to 1.00 among all accessions. By SM similarity coefficient method and UPGMA cluster analysis, the dendrogram generated from the SAHN clustering could be separated into five groups. The different genotype based on SSR markers could be advantaged to the waxy corn breeding programs and genetic identity of the variety for reference variety checking.

คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays ceratina*) จัดเป็นข้าวโพดฝักสดที่ได้รับความนิยมบริโภคในหลายประเทศของภาคพื้นเอเชีย ลักษณะเมล็ดมีสีขุ่นทึบแสง แป้งในเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวจัดเป็นแป้งอ่อน (soft starch) มีลักษณะเมล็ดที่เหนียวนุ่ม (Nuffer *et.al*., 1968 and Crookston, 1979) เนื่องจากมีปริมาณ amylopectin สูง นอกจากนี้ยังมี water soluble polysaccharides สูงทำให้น่ารับประทาน ในประเทศไทยข้าวโพดข้าวเหนียว รวมถึงข้าวโพดเทียน ส่วนใหญ่ปลูกเพื่อการบริโภคฝักสดภายในประเทศเท่านั้น มีการปลูกทั่วไปทุกภาคของประเทศ นอกจากนี้ประเทศไทยได้เริ่มส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไปจำหน่ายที่ประเทศเวียดนาม และมีการทดสอบพันธุ์ใหม่ๆ ในประเทศจีน (http://pikul.lib.ku.ac.th) ความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืชอยู่ที่การมีเชื้อพันธุกรรมที่หลากหลาย เชื้อพันธุกรรมข้าวโพด ในปัจจุบันมี 2 กลุ่มคือ 1) เชื้อพันธุกรรมที่เป็นพันธุ์พื้นเมือง โดยประเทศจีน พม่า ไทย และเวียดนาม เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ที่สำคัญของข้าวโพดฝักสด โดยเฉพาะข้าวโพดเทียน และข้าวโพดข้าวเหนียว ที่มีความหลากหลายทั้งขนาดฝัก รูปทรงฝัก สีเมล็ด และจำนวนแถวของเมล็ดในฝัก เช่น ข้าวโพดเทียนฝักเล็ก สีขาว สีเหลือง สีดำ ข้าวโพดข้าวเหนียวแปดแถว ข้าวโพดข้าวเหนียวรูปทรงดอกบัว เป็นต้น และ 2)เชื้อพันธุกรรมกลุ่มพันธุ์การค้าของประเทศต่างๆ ที่พัฒนาจากพันธุ์พื้นเมืองให้มีลักษณะดีตามความต้องการของผู้บริโภคและผู้ปลูก จากความหลากหลายของเชื้อพันธุ์ดังกล่าว หากนำมาสร้างพันธุ์ใหม่จะได้พันธุ์ดีตามลักษณะที่ต้องการ ช่วยสร้างทางเลือกใหม่สำหรับผู้ปลูก โรงงานแปรรูป และผู้บริโภค รวมทั้งเป็นการสร้างโอกาสด้านการตลาดเพิ่มขึ้น เชื้อพันธุกรรมเป็นหัวใจสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะต่าง ๆ ตามต้องการ จึงต้องมีการจัดการเชื้อพันธุกรรม ได้แก่ การจัดหาและเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรม การประเมินลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อพันธุกรรมที่เก็บรวบรวม เช่น ความต้านทานต่อโรคต่าง ๆ ข้อมูลเหล่านี้ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์คัดเลือกเชื้อพันธุกรรม เพื่อนำไปปรับปรุงหรือผสมกับสายพันธุ์อื่นๆ เพื่อถ่ายทอดลักษณะที่ดีต่อไป (http://library.stks.or.th)

การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของเชื้อพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวที่รวบรวมไว้ ส่วนใหญ่เป็นการประเมินจากลักษณะทางฟีโนไทป์ รวมถึงลักษณะทางการเกษตรต่าง ๆ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาและพื้นที่ในการศึกษา แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวในระดับดีเอ็นเอ ทำให้การใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุกรรมได้ไม่เต็มที่มากนัก นอกจากนี้การจำแนกด้วยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจให้ข้อมูลที่อาจไม่ถูกต้อง เพราะลักษณะบางอย่างแยกจากกันได้ยาก บางลักษณะอาจจะเป็นผลจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่แตกต่างกัน การประเมินลักษณะประจำพันธุ์ที่ถูกต้องจะส่งผลดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งงานปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งนอกจากต้องมีการบ่งบอกพันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์ที่ถูกต้องแม่นยำแล้ว ยังต้องมีข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอีกด้วย เพื่อการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม การนำความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอมาใช้เป็นข้อมูลประกอบหรือสนับสนุนข้อมูลลักษณะภายนอก จึงทำให้การจำแนกพันธุ์มีความแม่นยำ รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถระบุความใกล้ชิดทงพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะ ซึ่งลักษณะภายนอกไม่สามารถแยกได้ทั้งหมด การหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีที่ตอบสนองความต้องการดังกล่าวได้เป็นอย่างดี สามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันลักษณะจำเพาะของพันธุ์ต่าง ๆ ได้ รวมทั้งเป็นฐานข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช

ในปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลในระดับดีเอ็นเอเพื่อสร้างเอกลักษณ์เฉพาะประจำพันธุ์พืชหลายชนิด สำหรับใช้ตรวจสอบข้อมูลพันธุกรรม และสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมสำหรับพันธุ์ของตนไว้เพื่อเป็นฐานข้อมูลอ้างอิง และจดทะเบียนพันธุ์เพื่อเป็นตัวยืนยันเมื่อมีการตรวจสายพันธุ์ (ศุจิรัตน์ และคณะ 2552)

SSR (Simple Sequence Repeta) หรือ Microsatellite เป็นเบสชิ้นสั้นจำนวน1-6 เบส ที่กระจายอยู่จำนวนมากในสายดีเอ็นเอ จากการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงพบส่วนที่เป็น microsatellite มีทั้งส่วนของลำดับดีเอ็นเอที่มีการถอดรหัส และไม่มีการถอดรหัส โดยความถี่ของการเกิด microsatellite ที่มีรูปแบบต่างๆ สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ที่นำไปใช้กันอย่างกว้างขวางในการวิจัยทางพันธุศาสตร์ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การสร้างแผนที่ยีน การติดตามยีน และการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ในข้าวโพดจะพบลำดับซ้ำของเบส (GT)n และ (AG)n ในปริมาณที่มาก (10^4-10^5 ชุดซ้ำ) Microsatellite ได้มีการพัฒนาและนำมาใช้สร้างแผนที่ยีนในธัญพืชหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) (Liu *et al*., 1996) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) (Senior *et al*., 1996) ข้าว (*Oryza sativa* L.) (McCouch *et al*., 1997; Temnykh *et al*., 1999), ข้าวสาลีที่มีโครโมโซม 6 ชุด (*Triticum aestivum* L.) (Roder *et al*., 1998) ซึ่งแผนที่ยีนเหล่านี้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางการเกษตร นอกจากนี้ microsatellite ได้นำไปใช้ตรวจสอบระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถเพิ่มความน่าเชื่อถือในการบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ได้ ตัวอย่างการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมในพืช เช่น ข้าว (Cho *et al*., 2000) ข้าวโพด (Kantety *et al*., 1995, Chin *et al*., 1996, วันชัย และคณะ 2554, ประสาน และคณะ 2554) ข้าวบาร์เลย์ (Russell *et al*., 1997) ข้าวสาลี (Eujayl *et al*., 2001) งา (ปูชากร, 2549) ไผ่ป่า (รังสัน และสุจิตรา 2548)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สำหรับใช้ประกอบการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างใบและเมล็ดของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาจากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จ.ชัยนาท ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เชื้อพันธุกรรมข้าวโพดจำนวน 186 พันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
1	ซันคาไลน์ อยุธยา	DOACN01
2	ข้าวเหนียวอยุธยา	DOACN02

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
3	ข้าวเหนียว 8 แถว สิงห์บุรี	DOACN03
4	ซันคาไลน์ สิงห์หบุรี	DOACN04
5	ข้าวเหนียวนครปฐม	DOACN05
6	ตะไล้ก้านยาวอ่างทอง	DOACN06
7	ตะไล้อ่างทอง	DOACN07
8	ข้าวเหนียวอ่างทอง	DOACN08
9	ข้าวเหนียวสวน	DOACN09
10	ตะไล้ก้านยาว ลพบุรี	DOACN10
11	ข้าวเหนียวลพบุรี	DOACN11
12	ข้าวเหนียวลพบุรี	DOACN12
13	ข้าวเหนียวลพบุรี	DOACN13
14	ข้าวเหนียวนครสวรรค์	DOACN14
15	ข้าวเหนียวนครสวรรค์	DOACN15
16	คราบงูนครสวรรค์	DOACN16
17	อีโล้น อุทัยเธานี	DOACN17
18	กสิกรหลัก 6ปธุมธานี	DOACN18
19	ตะไล้#26	DOACN19
20	เกษตรขาว	DOACN20
21	PHILIPPINES GLUTIMOUS SYN #20	DOACN21
22	GLUTINOUS DMR COMP.	DOACN22
23	GLUTINOUS DMR COMP.POP #41B	DOACN23
24	GLUTINOUS DMR COMP.POP #41C	DOACN24
25	GLUTINOUS SYN #22	DOACN25
26	GLUTINOUS SYN #(ฟิลิปปินส์)	DOACN26
27	LOS BANOS	DOACN27
28	MACAPUNO ฟิลิปปินส์	DOACN28
29	NO-33	DOACN29

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
30	NO-34	DOACN30
31	NO-35	DOACN31
32	NO-36	DOACN32
33	NO-37	DOACN33
34	NO-38	DOACN34
35	NO-39	DOACN35
36	NO-41	DOACN36
37	NO-42	DOACN37
38	NO-43	DOACN38
39	NO-44	DOACN39
40	NO-45	DOACN40
41	NO-46	DOACN41
42	NO-47	DOACN42
43	NO-48	DOACN43
44	NO-49	DOACN44
45	NO-50	DOACN45
46	NO-51	DOACN46
47	NO-52	DOACN47
48	NO-53	DOACN48
49	NO-56	DOACN49
50	ข้าวเหนียวหัวจุก อ. ท่าบ่อ จ. หนองคาย	DOACN50
51	ข้าวโพดเหนียวหัวจุก อ. ท่าบ่อ จ. หนองคาย	DOACN51
52	ข้าวโพดเหนียวบ้านท่าแพง จ.อุดรธานี	DOACN52
53	ข้าวโพดเทียน(ข้าวโพดน้อย) จ.ขอนแก่น	DOACN53
54	ข้าวเหนียวขาว จ. พิษนุโลก	DOACN54
55	ข้าวเหนียว จ. ชัยนาท	DOACN55
56	ข้าวเหนียวพระราชทาน	DOACN56

