รหัสโครงการ SUT3-304-43-24-33

รายงานการวิจัย

การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไผ่ตง

The study of *Dendrocalamus asper* Genetic map

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต - คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี งบประมาณ พ.ศ. 2543

และ พ.ศ. 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgements)

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2543 - 2544 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.เรณู ขำเลิศ ดร.อัศจรรย์ สุขธำรง ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลและตัวอย่าง และขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด ที่ได้ช่วยส่งเสริมให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

(Abstract)

ไผ่ตงเขียว,ไผ่ตงดำ และไผ่รวก จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีถูกนำมาทดสอบเพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โมเลกุลบ่งชี้ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD; Random Amplification Polymorphic DNA) และเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) จากการทดลองพบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวน 161 ชิ้นด้วยเทคนิค อาร์เอพีดี มีจำนวน 121 ที่แสดงความแตกต่าง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ NTSYS V2.1 เพื่อจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์โดยโปรแกรม UPGMA พบว่า ไผ่ถูกจัดเป็น 17 กลุ่มที่ต่างกันจาก 18 ตัวอย่าง และมีสายพันธ์ที่เหมือนกันอยู่หนึ่งตัวอย่าง

จากนั้น ได้ทดสอบการใช้เทคนิคดังกล่าวกับไผ่ที่มีลักษณะดีทางเศรษฐกิจ (รสหวาน หน่อใหญ่ และหน่อดก) พบว่าเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถใช้บอกความสัมพันธ์ของพันธ์ต่างๆได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีทดสอบกับไผ่ชนิดเดียวกันที่ทดสอบด้วยอาร์เอพีดี และมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเป็น 25 กลุ่มตัวอย่าง และอีก 2 ตัวอย่างที่ไม่ใช่ไผ่ตงเขียวนั่นคือ ไผ่ตงดำ (*D. asper* Tong Daum)และไผ่รวก (*Thyrosostachys siamensis*) โดยทดสอบด้วยไพร์เมอร์ 64 คู่ พบว่า 12 คู่ ที่ให้ผลดีที่สุดและนำผลดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชนิดเดียวกันกับอาร์เอพีดี พบว่าหลังจากรวมข้อมูลจากการทำพีซีอาร์แล้ว สามารถแยกความสัมพันธ์ของไผ่ได้ทุกสายพันธ์ แต่ไผ่แต่ละสายพันธ์ค่อนข้างมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม และท้ายสุดไผ่ที่ไม่รู้สายพันธ์มาก่อนถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีด้วย

จุดประสงค์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น พบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ของไผ่ที่ไม่ทราบสายพันธ์มาก่อนเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่เคยอ้างอิงมาแล้ว ดังนั้นเทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โมเลกุลบ่งชี้และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอื่นๆต่อไปได้

Abstract

Dendrocalamus asper were tested using Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) by short arbitary oligonucleotide primer and Amplification Fragment Length Plolymorphism (AFLP) method with the objective of fingerprinting, identifying and grouping.Twenty-three of the fifty primers from Operon kit AE, L and Swere tested in initial screening experiment with eighteen genotypes of *D. asper*. Of the 161 amplified bands, 121 were polymorphic. Cluster analysis base on NTSYS V.2.1 program using UPCMA grouped shows 17 distinct groups and similar in 1 group. Five specimen with good character (good taste, large shoots, and high of shoot) of *D. asper* were also tested by the RAPD method separately from the 18 samples. The five lines are significantly distinct from each other. Due to the limitation of the RAPD technique the AFLP method was also use for identify and group these plants. All of the *D. asper* specimen from SUT farm were tested (A11, A13, A15, A22, A25, A27, A37, A32, A34, A41, A42, A51, SUT7, SUT23, SUT25, SUT28, SUT33, SUT35, BC. KN, SA, 5AS1 and S85 along with 2 out groups (*D. asper* Tong Daum and *Thyrosostachys siamensis)*. Out of 64 primers screened and 12 primers pairs were used in the analysis. The AFLP data were also analyzed by NTSYS program similar to RAPD. The AFLP information shows that all the specimen were in 23 distinct groups and 2 out groups were also separated from the other. Therefore, RAPD and AFLP can be used together in marker identification and genetic relationship of *D. asper*.

สารบัญเรื่อง

(Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	33
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	36
หนังสืออ้างอิง	37
ประวัติผู้วิจัย	38
ประวัติผู้ร่วมวิจัย	39

สารบัญตาราง

(List of Table)

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ RAPD	18
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนไพรเมอร์ ลำดับ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ที่สังเกตุได้และขนาดของดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี AFLP	24-25

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ตงเขียว	6
รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่ตง 18 สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RAPD	18
รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์เพียงชุดเดียว	20
รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงแต่ละสายพันธุ์ โดยการรวมข้อมูลจากไพรเมอร์ที่แสดงในตารางที่ 1	21
รูปที่ 5 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของไผ่ตงลักษณะดี 5 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAE07	22
รูปที่ 6 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของไผ่ลักษณะดี 5 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPL01	22
รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียว 5 สายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ 20 เพียงชุดเดียว	23
รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียว 5 สายพันธุ์ดี โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ 15 ชุด	23
รูปที่ 9 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปรียบเทียบผลอันเก่าและอันใหม่โดยใช้ไพรเมอร์ OPAE 01	24
รูปที่ 10 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เปรียบเทียบผลอันเก่าและอันใหม่โดยใช้ไพรเมอร์ OPL 20	24
รูปที่ 10a แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่ตงเขียว 23 สายพันธุ์จากฟาร์ม มทส. และ 2 สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ไผ่ตงเขียว โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 8 จากตารางที่ 2	27
รูปที่ 10b แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่ตงเขียว 23 สายพันธุ์จากฟาร์ม มทส. และ 2 สายพันธุ์ที่ไม่ใช้ตงเขียว โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 8 จากตารางที่ 2	28
รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธุ์ของไผ่ตงแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์เพียงคู่เดียว คือ คู่ที่ 8 จากตารางที่ 2	29
รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ทุกคู่ที่แสดงในตารางที่ 2	30
รูปที่ 13 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเทียบกับ A11 โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 11 และ 12 จากตารางที่ 2	31

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพ **หน้า**

รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับพันธุ์ A11 โดยวิธีการ AFLP 32

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไผ่นับเป็นพืชที่ขึ้นง่าย โตเร็ว ตายยาก และขยายพันธุ์ได้ง่ายมาก ไผ่มีคุณค่ามากมาย เรียกได้ว่า เป็นพืชอเนกประสงค์ใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน ตั้งแต่หน่อ ลำต้น ใบ ดอก และผลไผ่ มีคุณค่ามหาศาลให้ประโยชน์ทั้งทางตรง และทางอ้อมนานัปการ นอกจากจะสามารถให้หน่อสำหรับเป็นอาหารแล้ว ไผ่เจริญเติบโตเร็วมาก บางชนิดโตถึง 120 เซนติเมตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

ไม้ไผ่เป็นพืชตระกูลหญ้าที่รับใช้มนุษยชาติมาแต่โบราณกาล ให้ประโยชน์กับมนุษย์หลายประการ ทั้งในด้านอุปโภคและบริโภค ใช้สร้างที่พักอาศัย ทำเครื่องมือเครื่องใช้ทำยารักษาโรค และใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม อีกนานับประการ สามารถเรียกได้ว่าเป็นไม้อเนกประสงค์ เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญยิ่ง ตั้งแต่ในระดับหมู่บ้านจนถึงระดับชาวโลก เพราะมนุษย์เราได้ใช้ประโยชน์ไม้ไผ่ในปัจจัยสี่ ซึ่งความสำคัญต่อการมีชีวิตอยู่ในโลก คือที่อยู่อาศัย เครื่องนุ่งห่ม อาหารและยารักษาโรค แต่การเอาใจใส่ในเรื่องของไม้ไผ่นับว่าน้อยมาก ทั้งการค้นคว้า การใช้ประโยชน์ การปรับปรุงพันธุ์ การขยายพันธุ์ ประเทศที่ได้เอาใจใส่ไม้ไผ่มากเด่นชัดกว่าประเทศอื่นเห็นจะเป็นประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่นที่มีการสนับสนุนให้มีการค้นคว้าวิจัย ปรับปรุงพันธุ์ ขยายพันธุ์ ปรับปรุงพัฒนาการใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง (สุทัศน์, 2544)

สำหรับประเทศไทย ประชาชนก็ใช้ไม้ไผ่ในชีวิตประจำวันมาช้านานแล้ว และนับวันจะใช้มากขึ้นทุกที โดยเฉพาะงานหัตถกรรมจักสาน ซึ่งเป็นอาชีพรองของคนไทยมาช้านาน แม้กระทั่งทุกวันนี้บ้านตามชนบทยังนิยมจักสานกันอยู่ทั่วไป ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีไผ่อยู่มากมายหลายชนิด แต่พันธุ์ที่สำคัญและเป็นที่นิยมในการบริโภคหน่อมากทั้งภายในประเทศและยังสามารถส่งเป็นสินค้าออกนำเงินตราเข้าประเทศได้ปีละหลายร้อยล้านบาทได้แก่ ไผ่ตง *(Dendrocalamus asper)* (สมปอง, 2544)

ในช่วงปี พ.ศ. 2539-2540 ไผ่ตงจากแหล่งปราจีนบุรีได้ออกดอกและตายเป็นจำนวนมากมีผลกระทบต่อเกษตรกรผู้ปลูกไผ่ตงเป็นอาชีพอย่างรุนแรง หลายคนเชื่อว่าเป็นเพราะความแห้งแล้งในช่วงปี พ.ศ. 2538-2540 แต่อีกกลุ่มหนึ่งยังเชื่อว่าไผ่ตงเป็นไผ่ชนิด Gregarious flowering คือ ออกดอกทุกๆ 80-100 ปี และจะตายเนื่องจากวงจรการออกดอก (Cusack, 1999) กรมส่งเสริมการเกษตรจึงนำต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ด (จาก Gregarious flowering cycle) แจก

จ่ายแก่เกษตรกรต้นกล้าเหล่านั้นได้มาจากเมล็ดที่ไม่ได้มีการคัดเลือกลักษณะที่ดีทาง มหาวิทยาลัยจึงมอบหมายให้นักวิจัย ดร.เรณู ขำเลิศ และ ดร.อัศจรรย์ สุขธำรง (1998) นำเมล็ดไปเพาะเองส่วนหนึ่งและคัดเลือกพันธุ์ไผ่ตงที่มีลักษณะดีที่ได้จากการเพาะเมล็ดของเกษตรกรในแถบปราจีนบุรีแล้วทำการปลูกในฟาร์มมหาวิทยาลัย เพื่อทำการคัดเลือกพันธ์ที่ดีให้ได้ประโยชน์สูงสุด ซึ่งลักษณะดีที่คัดเลือกนั้นได้แก่ มีรสดี หน่อใหญ่ และให้หน่อดก

เนื่องจากไผ่ตงที่เกิดจากการเพาะเมล็ดมีความหลากหลาย และน่าจะมีลักษณะเด่นอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์อีกมากมายนอกเหนือไปจากการให้ผลผลิตสูงสุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการวิจัยด้านพันธุกรรมโมเลกุลเพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของไผ่ตงที่ทำการคัดเลือกโดยคณะผู้วิจัยของ ดร. เรณู ขำเลิศ ซึ่งการวิจัยด้านพันธุกรรมโมเลกุลนี้ ใช้วิธีการตรวจสอบ 2 วิธี คือ อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) และ เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphisms; AFLP) ซึ่งสองวิธีการตรวจสอบมีหลักการย่อๆดังต่อไปนี้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. หา Genetic map ของไผ่ตงที่มีคุณลักษณะต่างๆ (DNA marker)
2. พัฒนากำลังคน (บัณฑิตศึกษา) ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ชีวิทยาระดับโมเลกุล

ขอบเขตการดำเนินการวิจัย

จะทำการหา Genetic Map ของไผ่พันธุ์ดี ที่คัดเลือกได้จากโครงการคัดเลือกพันธุ์ไผ่ตงเพื่อประโยชน์เชิงการค้าและอุตสาหกรรมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ไผ่เหล่านี้เป็นไผ่ที่ปลูกทำการคัดเลือกที่ฟาร์ม มทส. (เท่านั้น)

ระเบียบวิธีวิจัย

งานหาแผนภูมิพันธุกรรม

จากการคัดพันธุ์ไผ่ตงของโครงการคัดเลือกพันธุ์ไผ่ตงเพื่อประโยชน์ในเชิงการค้าและอุตสาหกรรม นำไผ่สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว มาสกัด DNA จากใบอ่อน แล้วนำมาทำ RAPD- PCR โดยทำทั้งแบบใช้ primer เดียวและใช้ primer 2 ตัว โดยเปลี่ยนคู่ไป จากผลที่ได้จะคัดเลือก ชุด primerที่ใช้ได้ดีเพียงบางชุดเท่านั้นจากนั้นทำการยืนยันผลกับ DNA ที่เตรียมใหม่จากไผ่กอเดิม และเก็บเป็น Genetic Map ของไผ่พันธุ์นั้นๆต่อไป และยังใช้เทคนิค AFLP เพื่อศึกษาในรายละเอียดของ Genetic Map ด้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic map และ DNA marker) สำหรับไผ่ตงพันธุ์ต่างๆซึ่งสามารถนำไปดูดึงความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) ได้อีกด้วย
2. ได้นักวิจัยที่สนใจงานวิจัยพื้นฐาน ซึ่งจะเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทยต่อไปในอนาคต
3. ได้ผลงานที่สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการที่เป็นที่ยอมรับ

บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไผ่ตง เป็นพืชที่นิยมปลูกในเมืองไทยมานานแล้ว เนื่องจากเป็นไม้ที่โตเร็ว สามารถขึ้นได้ดีในดินเกือบทุกชนิด มีการปลูกกันโดยทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคตะวันออก คือแถบจังหวัดปราจีนบุรี และนครนายก ซึ่งปัจจุบันได้มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นและได้ขยายไปในหลายจังหวัดทั่วทุกภาค หน่อไผ่ตงมีรสชาติดี ตลาดต้องการอยู่ตลอดเวลา คนไทยใช้หน่อไผ่ตงประกอบอาหารได้หลายอย่างและทุกครัวเรือน นอกจากไผ่ตงจะเป็นไผ่ที่นิยมบริโภคหน่อภายในประเทศแล้ว ยังมีส่วนหนึ่งได้ส่งไปจำหน่ายต่างประเทศ ในรูปผลิตภัณฑ์หน่อไม้ไผ่ตงอัดปี๊บ หน่อไม้แห้ง หน่อไม้สดแช่แข็ง เป็นต้น

ไผ่เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางเกือบทุกส่วนของโลก จัดอยู่ในตระกูลหญ้า คือ Gramineae และนับเป็นพืชตระกูลหญ้าที่สูงที่สุดในโลก

ไผ่สามารถขึ้นได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 8-36 องศาเซลเซียส และมีความชื้นปริมาณน้ำฝนที่ต้องการโดยทั่วไปประมาณ 1,270-4,050 มิลลิเมตรต่อปี

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่

1. เหง้า (Rhizome) เป็นส่วนของลำต้นที่อยู่ใต้ดิน เมื่อโตเต็มที่จะแตกหน่อเป็นลำไผ่ต่อไป ไผ่แต่ละชนิดจะมีลักษณะการแตกหน่อ ที่แตกต่างกันไป จึงทำให้สามารถแบ่งลักษณะการแตกหน่อได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1.1 ประเภทเป็นกอ (Sympodial type) ไผ่ประเภทนี้มีตาของเหง้าซึ่งมีอยู่หลายข้อจะแตกหน่อกลายเป็นลำก่อน ในปีต่อมาตาส่วนล่างของเหง้าดังกล่าวจะเจริญเติบโตเป็นลำที่สองที่สามต่อไปเรื่อยๆ จนหนาแน่นเป็นกอในที่สุด ไผ่ในเขตร้อนส่วนใหญ่และไผ่เกือบทุกชนิดในประเทศไทยจัดอยู่ในประเภทนี้ รวมถึงไผ่ตงเขียวด้วย

1.2 ประเภทลำเดี่ยว (Monopodial type) ไผ่ประเภทนี้ตาตรงข้อของเหง้าจะแตกหน่อขึ้นเป็นลำ ในขณะที่ตาบริเวณส่วนปลายของเหง้าจะเจริญกลายเป็นเหง้าใหม่ที่ยาวเกือบเท่าเหง้าเดิม และปีต่อๆมาเหง้านั้นจะเจริญต่อไปเป็นลำและเหง้าใหม่ต่อไปเรื่อยๆ

1.3 ประเภทผสม (Intermediate type) ไผ่ประเภทนี้มีการเจริญเติบโตทั้งสองแบบ คือบางปีเจริญเติบโตแบบลำเดี่ยว บางปีมีการเจริญเติบโตแบบเป็นกอสลับกันไป หรือบางปีเจริญก็เจริญเติบโตเป็นทั้งแบบลำเดี่ยวหรือกอควบคู่กันไป

2. ลำและการแตกกิ่ง (culms and Branching) โดยทั่วไปลำของไม้ไผ่จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.50-30.0 เซนติเมตร โดยปกติแล้วจะสังเกตเห็นได้ว่า ไม้ไผ่แต่ละชนิดจะมีสีผิวของลำ ขนาด ลักษณะของข้อ ความยาวของปล้องที่แตกต่างกัน นอกจากนั้นไผ่แต่ละชนิดยังมีลักษณะของการแตกกิ่ง (Branching) ที่ต่างกันด้วย กล่าวคือ ไม้ไผ่บางชนิดจะมีการแตกกิ่ง เริ่มตั้งแต่โคนของลำจนถึงยอด บางชนิดจะแตกกิ่งเฉพาะบริเวณยอดของลำ ไผ่บางชนิดตามข้อจะมีเพียงปุ่มตา ซึ่งปุ่มตานั้นจะไม่แตกกิ่ง ซึ่งลักษณะการแตกกิ่งของไผ่แต่ละชนิดก็จะไม่เหมือนกัน เช่น ไผ่ตง กิ่งที่แตกแขนงจะมีขนาดใหญ่กว่ากิ่งแขนงกิ่งข้างอื่นๆ หรือไผ่ไร่จะมีการแตกกิ่งแขนงเพียง 1 กิ่งและเจริญเติบโตเกือบมีขนาดเท่าลำ เป็นต้น

3. ใบ (Leaves) ใบของไม้ไผ่นั้นแบ่งออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือ กาบโคนใบ และใบ ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างแปลกไปกว่าไม้ธรรมดา กาบหุ้มลำนั้น หุ้มลำของไม้ไผ่ส่วนใหญ่ แต่กาบโคนใบนั้นเป็นส่วนหนึ่งของใบและมีลักษณะต่างๆ คล้ายๆ กับกาบหุ้มลำโดยมีส่วนของใบที่เรียกว่า กาบใบ (Leaf sheath) ติดอยู่ ในการจำแนกชนิดไผ่สามารถอาศัยลักษณะของใบได้ เพราะไผ่แต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกันไป ทั้งความยาว ความกว้าง และขนาดของใบ แต่ต้องอาศัยความชำนาญเป็นพิเศษ

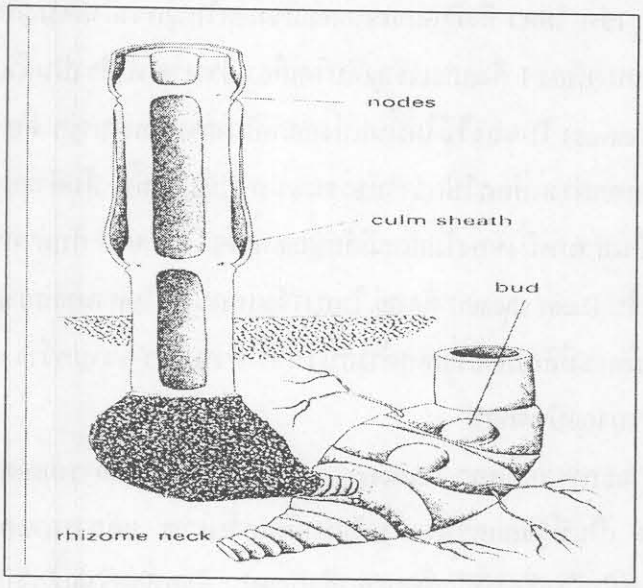
4. ช่อ และการออกดอก (Inflorescence and Flower) การออกดอก ของไม้ไผ่หรือที่เรียกว่าไผ่ตายซุย เป็นที่รู้จักและพบเห็นกันมาตั้งแต่โบราณ แต่การคาดคะเนอายุของไผ่แต่ละชนิดที่จะออกดอกยังเป็นเรื่องที่ลึกลับอยู่จนถึงปัจจุบัน โดยทั่วๆไปแล้วไม้ไผ่มีวงจรชีวิตที่ค่อนข้างยาวนาน แต่ไม่มีใครสามารถคาดคะเนกำหนดเวลาในการออกดอกของไม้ไผ่ในป่าธรรมชาติได้อย่างถูกต้อง นอกจากนั้น ยังสามารถจำแนกลักษณะของไผ่โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างของดอกได้ (Sastry, 2000) ซึ่งการออกดอกของไม้ไผ่สามารถแยกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ดังต่อไปนี้

1. ประเภทที่ออกดอกทุกปี (Annual flowerings cycle) เป็นการออกดอกของไผ่ที่ครอบคลุมพื้นที่กว้าง แต่เมื่อออกดอกแล้วไผ่จะไม่ตาย