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
57	ข้าวเหนียว จ. เชียงราย	DOACN57
58	สำลี 8 แถว	DOACN58
59	สำลี อ.สวรรคบุรี จ. ชัยนาท	DOACN59
60	เทียนเหลือง จ.นครสวรรค์	DOACN60
61	NO -1	DOACN61
62	NO -2	DOACN62
63	NO -3	DOACN63
64	NO -4	DOACN64
65	NO -5 (ขาว)	DOACN65
66	NO -5 (เหลือง)	DOACN66
67	NO -5 (ม่วง)	DOACN67
68	NO - 6	DOACN68
69	NO - 7	DOACN69
70	NO - 8	DOACN70
71	NO - 9	DOACN71
72	NO - 11	DOACN72
73	NO - 12	DOACN73
74	NO - 14	DOACN74
75	NO -15	DOACN75
76	NO -16	DOACN76
77	NO -17	DOACN77
78	NO -19	DOACN78
79	NO -21	DOACN79
80	NO -22	DOACN80
81	NO -23	DOACN81
82	NO -24	DOACN82
83	NO -25	DOACN83

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
84	NO -27	DOACN84
85	NO -29	DOACN85
86	NO - 30	DOACN86
87	NO -31	DOACN87
88	ข้าวโพดเทียน พันธุ์นิปิคบางกล้า จ. ฉะเชิงเทรา	DOACN88
89	NO NAME	DOACN89
90	ข้าวโพดเทียนเชียงตุง	DOACN90
91	CNTY DMR	DOACN92
92	ST)-1-1-1-30-B-B-B	4001
93	ST)-2-B-2-42-B-B-B	4003
94	ST)-8-1-B-22-1-B-B	4007
95	ST(g))-1-1-1-30-B-1-B	4019
96	ST(g))-2-B-1-2-47-1-1-B-B	4023
97	ST(g))-4-1-50-B-B-B	4025
98	M80-1(tg)-B	4036
99	STM)-1-3-18-1-1-B	4037
100	STM)-2-4-19-1-B	4038
101	STM)-4-2-21-1-B	4039
102	SJ)-1-4-39-B-B-B	4042
103	SJ)-4-1-42-B-B-B	4043
104	SJ)-4-2-42-B-1-B	4044
105	SL)-1-44-B-1	4054
106	SL)-1-44-B-2	4055
107	SL)-1-44-B-B(y)	4060
108	CNK(s)-2-1-16-B-B-B	4061
109	CNK(s)-3-1-1-1-1-B-B	4062
110	CNK(s)-5-1-B-1-B-B	4063

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
111	CNW80-4-1-3-B-B	4118
112	CNW09(s)-2-1-B-B	4124
113	CNW09(s)-10-B-1-B	4130
114	M80-1-B-B-B	4185
115	M80-2-B-1-B	4186
116	M80-3-B-B-B	4191
117	LB50(s)-1-B-B(w)	4197
118	WALB(s)-1-5-1-1-B(v)	4201
119	WALB (s)-2-3-B-B	4207
120	WALB(s)-2-14-B-B(w)	4216
121	WALB(s)-2-22-B-B-4(V)	4234
122	WALB(s)-2-31-1-B-1(y)	4246
123	LBWX09(s)-50-1-B-1-B(w)	4250
124	LBWX09(s)-50-1-B-2-B-B(w)	4254
125	LBWX09(s)-50-1-B-3-B-B(v)	4256
126	LBWX09(s)-50-1-B-4-B-B(v)	4259
127	LBWX09(s)-50-1-B-B-B(Y)	4265
128	EWS4780-4-B-B-B(v)	4266
129	EWS4780-5-B-B-B(w)	4267
130	EWS4780-6-B-1(v)	4268
131	EWS4780-9-B-1-B(v)	4275
132	EWS4780-9-B-1-B(w)	4276
133	KRWI045(s)-B-43-B-B-B	4281
134	KRWI047(s)-B-1-B	4282
135	KRWI007721-2(s)-B-37-1	4283
136	TK8)-B-50-B-1-B	4284
137	TK8)-B-50-B-2-B	4285