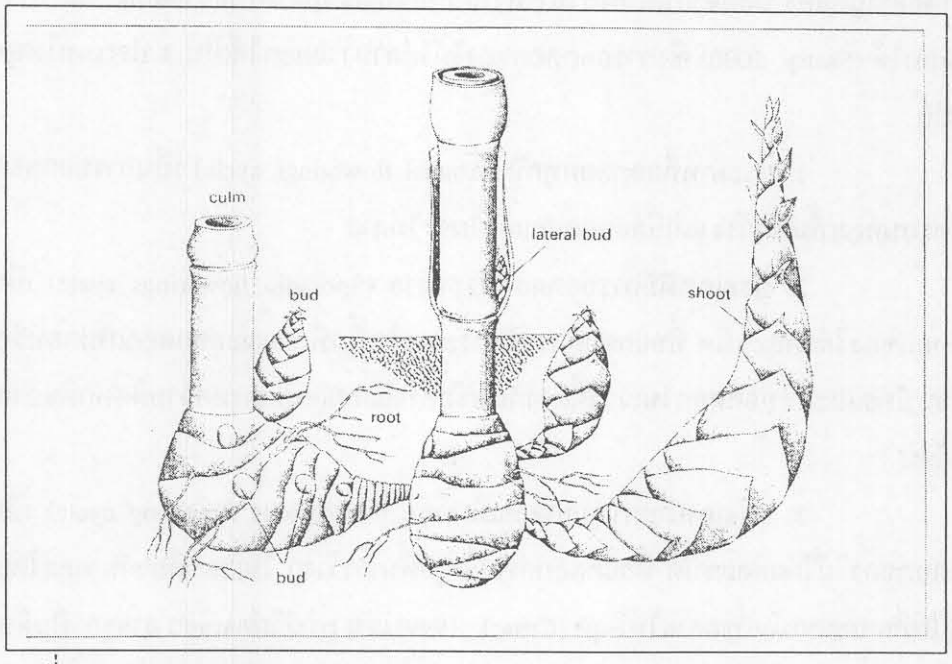
2. ประเภทที่มีการออกดอกประปราย (Sporadic flowerings cycle) เป็นการออกดอกของไผ่แต่ละชนิด ที่ออกดอกกระจัดกระจายในพื้นที่ อาจจะออกดอกเป็นกอหรือกลุ่มจำนวนน้อยและมักออกดอกในเวลาที่ต่างกันหรืออาจจะออกดอกตามความผิดปกติของสภาพแวดล้อม

3. ประเภทที่มีการออกดอกเป็นกลุ่ม (Gregarious flowering cycle) เป็นการออกดอกของไม้ไผ่แต่ละชนิด ที่ออกดอกครอบคลุมพื้นที่กว้างๆ ในเวลาเดียวกัน และโดยส่วนใหญ่ไผ่ที่ออกดอกนั้นก็จะตายในที่สุด (Cusack, 1999) เช่น กรณีไผ่ตงเขียว ตายขุย เป็นต้น

5. หน่อ (Shoot) ในการศึกษาจำแนกชนิดไม้ไผ่ ลักษณะภายนอกท่าสามารถจะบอกความแตกต่างของไม้ไผ่แต่ละชนิดได้เป็นอย่างดีอีกลักษณะหนึ่งก็คือ หน่อ ซึ่งหน่อของไม้ไผ่แต่ละชนิดจะเป็นส่วนหนึ่งซึ่งแสดงลักษณะของกาบลำ ที่ซ้อนทับกันเป็นชั้นๆ อย่างสมบูรณ์ ทำให้หน่อของไม้ไผ่แต่ละชนิดมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนั้นหน่อขอไม้ไผ่แต่ละชนิดยังมีสีที่แตกต่างกันไปด้วยเราสามารถเห็นส่วนประกอบทางพฤกศาสตร์ที่สำคัญของไผ่ได้ดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 1. แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ตงเขียว



ที่มา : Recht and Wetterwald., 1992.

การวิเคราะห์ไม้ไผ่ชนิดต่างๆ ในประเทศไทย

ไม้ไผ่ที่พบในประเทศไทยทั้งหมด13 สกุล และ 60 ชนิด ซึ่งมีระบบเหง้ากอเกือบทุกชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะมีระบบการแตกของเหง้า แบบ "Sympodial Rhizome" ซึ่งประเทศไทยใช้ประโยชน์จากไผ่ หลายประการ (Ramyarongsi, 1999) ดังต่อไปนี้

1. ไผ่ที่ใช้ประโยชน์จากหน่อ เพื่อเป็นอาหาร ได้แก่ไผ่ตง ไผ่สีสุก ไผ่รวก ไผ่รวกดำ ไผ่บง ไผ่ซางดอย และไผ่ไร่
2. ไผ่ที่ใช้ประโยชน์จากลำ เพื่อใช้ในการก่อสร้าง เช่น ไผ่ป่า ไผ่สีสุกไผ่ตง ไผ่รวกดำ ไผ่ซางดอย ไผ่ซางนวล ไผ่เหลือง และไผ่เพ็ก
3. ไผ่ที่ใช้ประโยชน์จากลำ เพื่อใช้ในงานจักสาน เช่น ไผ่รวก ไผ่รวกดำ ไผ่สีสุก ไผ่เหลือง ไผ่เกรียบ และไผ่เฮี้ยะ

จากรายงานพบว่าไผ่ในประเทศไทยที่นิยมปลูกกันมากที่สุดคือ ไผ่ตง เนื่องจากเป็นไผ่ที่โตเร็วและใช้ประโยชน์ได้จากทั้งหน่อและลำ นอกจากนี้ยังมีรสหวานและเจริญเติบโตเร็วด้วย

คำกำจัดความของไผ่ตง

ไผ่ตงเป็นไผ่ที่มีลำต้นสูง ไม่มีหนาม อาจสูงถึง 30 เมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นประมาณ 30 เซนติเมตร ปล้องยาวประมาณ 8-18 เซนติเมตร ลำมีสีเทาปนขาว สลับกันเป็นลายเฉพาะทางส่วนโคนของลำมีขนเล็กๆอยู่ทั่วไปตามลำ หน่อมีขนาดใหญ่ นิยมปลูกมากที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากรายงานพบว่าแม้ว่าไผ่ตงจะมีความสำคัญและปลูกกันอย่างแพร่หลาย แต่เมื่อเทียบกับพืชตระกูลหญ้าด้วยกัน อย่างเช่นข้าว และข้าวโพดแล้ว ยังมีการวิจัยน้อยมาก

ในประเทศไทย ไผ่ตงเขียวเป็นไผ่ที่นิยมปลูกทั่วไปไม่แพ้ไผ่ตงดำ ข้อดีของไผ่ตงเขียวที่ค่อนข้างเป็นที่ต้องการของผู้ปลูกคือ สามารถทนแล้งได้ดีกว่าไผ่ตงดำ พร้อมกันนั้นในแง่ของผลผลิตไผ่ตงเขียวยังให้ผลผลิตหน่อทัดเทียมไผ่ตงชนิดอื่น นอกนอกนั้นข้อดีอีกอย่างหนึ่งของไผ่ตงเขียวคือ มีช่วงระยะการให้หน่อกว้างกว่าไผ่ตงพันธุ์อื่นๆ เพราะไผ่ตงเขียวจะออกหน่อถึงสองช่วง คือ ช่วงแรกเป็นช่วงต้นฤดูฝน ประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน และออกอีกช่วงในตอนปลายฤดูประมาณเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (คำนึง, 2542)

ประวัติการปลูกไผ่ตง

การนำไผ่ตงเข้ามาปลูกในประเทศไทยยังไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนนัก มีผู้สันนิษฐานว่าไผ่ตงเข้ามาสู่ประเทศไทย 2 ทาง คือ

ทางแรกเชื่อกันว่าไผ่ตงที่ปลูกกันอยู่ทุกวันนี้ มีชาวจีนนำเข้ามาปลูกที่อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี เมื่อ ประมาณ 100 ปีมาแล้ว แล้วค่อยๆขยายออกสู่จังหวัดใกล้และไกล เช่น ฉะเชิงเทรา นครนายก ชลบุรี จันทบุรี ระยอง ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น บุรีรัมย์ ขอนแก่น อุบลราชธานี และยโสธร ภาคเหนือ เช่น ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย ภาคกลาง เช่น เพชรบุรี กาญจนบุรี ภาคใต้ เช่น ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ เป็นต้น

อีกทางหนึ่ง เชื่อกันว่าไผ่ตงมีถิ่นกำเนิดหรือพื้นเพเดิมอยู่ทางแหลมมาลายู เพราะไผ่ตงเป็นไผ่ที่ต้องการความชุ่มชื้นค่อนข้างสูงจึงน่าเป็นภูมิอากาศแถบมรสุมเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่น และมีการกระจายพันธุ์ขึ้นมาในประเทศไทย โดยมีชาวจีนเป็นผู้ปลูก เหตุที่เริ่มจากชาวจีนเนื่องจากชาวจีนที่อพยพมารู้คุณค่าของการใช้หน่อไผ่เป็นอาหาร เพราะหน่อมีคุณภาพ ขนาดใหญ่และรสชาติดี จึงเริ่มตั้งแต่บัดนั้น

อาร์เอพีดี (Ranfom Amplified Polymorphic DNA; RAPD)

อาร์เอพีดีเป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่งซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ธีระชัย, 2540)

เนื่องจากปัญหาการยืนยันผลของ RAPD มีประสิทธิภาพต่ำมาก ดังนั้น AFLP จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหาการยืนยันผล

เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP)

เอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบหนึ่ง ซึ่งประยุกต์มาจากเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) โดยมีหลักการคร่าวๆดังนี้

ขั้นแรก คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ(restriction enzymes) 2 ชนิด ที่นิยมใช้ในพืชคือ *Eco*RI และ *Mse*I จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

ขั้นที่สอง คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ซึ่งการออกแบบลำดับเบสของไพรเมอร์จะใช้ลำดับเบสที่เหมือนกับ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3 อีกส่วนหนึ่ง เพื่อทำให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้นส่วนของไพร์เมอร์เหมือนกับ adapter ซึ่งเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย3' เรียกว่า selective part จะช่วยลดจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณลง ถ้า

เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกมากขึ้นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุกๆ เบสที่เพิ่มขึ้น การทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3 มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำ PCR ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification

ขั้นสุดท้าย คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel และการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining) แทนวิธีการย้อมด้วยสารกัมมันตรังสี

บทที่ 3

ปัจจัย และ วิธีการทดลอง

ปัจจัย หรือ อุปกรณ์ (Materials)

การเลือกตัวอย่างไผ่ที่ใช้ศึกษา

ไผ่ตงเขียว *(Dendrocalamus asper*; Tong Keaw) 23 สายพันธุ์ (A11, A13, A15, A22, A25, A27, A31, A32, A41, A42, A51, SUT7, SUT23, SUT25, SUT28, SUT33, SUT35, บุญช่วย; BC, คะนอง; KN, สะอาด; SA, 5AS1, และ S85) ถูกคัดเลือกมาจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ 2 สายพันธุ์ ที่ไม่ใช่ตงเขียวถูกนำมาเปรียบเทียบ คือ ไผ่ตงดำ (*D. asper*; Tong Daum) และไผ่รวก (*Thyrosostachs siamensis*)

วิธีการทดลอง

1. **การสกัดดีเอ็นเอสำหรับวิธีการอาร์เอพีดี**

   การสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำ อาร์เอพีดีใช้วิธีการที่ เรียกว่า CTAB method โดยประยุกต์มาจากวิธีการของ Neal et al, 1993 ซึ่งมีกระบวนการอย่างย่อดังนี้

   1. นำใบอ่อนของไผ่มาประมาณ 500-800 กรัม ใส่ลงในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมและบดให้ละเอียดปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมดแล้วเติม extraction buffer ลงไป 1 มิลลิลิตร
   2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุก 10 นาที
   3. นำหลอดที่ได้ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ
   4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
   5. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 10%CTAB 1 ใน 10 เท่าของปริมาณสารละลายทั้งหมด
   6. ทำขั้นตอนที่ 3-4 ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
   7. ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม CTAB precipitation buffer ลงไป 1 เท่า ของสารที่มีอยู่ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
9. ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม High salt TE 400 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่ 65 องศา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้อุณหภูมิลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง
10. เติม ice-cold absolute ethanol ปริมาณ 2 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
11. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวออก
12. ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 100% และ 70% ethanol ตามลำดับ แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง
13. ละลายดีเอ็นเอด้วย 1/10 TE ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน
14. เติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 1 เท่า ของสารที่มีอยู่
15. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
16. ดูดส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน(อย่างระมัดระวัง)ใส่หลอดใหม่แล้วเติม chloroform/isoamyl (24:1) เป็น 1 เท่าของสารละลายที่ได้
17. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
18. ดูดส่วนใส ใส่หลอดใหม่แล้วตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 3M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่ได้ แล้วเติม absolute ethanol ลงไปปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาณสารละลายทั้งหมด ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ
19. ปั่นเหวี่ยงที่ 12, 000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสออก
20. ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 100% และ 70% ethanol ตามลำดับ แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง
21. ละลายดีเอ็นเอใน 1/10 TE ที่มี RNase A ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
22. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ดีเอ็นเอ ด้วย agarose electrophoresis และ วัด OD_{260}

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่

1. 1x CTAB extraction buffer (100 ml): 1 g CTAB (1%)
   5 ml 1M Tris-HCL, pH 8.0 (50 mM)

2 ml 0.5 M EDTA (10 mM)

14 ml 5 M NaCl (0.7M)

0.5 g PVP mol. wt 360,000 (0.5%)

2. 10% CTAB(100 ml) : 10 g CTAB (10%)

14 ml 5M NaCl (0.7M)

3. CTAB precipitation buffer (100 ml): 1 g CTAB (1%)

5 ml 1MTris-HCl, pH 8.0 (50mM)

2 ml 0.5M EDTA (10mM)

4. High salt TE (100 ml): 1 ml 1MTris-HCl, pH 8.0 (10mM)

0.2 ml 0.5M EDTA (1mM)

20 ml 5M NaCl (1M)

5. 1/10 TE (100 ml): 0.1 ml 1MTris-HCl, pH 8.0 (1 mM)

0.02 ml 0.5M EDTA (0.1 mM)

6. washing buffer: 5 M sodium acetate, pH 5.2

100% ethanol

70% ethanol

7. Phenol:choloform:isoamyl alcohol (25:24:1)

8. Choloform:isoamyl alcohol (24:1)

9. Absolute ethanol

10. RNase A: ละลาย RNase A ในน้ำให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ DNase ที่อาจปนมา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

กระบวนการทำ RAPD-PCR

ในกระบวนการเบื้องต้นต้องตรวจหาไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ก่อน โดยใส่สารต่างๆในปฏิกิริยาที่ระดับหนึ่ง เมื่อเลือกไพรเมอร์ที่ต้องการได้แล้ว จึงทดลองเปลี่ยนแปลงสภาพต่างๆ เช่น ความเข้มข้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และอุณหภูมิกับเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพืชตัวอย่างที่ทดลอง สำหรับ ดีเอ็นเอของ ไผ่ตง ทำการทดลองโดยใส่สารต่างๆดังนี้

สารเคมีที่ใช้	ปริมาตร
DNA ความเข้มข้น 10-50 ng/µl	2 µl
10x บัฟเฟอร์	2.5 µl

แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 mM)	2 µl
dNTP (5 mM)	0.5 µl
ไพร์เมอร์ (2 pmole/µl)	1.5 µl
Taq polymerase (5 unit/µl)	0.5 µl
น้ำกลั่น	16 µl
ปริมาตรรวม	25 µl

นำส่วนผสมที่ได้มาทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลา ดังนี้

1. 94 °C เป็นเวลา 5 นาที
2. 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที
   36 °C เป็นเวลา 30 วินาที
   72 °C เป็นเวลา 30 วินาที
   } ทำซ้ำ 35 รอบ
3. 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เพื่อให้เกิด primer extension สมบูรณ์ แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยเตรียม agarose gel 2% แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อทำ AFLP

วิธีการสกัด DNA สำหรับ ทำ AFLP จะปฏิบัติตามวิธีการที่มาจากชุดน้ำยาสำเร็จรูป (kit) โดยมีวิธีอย่างย่อดังต่อไปนี้

1. บดใบอ่อนของไผ่ใน ไนโตรเจนเหลวจนเป็นผง แล้วปล่อยไว้ให้แห้ง
2. เติม lysis buffer 5 ml (lysis buffer; 1%CTAB, 5%PVP, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 8.0), and 350mM 2-mercaptoethano)
3. เติม phenol:choloform (1:1) ในปริมาตรที่เท่ากัน กลับหลอดไปมาอย่างเบาๆ
4. ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม choloform ในปริมาณที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ
6. ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
7. ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 95% ethano ปริมาตร 2.5 เท่าของสารที่อยู่ กลับหลอดไปมาอย่างเบาๆ
8. ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง
9. ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol แล้วปล่อยไว้ให้แห้ง

10. ละลายตะกอนด้วย 50 µl TE buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA] ที่มี RNase A (10mg/ml)
11. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซีส และ วัด OD_{260}

กระบวนการทำ AFLP

1. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ในที่นี้ใช้ *Eco*RI กับ *Mse*I) ทำโดยใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอ (150 ng/µl)	1.5 µl
5x reaction buffer	5.00 µl
EcoRI (10 U/µl)	0.25 µl
MseI (5 U/µl)	0.50 µl
น้ำกลั่น	16.75 µl
ปริมาตรรวม	25 µl

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และจากนั้นก่อนจะเริ่มกระบวนการต่อไปให้นำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโทรโฟรีซีส โดยเตรียม 1% agarose gel แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะพบรอยยาว (smear) ในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส

2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1 มาเติมสารต่างๆดังนี้

ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	25 µl
EcoRI adapter (5 pmole/µl)	1.0 µl
MseI adapter (25 pmole/µl)	2.0 µl
5x T4 ligase buffer	10.0 µl
T4 DNA ligase (1U/µl)	1.0 µl
น้ำกลั่น	11.0 µl
ปริมาตรรวม	50.0 µl

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สำหรับ adapter primers ลำดับเบสที่ใช้คือ

EcoRI adapter; Forward 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' ⟶

⟵ Reverse 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI adapter ; Forward 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' ⟶

← Reverse 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธีการ PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะทำ 2 ขั้นตอน คือ preselective amplification และ selective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนมากขึ้น ลำดับเบสที่ใช้คือ

ลำดับเบสพื้นฐานของ *Eco*RI คือ 5'-GACTGCGTACCAATTCx yz-3'

ลำดับเบสพื้นฐานของ *Mse*I คือ 5'-GATGAGTCCTGAGTAACACx yz-3'

ซึ่ง xyz คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่เพิ่มเข้าไปเพื่อคัดเลือก

1.1 การทำ preselective amplification นำดีเอ็นเอจากข้อ 2 มาทำปฏิกิริยาโดยใส่สารต่างๆ ดังนี้ (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

ดีเอ็นเอที่ได้จาก ข้อ 2	2.00 µl
primerE-A (5 pmole/µl)	1.00 µl
primerM-C (5 pmole/µl)	1.00 µl
dNTP mix (2 mM)	2.50 µl
10x PCR buffer	2.50 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.50 µl
Taq polymerase (5U/µl)	0.10 µl
น้ำกลั่น	14.40 µl
ปริมาตรรวม	25.00 µl

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรม

94 °C เป็นเวลา 30 วินาที
56 °C เป็นเวลา 60 วินาที
72 °C เป็นเวลา 60 วินาที
} ทำซ้ำ 30 รอบ

แบ่งส่วนของสารละลายมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบโดยย้อมเจล ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จะพบรอยยาว (smear) ในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส นำ

ตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งบางส่วนเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำ เพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นที่ 2 ส่วนทีเหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การทำ Selective amplification เติมสารต่างๆดังนี้

ดีเอ็นเอที่ทำให้เจือจางแล้วจากข้อ 3.1	5 µl
Primer E-XYZ (5 pmole/µl)	1 µl
Primer M-XYZ (5 pmole/µl)	1 µl
dNTP mix (2mM)	2 µl
10x PCR buffer	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.2 µl
น้ำกลั่น	7.8 µl
ปริมาตรรวม	20.0 µl

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรม touch down

94 °C เป็นเวลา 30 วินาที
65 °C เป็นเวลา 30 วินาที
72 °C เป็นเวลา 60 วินาที
} 1 รอบ

ลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7°C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

94 °C เป็นเวลา 30 วินาที
56 °C เป็นเวลา 30 วินาที
72 °C เป็นเวลา 60 วินาที
} ทำซ้ำ 25 รอบ

เมื่อจบปฏิกิริยา PCR แล้วนำมาเติม AFLP loading buffer (98% formamine, 10mM EDTA, 0.1% bromphenol blue, 0.1% xylene cyanol) ในอัตราส่วน DNA product:dye 9:8 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีพร้อมสำหรับทำอิ-เล็กโทรโฟรีซีส

4. การแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel (ปริมาณที่ใช้สำหรับเตรียมเจล 6%)

สารที่ใช้	ปริมาตรรวม
30% acrylamide (19:1)	8 ml
5x TBE	8 ml
ยูเรีย	18 g
น้ำกลั่น	10 ml
10% Ammonum persulfate (APS)	400 µl

TEMED (N,N,N'N'-tetramethylethylenediamine) 20 µl

ผสมสารต่างๆให้เข้ากัน และเทลงชุด gel electrophoresis ที่เตรียมไว้แล้ว จากนั้น run ประมาณ 4 ชั่วโมง โดยการ run ที่ constant volts 250 volts แล้วจึงนำเจลที่ได้ไปวิเคราะห์โดยการย้อมด้วย silver (silver staining)

5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

1. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 3-5 นาที เขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า

2. แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1% นาน 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

3. นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3% นาน 15 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

4. นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ที่เตรียมใหม่ๆ เป็นเวลา 20 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ

5. นำแผ่นเจลออกมาจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

6. ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส หรือในตู้เย็น เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน (developer=2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde)

7. นำแผ่นเจลมาจุ่มน้ำอย่างรวดเร็ว

8. หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลายกลีเซอรอล 3% นาน 30 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

6. การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

หลังจากย้อมเจลด้วย ethidium bromide (RAPD) และ silver staining (AFLP) แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นบนเจล จะถูก score โดย แบนที่มีจะให้เป็น 1 และแบนที่ไม่เกิดจะให้เป็น 0 (Goto et al., 1998) แล้วข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำเข้าวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม NTSYS V 2.1 โดยจะวิเคราะห์ค่าความเหมือนด้วยโปรแกรมที่ชื่อ Qualitative data จากนั้นจะนำข้อมูลที่ได้ไปจัดกลุ่มด้วยโปรแกรมที่ชื่อว่า SHAN และใช้ โปรแกรม UPGMA สำหรับสร้าง dendrogram

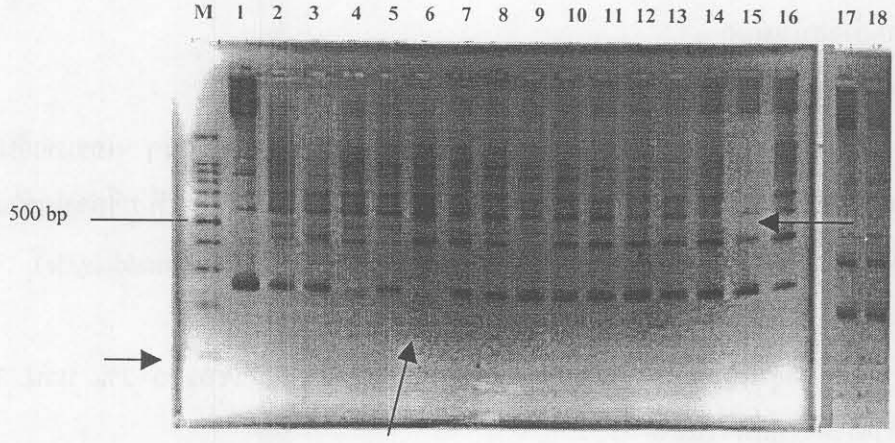
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ผลจากวิธี RAPD

จากการคัดเลือกไพรเมอร์สำเร็จรูปจากชุด Operon AE, L, และ S สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นได้ทั้งหมด 23 ตัว จาก 50 ตัว ซึ่งการคัดเลือกไพรเมอร์จะคัดเลือกจาก ชุดที่ทำให้เกิดความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอมากที่สุด และชุดที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากที่สุด (Ellsworth et al., 1993) ซึ่งชุดของไพรเมอร์ที่เลือกใช้จะดูได้จากตารางที่ 1

หลังจากที่นำ DNA ที่ได้จากกระบวนการ PCR ไป แยกบน agarose gel 2% และย้อมสีจะเห็นผลเช่น รูปที่ 2



รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่ตง 18 สายพันธุ์ ที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี RAPD Lane M ; 100 bp ladder marker, Lane 1 ; A11, Lane 2 ; A13, Lane 3 ; A15, Lane 4 ; A21, Lane 5 ; A22, Lane 6 ; A25, Lane 7 ; A26, Lane 8 ; A27, Lane 9 ; A31, Lane 10 ; A32, Lane 11 ; A34, Lane 12 ; A35, Lane 13 ; A41, Lane 14 ; A42, Lane 15 ; A51, Lane 16 ; SUT 7, Lane 17 ; ตงดำ and Lane 18 ; คะนอง

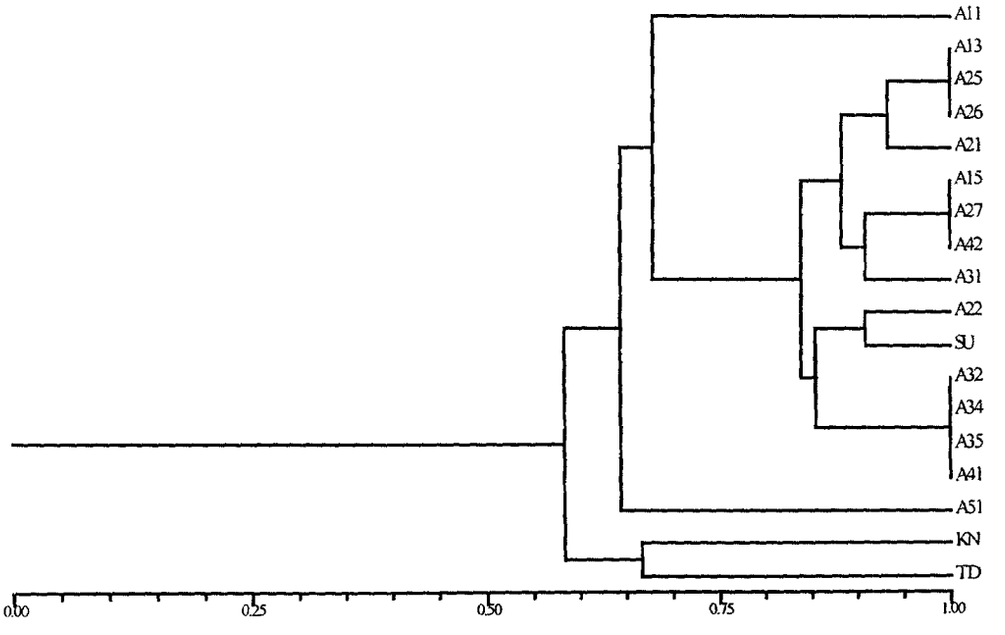
จากรูปจะเห็นตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือ บริเวณที่ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าว เราสามารถนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางคอมพิวเตอร์โดย score ให้ตำแหน่งดังกล่าวเป็น 0

ตารางที่ 1. ไพรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ RAPD

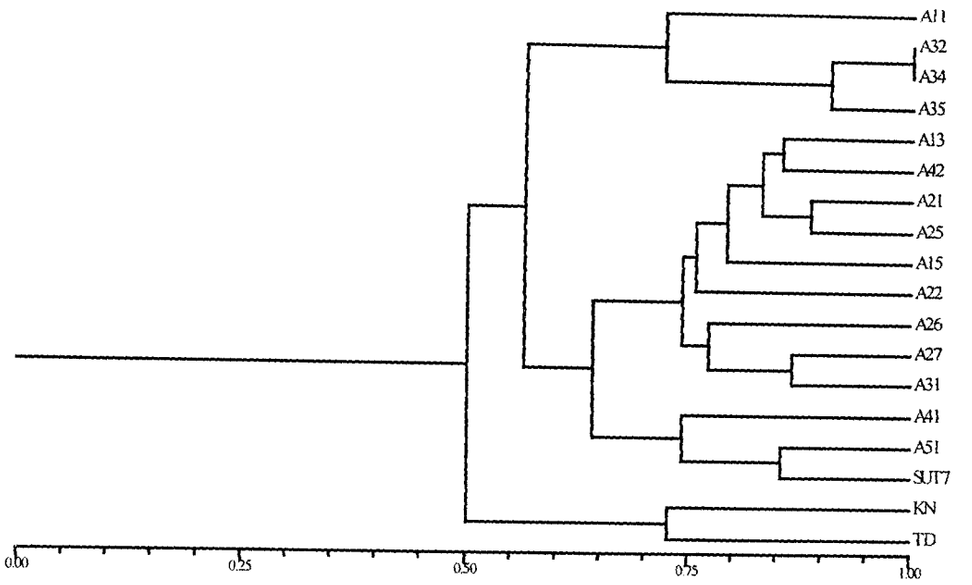
หมายเลข	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	องค์ประกอบของ GC (%)	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่นับได้	ช่วงของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเกตได้จากเจล(bp)
1	OPL 07	AGGCGGGAAC	70	7	500-1500
2	OPL 08	AGCAGGTGGA	60	7	400-1500
3	OPL 12	GGGCGGTACT	70	5	500-1200
4	OPL 17	AGCCTGAGCC	70	8	200-1400
5	OPL 18	ACCACCCACC	70	9	300-1500
6	OPL 20	TGGTGGACCA	60	7	500-1400
7	OPAE01	TGAGGGCCGT	70	7	500-1400
8	OPAE 03	CATAGAGCGG	60	6	700-1400
9	OPAE 04	CCAGCACCTTC	70	9	400-1500
10	OPAE 06	GGGGAAGACA	60	5	400-1400
11	OPAE 08	CTGGCTCAGA	60	9	800-1500
12	OPAE 11	AAGACCGGGA	60	8	400-1500
13	OPAE 14	GAGAGGCTCC	70	8	400-1500
14	OPAE 15	TGCCTGGACC	70	8	600-1500
15	OPAE 16	TCCGTGCTGA	60	10	400-1500
16	OPAE17	GGCAGGTTCA	60	5	300-1500
17	OPAE18	CTGGTGCTGA	60	7	600-1400
18	OPAE19	GACAGTCCCT	60	6	400-1500
19	OPAE20	TTGACCCCAG	60	7	600-1500
20	OPS 1	CTACTGCGCT	60	5	700-1500
21	OPS 3	CAGAGGTCCC	70	7	300-1500
22	OPS 7	TCCGATGCTG	60	3	800-1500
23	OPS 9	TCCTGGTCCC	70	7	400-1500

การวิเคราะห์ผล RAPD ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

หลังจากที่ได้ข้อมูลจาก RAPD แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่า ถ้าใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์เพียงชุดเดียว (OPAE 1) ผลที่ได้จะไม่สามารถแยกสายพันธุ์ไผ่ที่มีอยู่บางสายพันธุ์ได้ ดังรูปที่ 3 จะเห็นว่าผลที่ได้ ไผ่แต่ละพันธุ์จะมีความใกล้เคียงกันมาก หรือ ให้ผลเป็นพันธุ์เดียวกัน เช่น A13, A25, A26 และ A15, A27, A412 และ A32, A34, A35, A41 ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของไผ่จากข้อมูลเพียงชุดเดียวไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีการรวมข้อมูลจาก ทุกไพรเมอร์ (จากตารางที่ 1) เข้าด้วยกันและนำมาวิเคราะห์ ซึ่งได้ผลที่ออกมาจะเป็นดังรูปที่ 4



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์เพียงชุดเดียว

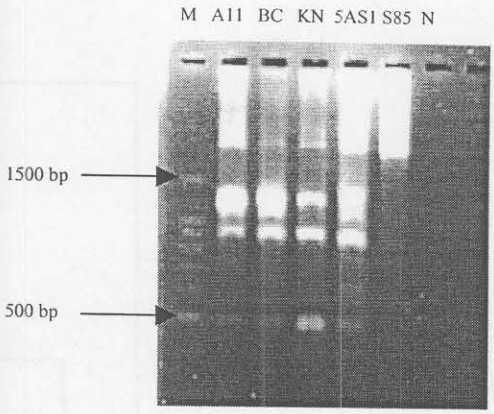


รูปที่ 4. แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงแต่ละสายพันธุ์ โดยการรวมข้อมูลจากไพรเมอร์ที่แสดงในตารางที่ 1

จากรูปที่ 4 จะเห็นว่า เมื่อรวมข้อมูลจากหลายๆ ไพรเมอร์เข้าด้วยกัน จะทำให้เราสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยสามารถแยกสายพันธุ์ออกเป็น4 กลุ่มใหญ่ด้วยกันคือ A11, A32, A34และ A35 มีความใกล้ชิดกัน กลุ่มที่ 2 คือ A13, A42, A21, A25, A15, A22, A26, A27และ A31 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับกลุ่มของ A41, A51, SUT7 ส่วนกลุ่มที่ 4 ที่มีความแตกต่างจาก 3 กลุ่มข้างต้นอย่างสิ้นเชิงคือ คะนองและตงดำ