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
138	MP)-1-B-B-B	4288
139	MP)-1-B-2-B	4289
140	TNG/H3)-1-B-1(b)	4310
141	TNG/H3)-1-B-4(y)	4315
142	TNG/H3)-6-1-B(b)	4318
143	TNG/H3)-B-B-B(w)	4323
144	TNG/H3)-25-B-B(b)	4336
145	NGL)-B-B-B(v)	4353
146	NGL)-B-B-B(w)	4355
147	NGL)-B-1-B-B	4357
148	TTCN)-3-B-B	4363
149	TTCN)-4-B-1(v)	4364
150	TTCN)-4-B-B(w)	4366
151	KJ)-B-B-B(b)	4386
152	KB)-4-8-B-35-B-B	4388
153	KA54)-1-B(w)	4389
154	KA54)-1-B(y)	4390
155	KA54)-1-B(v)	4391
156	KA54)-B-B(Y)	4399
157	KCM)-B-B-B	4400
158	KCM)-B-B-B	4401
159	KL54)-B-1(V)	4402
160	KL54)-B-B(W)	4406
161	KL54)-B-B(v)(W)	4410
162	KL54)-B-B(v)	4412
163	KL54)-B(V)(w)	4413
164	KL54)-B-B(V)(v)	4414

ลำดับที่	ชื่อเชื้อพันธุ์ข้าวโพด	สัญลักษณ์
165	PK(v))-1(V)	4420
166	PK(v))-2(w)	4422
167	PK(v))-3(w)	4424
168	tT)-1-1-B(v)	4454
169	tT)-1-1-B(y)	4455
170	tG54)-1-1-B(y)	4456
171	tG54)-1-2-B(y)	4457
172	tG54)-1-3-B(y)	4458
173	tG54)-1-4-B(y)	4459
174	tG54)-1-6-B-B(y)	4460
175	tAY54)-1-B(y)	4461
176	tAY54)-2-B(y)	4462
177	tAY54)-2-B(w)	4463
178	tAY54)-3-B(w)	4464
179	tAY54)-3-B(y)	4465
180	tSU) P'เบียร์	4466
181	Agwx20(w))-B-44-B	4467
182	ST)-36-1-B-2-101-1-38-B-B	4470
183	WPB)-80-5-1-1-53-B-1-B	4471
184	tAT	4472
185	LB50)-1	4475
186	M80)-1	4479

2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
3. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (BioDrop)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน
5. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation
6. ชุดน้ำยาสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล

7. ชุดโปรแกรมสำหรับจัดวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม NTSYSpc 2.2
8. ไพรเมอร์ SSR ที่พัฒนาจากข้าวโพด (http://www.maizegdb.org/)
9. สารเคมี และเครื่องมือพื้นฐานต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพด

นำใบข้าวโพดพันธุ์ต่างๆ จำนวน 186 พันธุ์ ตามที่แสดงในตารางที่ 1 พันธุ์ละ 10 ต้น มาบดรวมกันด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด นำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยแยกด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้น้ำยา BioDrop แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ (ตารางที่ 1) ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 24 คู่ (รายละเอียดชื่อและลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 2) ทำการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยมีส่วนประกอบด้วยดังต่อไปนี้

1. 10X PCR Buffer	2	ไมโครลิตร
2. 10 mM dNTP	0.4	ไมโครลิตร
3. 50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
4. 2 μM Forward Primer	1	ไมโครลิตร
5. 5 μM Reverse Primer	1	ไมโครลิตร
6. 5 μM Flourescent Label Primer	1	ไมโครลิตร
7. ดีเอ็นเอต้นแบบ	2	ไมโครลิตร
8. 5 U/μl Platinum *Taq* DNA Polymerase	0.2	ไมโครลิตร
9. เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ	20	ไมโครลิตร

(Forward Primer ใช้ไพรเมอร์ชนิดที่เติมเบสทางด้านปลาย 5’ จำนวน 20 เบส เพื่อการตรวจสอบดด้วยสารเรืองแสง FAM, HEX, TAMRA, ROX)

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที } 35 รอบ
72 °C 2 นาที

72 °C 10 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

3. การตรวจหาความแตกต่างขนาดชิ้นดีเอ็นเอแบบละเอียด

นำส่งตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณได้ในข้อ 2 ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งเป็นการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอแบบละเอียดโดยวิธี electrophoresis แบบ capillary จากนั้นนำรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ในแต่ละพันธุ์ ไปแปลงข้อมูลให้เป็นตัวเลข โดยเลย 1 (มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ) และเลข 0 (ไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ) จากนั้นวิเคราะห์หาจำนวนอัลลีล และคำนวณค่าความถี่ของแต่ละรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ และหาค่า Polymorphic Information Contents ($PICs=1-\sum p^2$) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงโอกาสที่จะพบความหลากหลาย (Polymorphism) ว่ามีมากเท่าไร โดย p คือค่าความถี่ของแต่ละรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (นฤมล และคณะ, 2547)

4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว

นำรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวโพด จำนวน 186 สายพันธุ์ ที่ได้จากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 24 คู่ ที่ได้แปลงข้อมูลให้เป็นเลข 1 และ 0 ไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้ชุดโปรแกรม NTSYSpc 2.2 เพื่อหาสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity coefficient) แล้วสร้างแผนภูมิเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้ Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average (UPGMA) เพื่อจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวโพดที่แตกต่างกันทางพันธุกรรม

เวลาและสถานที่

- ระยะเวลาดำเนินการทดลอง 2 ปี (ตุลาคม พ.ศ. 2555 – กันยายน พ.ศ.2557)
- สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 แสดงเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้าวโพด

No.	Name	Forward primer	Reverse primer
1	bnlg161	GCTTTCGTCATACACACACATTCA	ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT
2	bnlg125	GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG	GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
3	bnlg572	ACTGGACTGTCCTCGTGCCTA	CAAAAAAAGATTCGTTCGGAGTAA
4	bmc1655	ATTAAAATCTTGCTGATGGCG	TTCTGTTCCCGCCTGTACTT
5	bnlg238	TATTGCTTTCGTCATACACACACATTCAT	GAGCATGAGCTTGCATATTTCTTGTGG
6	nc004	TGCGAAGAAGCAGTAGCAAA	TGGAGGTAGAAGACGCACG
7	umc1726	GATGAGGAAGAAAAGGGAAAAGGA	AGACTCAACCCTAACCCTAATGGG
8	phi027	CACAGCACGTTGCGGATTTCTCT	GCGTACGTACGACGAAGACAC
9	umc2028	ACGAGTCACGAATCCGGATAGA	GATTGTCGTCATGCTTCCTTCTCT
10	umc1776	AAGGCTCGTGGCATACCTGTAGT	GCTGTACGTACGGGTGCAATG
11	umc1535	GGCAGAGAGATGAAAAAGAATGGA	CAAGGCACCCACACACATACATA
12	phi034	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	GGGGAGCACGCCTTCGTTCT
13	umc1207	GGTGAAGGAGAAGGCGGAGTAT	CACTGGATCACCACACCAACAT
14	umc1185	AGTAAAAGAGGCAAGGACTACGGC	GCGGCGATATATACGAGGTTGT
15	umc1065	ACAAGGCCATCATGAAGAGCAGTA	CACGGTCTGGCACACTAACCTTAT
16	phi041	TTGGCTCCCAGCGCCGCAAA	GATCCAGAGCGATTTGACGGCA
17	umc1003	AATAGATTGAATAAGACGTTGCCC	TGTTCCAATGCTTTTGTACCTCTA
18	umc2101	CCCGGCTAGAGCTATAAAGCAAGT	CTAGCTAGTTTGGTGCGTGGTGAT
19	umc2106	TTAGTTCTTGCGAATGCCAACATA	CTTGCTTGGGTTGTACGTTGTTC
20	phi053	CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC	AACCCAACGTACTCCGGCAG
21	umc1088	TCATCCTCCTAGCTCCTCTACTCG	AAAACAGTCAGCAGAACCCACTTT
22	umc1008	TCTAGCTTGTGGTGGTGGTTGA	ACATGAGCACAAAGACTGACGC
23	umc1389	AAAACACAACGCTGGACATCAAC	GGTCGTTTTGCTTAGCCCATTTTA
24	phi057	CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT	CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 24 คู่ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 24 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพด การใช้ไพรเมอร์ต่างชนิดกันทำให้เกิดแบถดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในข้าวโพด 186 พันธุ์ บางพันธุ์อาจมีความเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ

(polymorphism) ได้แถบดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดความแตกต่างขึ้นทั้งหมด 228 ตำแหน่ง (polymorphism alleles) ของข้าวโพดจำนวน 186 พันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นต่อไพรเมอร์มีตั้งแต่ 3 ถึง 21 แถบ (alleles) ไพรเมอร์แต่ละชนิดให้แถบดีเอ็นเอจำนวนต่าง ๆ คือ

1. ปรากฏดีเอ็นเอ 21 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg161
2. ปรากฏดีเอ็นเอ 17 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ phi053
3. ปรากฏดีเอ็นเอ 16 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1065
4. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 15 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1088
5. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 14 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg125
6. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 13 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg238, umc1207, umc1003, umc2101
7. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 9 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ nc004, umc2028, phi041
8. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 8 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ phi027, umc2106
9. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 7 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bnlg572, umc1008
10. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1776, phi034, umc1185
11. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ bmc1655
12. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc 1726
13. ปรากฏดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ได้แก่ไพรเมอร์ umc1535, umc1389, phi057