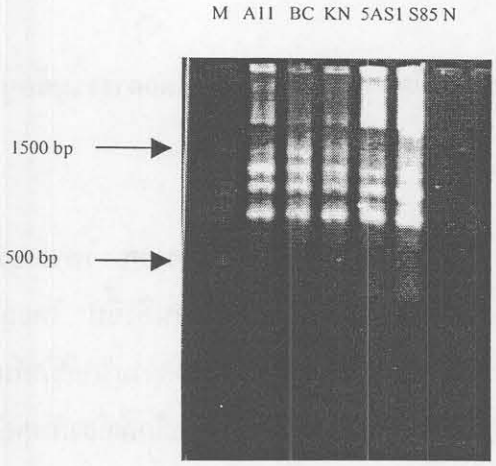
การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี RAPD จากไผ่พันธุ์ดี 5 สายพันธุ์

ไผ่ตงเขียว 5 สายพันธุ์ (A11, บุญช่วย (BC), คะนอง (KN), 5AS1, และ S85) ถูกคัดเลือกมา โดยคัดเลือกจากลักษณะดีทางเศรษฐกิจ เช่น หน่อใหญ่ โตเร็ว รสหวาน (เรณูและ อัศจรรย์ 2542) ไผ่ทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ถูกนำมาทดสอบด้วยวิธี RAPD ซึ่งวิธีการต่างๆได้กล่าวมาแล้วข้างต้น และลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ ดังรูปที่ 5 และ 6



รูปที่ 5 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของไผ่ลักษณะดี 5 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPAE07

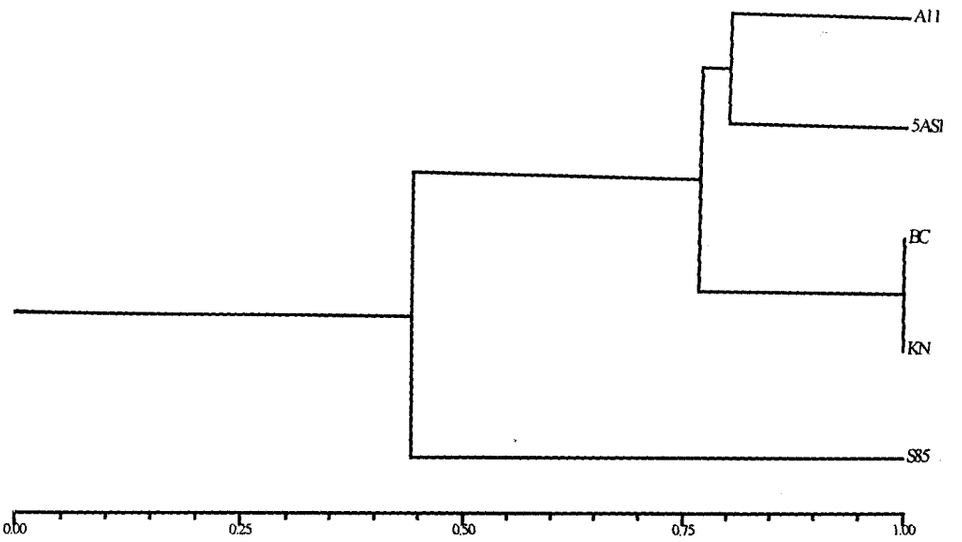
Lane M: 100 bp marker ladder, BC=บุญช่วย, KN= คะนอง และ N= negative control



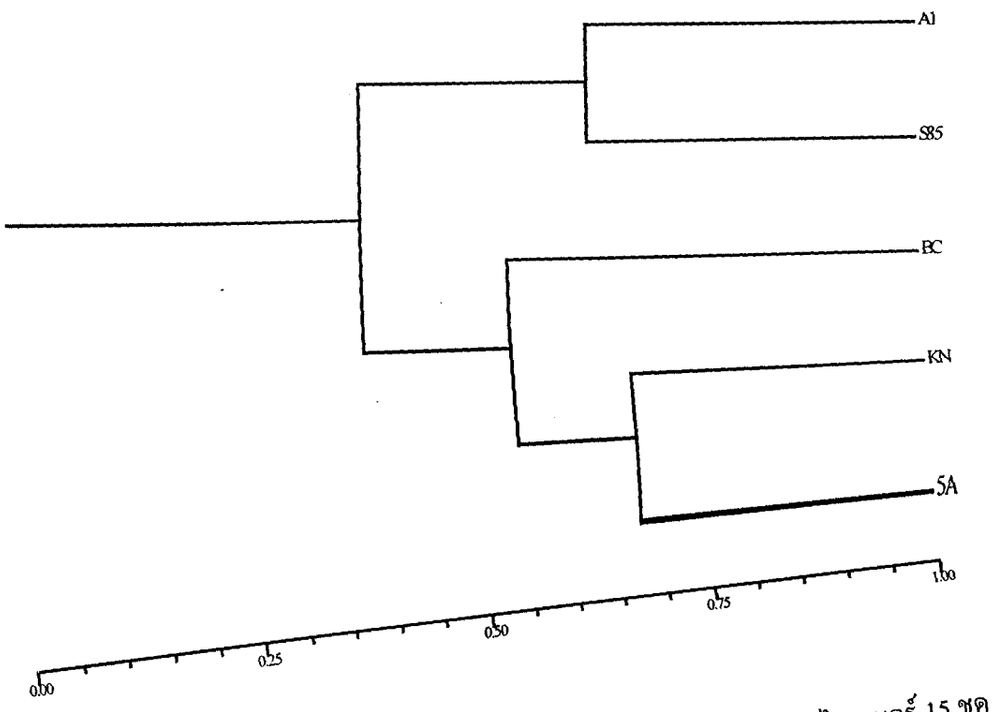
รูปที่ 6 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของไผ่ลักษณะดี 5 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPL01

Lane M: 100 bp marker ladder, BC=บุญช่วย, KN= คะนอง และ N= negative control

จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ ซึ่งผลที่ได้จะสอดคล้องกับผลข้างต้น คือเมื่อเราใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ชุดเดียวเราไม่สามารถแยก 5 สายพันธุ์ดีออกจากกันได้โดยดูได้จากรูปที่ 7 เมื่อเราใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ OPL 20 เราจะไม่สามารถแยกกลุ่มของไผ่ตง บุญช่วยและ คะนองออกจากกันได้ แต่เมื่อนำข้อมูลจากไพรเมอร์ 15 ชุดเข้าด้วยกันแล้ว เราจะสามารถแยกไผ่แต่ละกลุ่มออกจากกันและบอกได้ว่าสายพันธุ์ใดมีความใกล้เคียงมากน้อยเพียงใด ดังรูปที่ 8



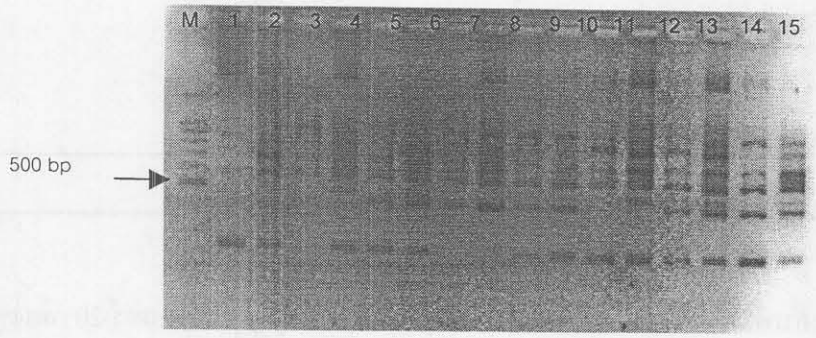
รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียว 5 สายพันธุ์ดี โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ 20 เพียงชุดเดียว



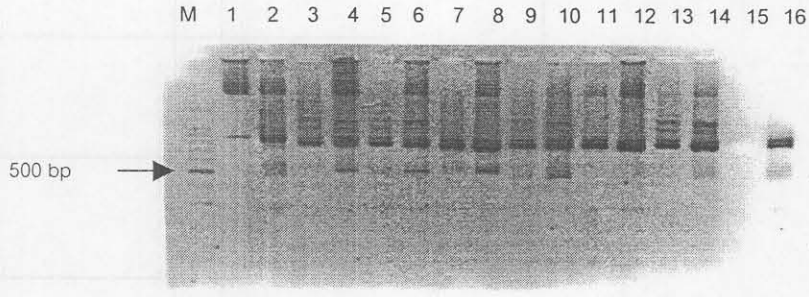
รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียว 5 สายพันธุ์ดี โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ 15 ชุด

การยืนยันผลด้วยวิธี RAPD

หลังจากหาความสัมพันธุ์ของไผ่ตงเขียวด้วยวิธี RAPD แล้วได้มีการศึกษาถึงการทดลองทำซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันผลที่ได้ จากผลการยืนยันพบว่า มีเฉพาะบางไพรเมอร์ (OPAE1, OPL15, OPL18, OPL20และOPS 9) ที่สามารถใช้ยืนยันผลได้โดยดูได้จากรูปที่ 9 และ 10 ตามลำดับ โดยส่วนใหญ่ผลการทดลองอันใหม่ที่ออกมาค่อนข้างจะแตกต่างจากการทดลองเดิม



รูปที่ 9. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปรียบเทียบผลอันเก่าและอันใหม่โดยใช้ไพรเมอร์ OPAE 01 Lane M; 100 bp marker ladder, Lane 1; A11 เก่า และ Lane 2; A11 ใหม่, Lane 3; A13 เก่าและ Lane 4; A13 ใหม่, Lane 5;A15 เก่า และ Lane6; A15 ใหม่, Lane 7; A25 เก่า และ Lane 8; A25 ใหม่, Lane 9; A27 เก่า และ Lane 10; A27 ใหม่, Lane 11; A31 เก่า และ Lane; 12 A31 ใหม่, Lane 13; A32 เก่า และ Lane 14; A32 ใหม่ , Lane 15; A34 เก่า และ Lane 16; A34 ใหม่.



รูปที่ 10. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอเปรียบเทียบผลอันเก่าและอันใหม่โดยใช้ไพรเมอร์ OPL 20 Lane M; 100 bp marker ladder, Lane 1; A11 เก่า และ Lane 2; A11 ใหม่, Lane 3; A13 เก่า และ Lane 4; A13 ใหม่ Lane 5;A15 เก่า และ Lane6; A15 ใหม่, Lane 7; A25 เก่า และ Lane 8; A25 ใหม่, Lane 9; A27 เก่า และ Lane 10; A27 ใหม่, Lane 11; A31 เก่า และ Lane; 12 A31 ใหม่, Lane 13; A32 เก่า และ Lane 14; A32 ใหม่ , Lane 15; A34 เก่า และ Lane 16; A34 ใหม่.