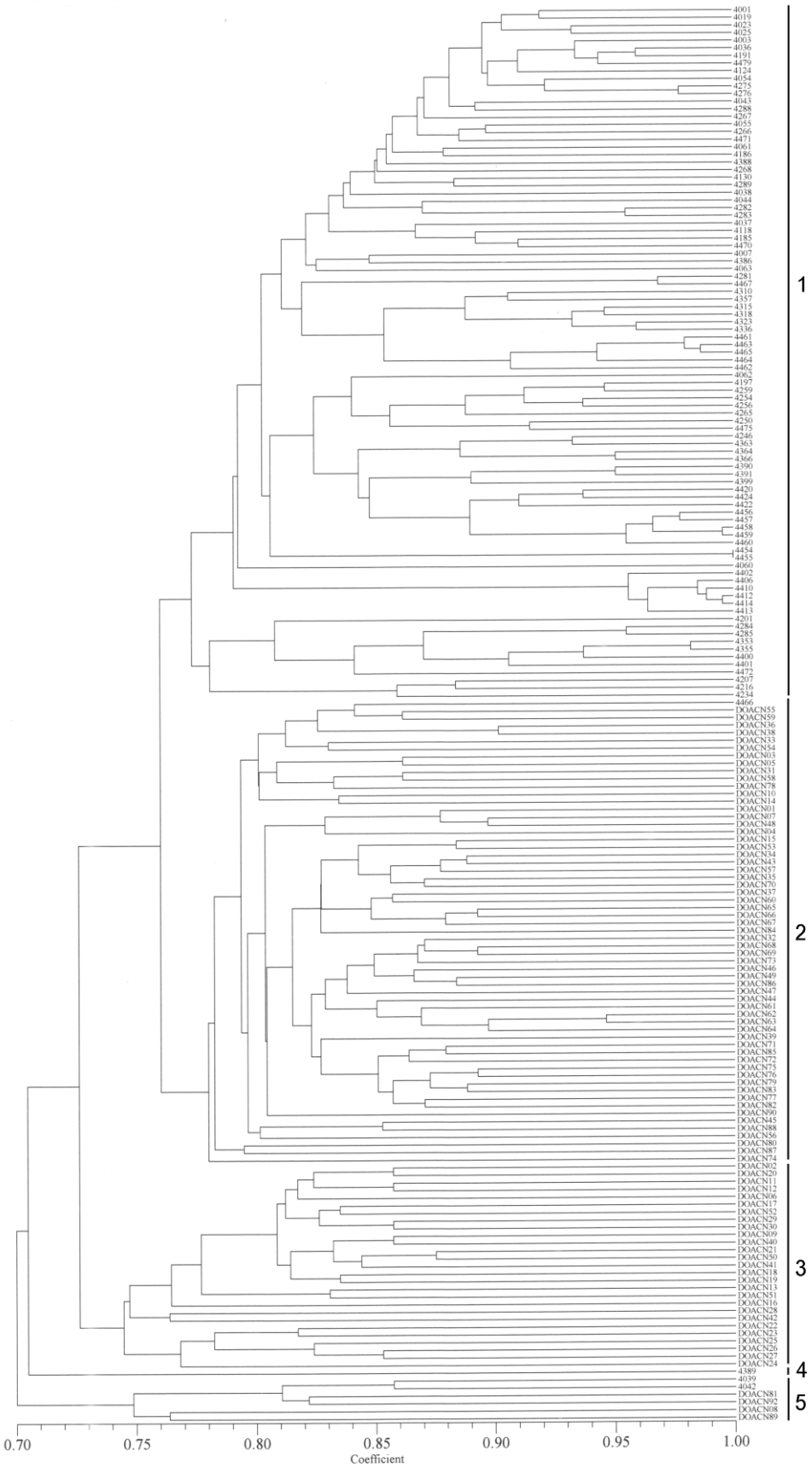
การปรากฏจำนวนอัลลีลหรือแถบดีเอ็นเอในการทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบกับสายพันธุ์ข้าวโพด 186 ตัวอย่าง เมื่อใช้ไพรเมอร์ bnlg161 ทำให้มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลสูงสุด 21 อัลลีล และการใช้ไพรเมอร์ umc1535 มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลเพียง 3 อัลลีล แต่ผลจาการทดลองของ ประสาน และคณะ 2554 ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 26 พันธุ์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ bnlg161 และ umc1535 มีโอกาสในการตรวจพบจำนวนอัลลีลเพียง 6 อัลลีล และ 2 อัลลีล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการปรากฏจำนวนอัลลีลของแต่ละไพรเมอร์นั้นขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่าง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ทำการศึกษา ถ้าหากใช้จำนวนตัวอย่างมาก โอกาสที่จะตรวจพบอัลลีลทั้งหมดของประชากรก็จะเป็นไปได้สูงด้วย

จากการคำนวณค่าความถี่ของการเกิดรูปแบบแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์หาค่า PIC ในแต่ละไพรเมอร์ ซึ่งคำนวณจากจำนวนของแถบดีเอ็นเอ (alleles) ที่พบในข้าวโพดจำนวน 186 สายพันธุ์ พบว่าค่า PIC มีตั้งแต่ต่ำสุดคือ 0.52 และสูงสุดคือ 0.91 โดยค่า PIC นี้เป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะพบความหลากหลาย (Polymorphism) ว่ามีมากเท่าไร ซึ่งค่า PIC จะมีค่าสูงสุดได้ เท่ากับ 1 จากไพรเมอร์ที่ได้ศึกษาทั้งหมด 24 คู่ พบว่าไพรเมอร์ bnlg161 และ umc1065 ให้ค่า PIC สูงที่สุดคือ เท่ากับ 0.91 รองลงมาคือ bnlg125, bnlg238 และ umc1088 มีค่า PICs เท่ากับ 0.87, 0.86 และ 0.85 ตามลำดับ สำหรับไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC น้อยกว่านี้ ได้แสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 โดยไพรเมอร์ที่ให้ค่า PIC สูงนั้นถือว่าเป็นไพรเมอร์ให้ความหลากหลายของรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่สูงในประชากรที่ศึกษา ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์อื่นๆ

จากการนำรูปแบบการปรากฏแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ จำนวน 24 คู่ ที่เกิดขึ้นในข้าวโพดพันธุ์ต่างๆ จำนวน 186 สายพันธุ์ ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.2 ด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดได้ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของข้าวโพดทั้ง 186 สายพันธุ์ ดูได้จากค่า Similarity coefficient ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 1.00 แสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR สามารถบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ดี พบว่าข้าวโพดบางพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก เช่น 4454 [tT)-1-1-B-V] กับ 4455 [tT)-1-1-B-Y] เป็นต้น ส่วนพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ได้แก่ 4001 [ST)-1-1-1-30-B-B-B] กับ DOACN89[NO NAME] มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม 0.70

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ค่า Similarity coefficient ที่ระดับ 0.76 นั้นพบว่าสามารถแยกได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ (ภาพที่ 1)

1. กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 91 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่อยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์
2. กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 61 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งปลูกต่างๆ
3. กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 27 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งปลูกต่างๆ
4. กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 1 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่อยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์
5. กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยข้าวโพดจำนวน 4 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของข้าวโพดที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งปลูกต่างๆจำนวน 4 สายพันธุ์ และข้าวโพดที่อยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ จำนวน 2 สายพันธุ์



ภาพที่ 1 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพด 186 สายพันธุ์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว 186 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ที่เลือกใช้ทั้งหมด 24 คู่ ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 228 ตำแหน่ง แต่ละไพรเมอร์มีโอกาสที่จะพบค่าความหลากหลาย (PIC) ตั้งแต่ 0.52-0.91 มีค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 1.00 สามารถจัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้เป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด และเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพดในโอกาสต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ และใช้เป็นข้อมูลเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ข้าวโพด

คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบ และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ประสาน สืบสุข ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ กุหลาบ คงทอง กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และพิเชษฐ์ กรุดลอยมา. 2554. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดทนแล้ง. หน้า 454-459. ใน: การประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35 วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554. ณโรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ.

ปูชากร ภูวเกตานนท์. 2549. การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ PCR based เพื่อจาแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของงา (*Sesamum indicum* Linn.). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต. สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

รังสัน หล้าพรหม และ สุจิตรา จางตระกูล. 2548. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไผ่บางชนิดในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และไมโครแซทเทลไลท์. หน้า 352-367. ใน: รายงานการประชุม ความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ และสัตว์ป่า “ความก้าวหน้าของผลงานวิจัย และกิจกรรมปี 2548” ณ โรงแรมรีเจ้นท์ ชะอำ เพชรบุรี วันที่ 21-24 สิงหาคม 2548.

วันชัย เย็นเพชร ธานี ศรีวงศ์ชัย มณฑิกานธิ์ สงบจิต ศานนท์ สุขสถาน สรรเสริญ จำปาทอง และชบา จำปาทอง. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR. หน้า 70-76. ใน: การประชุมวิชาการ

ข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35 วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554. ณโรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วีรเดช โขนสันเทียะ รัชนี ขันธหัตถ์ เพียงเพ็ญ ศรวัต ประพิศ วองเทียม ศุภชัย สารกาญจน์ และ อัจฉรา ลิ่มศิลา. 2552. ฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังไทยพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์ต่างประเทศ. หน้า16-30. ใน: ผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Chin, E.C.L., Senior, M.L., Shu, H. and Smith, J.S.C. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. Genome 39: 866–873.

Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L.,McCouch, S.R., Park, W.D., Ayer, N. and Cartinhour, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa*). Theor. Appl. Genet. 100: 713–722.

Eujayl, I., Sorrells, M.E., Baum, M., Wolters, P. and Powell, W. 2001. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs. Theor. Appl. Genet. 9: 597-602.

Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L. and Zehr, BE. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol. Breed. 1: 365–373.

Liu, Z.W., Biyashev, R.M. and Maroof, M.A.S. 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theor. Appl. Genet. 93: 869–876.

McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T. and Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Mol. Biol. 35: 89–99.

Roder, M.S., Korzun, V., Wandehake, K., Planschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. and Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics 149: 2007–2023.

Russell, J., Fuller, J., Young, G., Tomas, B., Taramino, G., Macaulay, M., Waugh, R. and Powell, W. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. Genome 40: 442–450.

Senior, M.L., Chin, E.C.L., Lee, M. and Smith, J.S.C. 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize found in the GenBank database: map construction. Crop Sci. 36: 1676–1683.

Temnykh, S., Park, W.D., Ayers, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T. and McCouch, S.R. 1999. Mapping and genome organization of microsatellites in rice (*Oryza sativa* Theor. Appl. Genet. 100: 698–712.

ภาคผนวก

ตารางที่ 3 แสดงค่า PIC จำนวนอัลลีล ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอและความถี่ของแต่ละอัลลีล ของแต่ละไพรเมอร์ ที่ตรวจสอบกับข้าวโพด 186 สายพันธุ์

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
bnlg161	0.91	1	140	2.12
		2	149	11.25
		3	154	6.58
		4	157	0.64
		5	160	13.38
		6	169	0.64
		7	172	0.85
		8	178	16.56
		9	180	2.34
		10	184	0.64
		11	186	3.82
		12	188	2.97
		13	190	5.52
		14	192	10.83
		15	194	5.52
		16	196	5.10
		17	198	0.64
		18	200	0.64
		19	206	0.21
		20	241	7.22
		21	243	2.55
bnlg125	0.87	1	333	1.26
		2	339	2.02
		3	341	13.10
		4	343	8.56
		5	345	3.78
		6	373	1.26
		7	377	6.30
		8	393	24.94
		9	397	1.26
		10	405	3.27
		11	409	3.53
		12	413	15.87

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		13	423	3.27
		14	430	11.59
bnlg572	0.78	1	112	25.56
		2	120	2.56
		3	122	6.71
		4	124	27.48
		5	126	23.64
		6	128	2.88
		7	130	11.18
bmc1655	0.700	1	131	5.56
		2	132	43.33
		3	140	5.19
		4	160	20.37
		5	162	25.56
bnlg238	0.86	1	141	2.20
		2	150	12.31
		3	155	6.59
		4	161	15.60
		5	170	1.10
		6	174	0.66
		7	179-180	17.36
		8	181.9	2.20
		9	187	8.57
		10	193	19.56
		11	197	12.09
		12	200	0.88
		13	242	0.88
nc004	0.74	1	159	22.12
		2	161	19.63
		3	165	2.18
		4	167	40.50
		5	174	5.30
		6	178	3.74
		7	187	0.31
		8	191	1.56
		9	198	4.67
umc1726	0.10	1	128	0.53

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		2	129	2.13
		3	131	96.28
		4	133	1.06
phi027	0.71	1	159	2.19
		2	161	1.88
		3	164	42.50
		4	167	5.63
		5	169	20.00
		6	174	0.31
		7	178	26.25
		8	184	1.25
umc2028	0.61	1	105	7.14
		2	106	26.40
		3	108	0.62
		4	128	55.90
		5	130	0.62
		6	135	1.86
		7	137	1.86
		8	142	4.66
		9	145	0.93
umc1776	0.66	1	154	47.45
		2	156	3.82
		3	159	14.33
		4	160	30.89
		5	162	2.87
		6	164	0.64
umc1535	0.52	1	180	33.46
		2	184	5.95
		3	192	60.59
phi034	0.70	1	143	19.07
		2	153	2.45
		3	156	1.36
		4	158	4.63
		5	161	35.15
		6	164	37.33
umc1207	0.81	1	140	2.85
		2	149	30.20

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		3	153	0.85
		4	156	22.79
		5	158	17.09
		6	160	5.98
		7	166	1.99
		8	172	2.28
		9	175	1.14
		10	177	7.98
		11	179	2.56
		12	181	1.42
		13	184	2.85
umc1185	0.74	1	129	33.33
		2	134	0.29
		3	141	27.73
		4	142	23.60
		5	144	4.72
		6	147	10.32
umc1065	0.91	1	150	16.77
		2	153	4.55
		3	154	0.16
		4	156	6.27
		5	158	2.04
		6	161	4.55
		7	164	1.41
		8	167	4.86
		9	170	6.58
		10	173	4.23
		11	176	8.62
		12	178	10.34
		13	181	7.21
		14	184	14.42
		15	187	5.17
		16	189	2.82
phi041	0.70	1	217	5.54
		2	220	50.16
		3	221	6.51
		4	222	12.38

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		5	224	11.07
		6	225	2.93
		7	226	0.65
		8	230	1.30
		9	236	9.45
umc1003	0.820	1	129	0.97
		2	131	0.97
		3	133	16.18
		4	135	0.24
		5	137	6.04
		6	139	0.97
		7	142	26.09
		8	146	10.39
		9	148	0.48
		10	150	21.50
		11	152	0.24
		12	154	15.70
		13	155	0.24
umc2101	0.821	1	156	0.92
		2	158	27.42
		3	159	2.07
		4	162	0.46
		5	163	19.82
		6	164	0.46
		7	165	2.53
		8	167	12.67
		9	169	1.38
		10	171	20.28
		11	172	5.99
		12	182	4.84
		13	183	1.15
umc2106	0.66	1	87	1.33
		2	89	53.16
		3	95	4.32
		4	97	10.30
		5	99	14.62
		6	101	15.61

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		7	103	0.33
		8	149	0.33
phi053	0.81	1	158	9.02
		2	163	1.50
		3	165	0.25
		4	167	1.00
		5	168	0.75
		6	171	1.50
		7	172	0.50
		8	189	29.82
		9	191	0.50
		10	194	1.00
		11	196	10.03
		12	202	13.03
		13	206	0.50
		14	210	4.26
		15	213	24.31
		16	230	1.50
		17	302	0.50
umc1088	0.85	1	184	0.63
		2	190	9.49
		3	194	10.44
		4	200	12.34
		5	204	30.38
		6	210	1.27
		7	218	4.11
		8	224	4.43
		9	234	6.65
		10	240	3.48
		11	250	12.97
		12	256	1.58
		13	260	1.27
		14	270	0.63
		15	274	0.32
umc1008	0.71	1	173	10.05
		2	175	39.95
		3	176	7.47

ชื่อไพรเมอร์	ค่า PIC	อัลลีล	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ความถี่ของอัลลีล (%)
		4	178	2.58
		5	187	33.76
		6	189	4.38
		7	196	1.80
umc1389	0.60	1	163.7-164	31.56
		2	167	52.82
		3	168.04-169	15.61
phi057	0.45	1	175	70.72
		2	178	19.77
		3	184	9.51