เนื่องจากเทคนิค RAPD มีข้อจำกัดมากมาย ดังนั้นเทคนิค AFLP จึงถูกนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหาของ RAPD

การวิเคราะห์ผลด้วยวิธี AFLP

ไผ่ตงเขียว 23 สายพันธุ์ถูกคัดเลือกมาจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี(A11, A13, A15, A22, A25, A27, A31, A32, A34, A41, A42, A51, SUT 7, SUT 23, SUT 25, SUT 28, SUT 33, SUT 35, BC, KN, SA, 5AS1 และ S85) และ 2 กลุ่มที่ไม่ใช่ตงเขียวถูกนำมาเปรียบเทียบ คือ ไผ่รวก *(Thyrosostachys. Siamensis)* และ ไผ่ตงดำ (*D. asper* Tong Daum)

สำหรับการทดสอบหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ตงด้วยวิธี AFLP นี้ เนื่องจาก AFLP ยังเป็นเทคนิคใหม่ ดังนั้นจึงเริ่มต้นการทดลองด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปจากบริษัท GIBCO (cat. No. 10544) โดยขั้นแรกจะทดลองหาไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมากที่สุด และให้ความแตกต่างมากที่สุด รวมถึงการหาสถานะที่เหมาะสมของสารประกอบในกระบวนการต่างๆ ด้วย

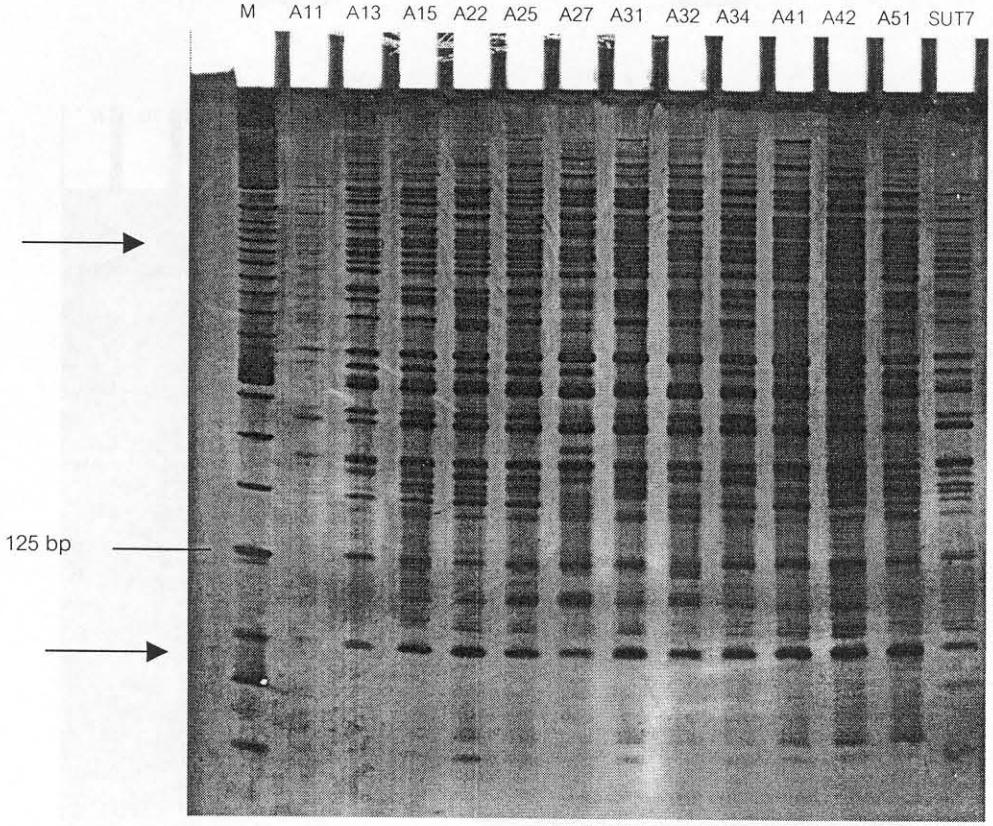
ผลที่ได้เมื่อ screen ไพรเมอร์จากทั้งหมด 64 คู่ ก็จะได้ไพรเมอร์ที่ดีที่สุด 12 คู่ จากตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนไพรเมอร์, ลำดับ, จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเกตได้ และขนาดของดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี AFLP

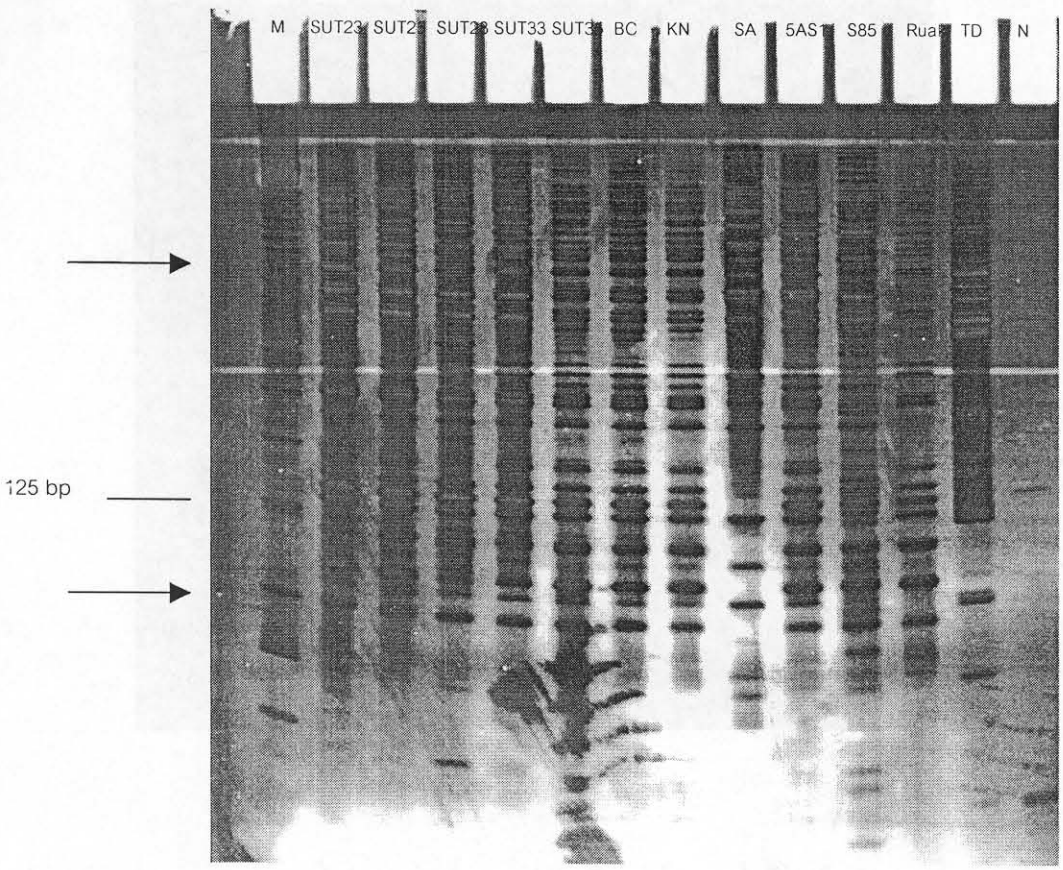
คู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้	ลำดับของไพรเมอร์ 5' ถึง 3'	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเกตได้	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พบโดยประมาณ (bp)
1. M-CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC	8	100-2000
E-ACA	GACTGCGTACCAATTCACA		
2. M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA	14	50-2500
E-ACC	GACTGCGTACCAATTCACC		
3. M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA	11	100-2500
E-AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG		
4. M-CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC	8	50-2000
E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC		

คู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้	ลำดับของไพรเมอร์ 5' ถึง 3'	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเกตได้	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พบโดยประมาณ (bp)
5. M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT	18	25-2600
E-AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG		
6. M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAACTC	10	125-2000
E-AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG		
7. M-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG	13	50-2600
E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC		
8. M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG	18	500-2600
E-ACC	GACTGCGTACCAATTCACC		
9. M-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG	15	100-1000
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG		
10. M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA	10	100-200
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG		
11. M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG	11	50-2500
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG		
12. M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAACTC	12	100-1000
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG		

หลังจากเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดได้จากนั้นก็ทดลองกับไผ่ทุกสายพันธุ์ แล้วนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ ซึ่งผลที่ได้จากการย้อมด้วยสาร silver nitrate จะแสดงดังรูปที่ 10a และ 10b



รูปที่ 10a แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นของไผ่ตงเขียว 23 สายพันธุ์จากฟาร์ม มทส. และ 2 สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ตงเขียว โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 8 จากตาราง ที่ 2 ; Lane M = 25 bp marker
(บริเวณที่อยู่เหนือลูกศรด้านบนและต่ำกว่าลูกศรด้านล่างจะไม่ถูกนำไปวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์)

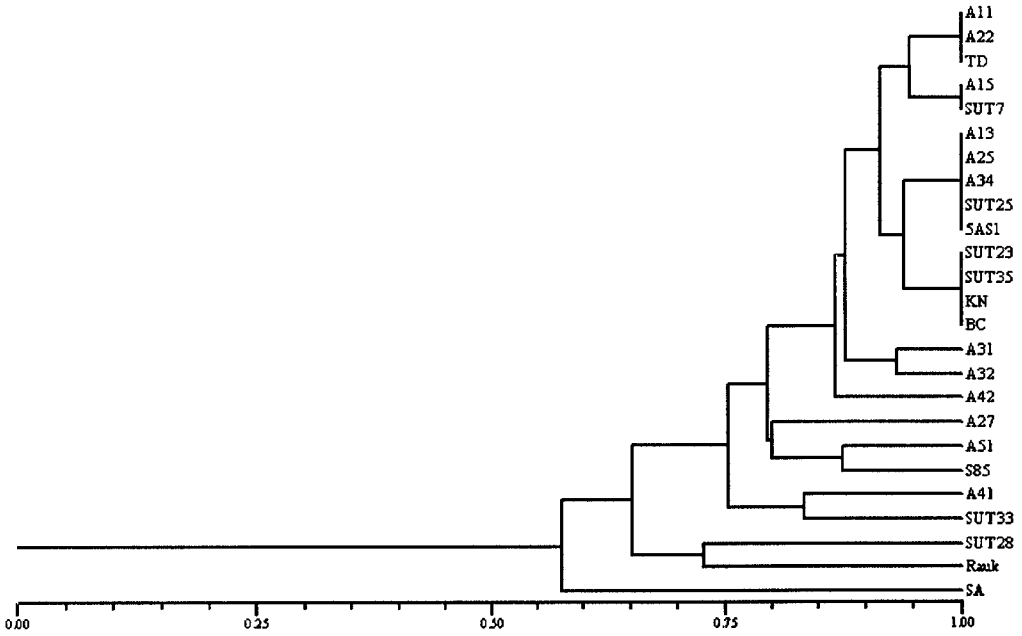


รูปที่ 10b แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นของไผ่ตงเขียว 23 สายพันธุ์จากฟาร์ม มทส. และ 2 สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ตงเขียว โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 8 จากตาราง ที่ 2; Lane M = 25 bp marker, Lane N= negative control

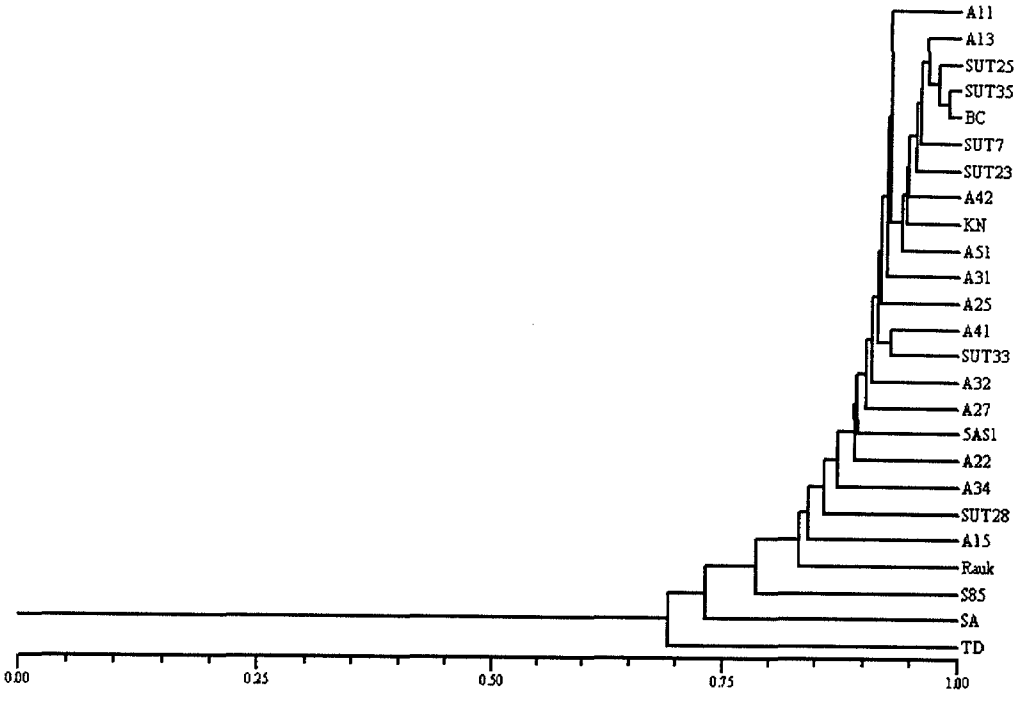
จากรูปจะเห็นว่าการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี AFLP จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นมากกว่าวิธีทาง RAPD ดังนั้นเวลาเรานำข้อมูลที่ได้ไป score เพื่อนำเข้าวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ บริเวณที่อยู่เหนือลูกศรด้านบน และต่ำกว่าลูกศรด้านล่าง จะไม่ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย เนื่องจากมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถี่เกินไป และจางเกินไป อาจจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้

หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เหมือนวิธีการของ RAPD โดยจากผลการวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียว คือ ไพรเมอร์คู่ที่ 8 จากตารางที่ 2 จะพบผลที่ออกมาเหมือน RAPD คือไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ของแต่ละสายพันธุ์ได้ ดังตัวอย่างรูปที่ 11 จะเห็นว่า กลุ่มที่เหมือนกันเปรียบเสมือนพันธุ์เดียวกันคือ A11, A22, ตงดำ และ A13, A25, A34, SUT 25, 5AS1 และ SUT23, SUT35, คะนอง, บุญช่วย แต่หลังจากที่รวม

ข้อมูลจากไพรเมอร์ทุกคู่จากตารางที่ 2 แล้วพบว่า สามารถแยกไผ่ทุกสายพันธุ์ออกจากกันได้ และแสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดของแต่ละสายพันธุ์ด้วย ดังรูปที่ 12



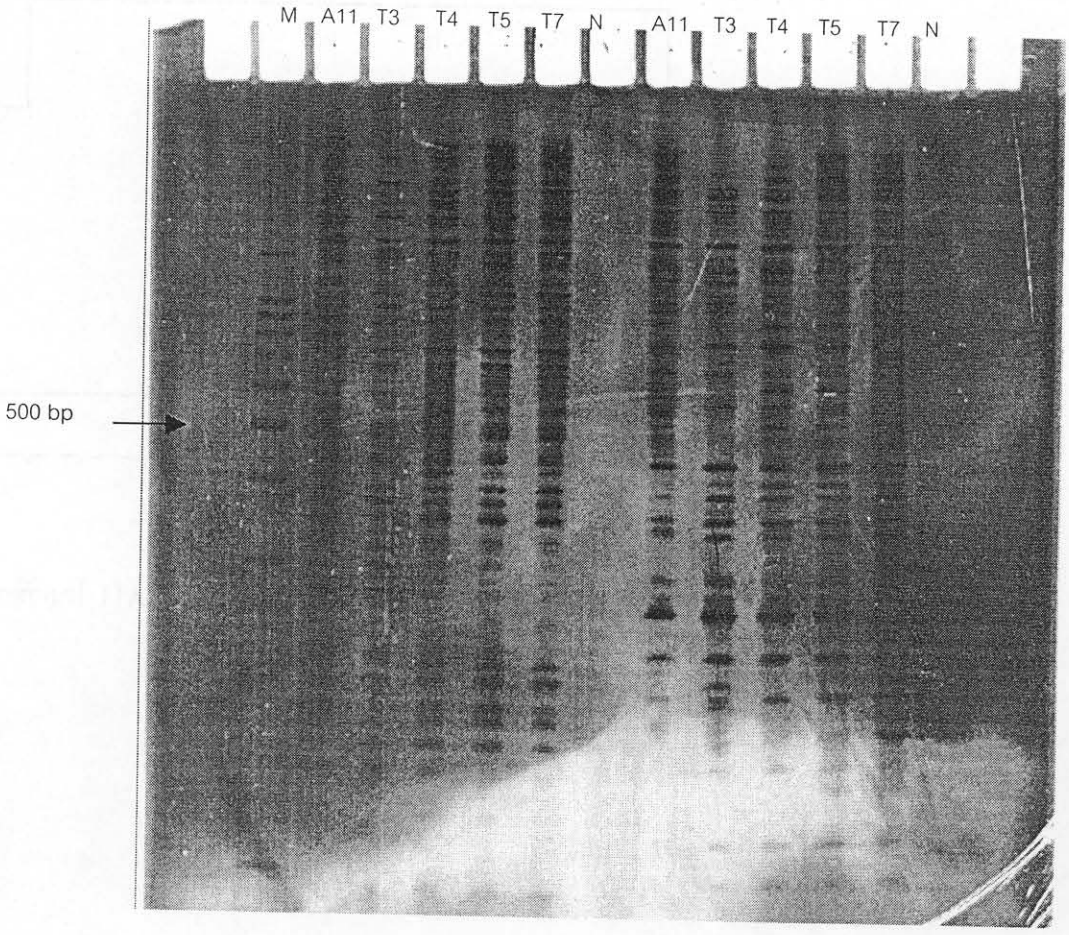
รูปที่ 11. แสดงความสัมพันธ์ของไผ่แต่ละสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์เพียงคู่เดียวคือ คู่ที่ 8 จากตารางที่ 2



รูปที่ 12. แสดงความสัมพันธ์ของไผ่แต่ละสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ทุกคู่ ที่แสดงใน ตารางที่ 2

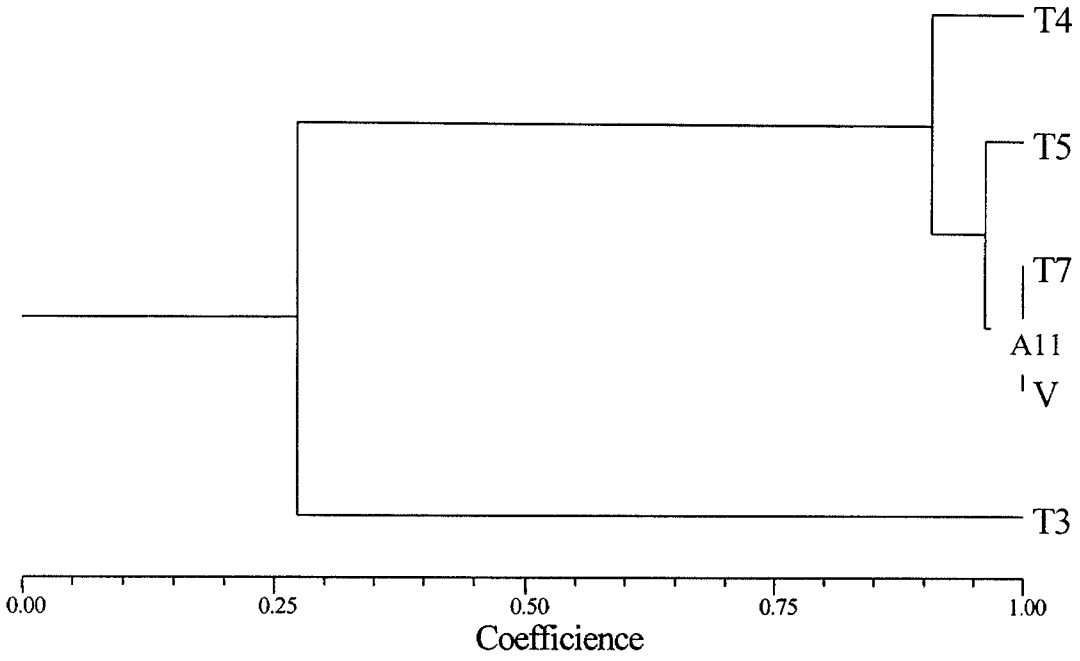
การหาความสัมพันธุ์ของไผ่ตงจากตัวอย่างไผ่ที่ไม่ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมมาก่อน (unknown) โดยใช้เทคนิค AFLP

เนื่องจากอาจารย์เรณู ขำเลิศ ให้วิเคราะห์พันธุ์ไผ่ตงที่ไม่รู้สายพันธุ์มาก่อนด้วยวิธี AFLP (ทดลองกับ ไพรเมอร์ที่ 9, 10, 11, และ 12 จากตารางที่ 2) จากไผ่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (T3, T4, T5 และ T7) โดยนำมาเทียบกับ A11 ที่เรามีอยู่ ผลที่ได้เป็นดังรูปที่ 13



รูปที่ 13. แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเทียบกับA11 โดยใช้ไพรเมอร์ คู่ที่ 11 และ 12 จากตารางที่ 2

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการรวมข้อมูลจากไพรเมอร์ทั้ง 4 ชุดด้วยกันจะพบว่า ไผ่จากการเพาะเลี้ยง T3 มีความแตกต่างจากพันธุ์อื่นโดยสิ้นเชิง แต่ไผ่จากการเพาะเลี้ยง T4, T5 และT7 มีความใกล้เคียงกับสายพันธ์ A11 มาก เราจึงสามารถสรุปได้ว่า T4, T5 และT7 น่าจะเป็นพันธุ์ A11 ส่วน T3 ไม่ใช่ A11 แน่นอน จะเห็นความสัมพันธ์ได้จากรูปที่ 14



รูปที่ 14. แสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กับพันธุ์ A11 โดยวิธีการ AFLP

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD; Random Amplified Polymorphic DNA) สำหรับหาความสัมพันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตค่อนข้างจะเป็นที่แพร่หลายเพราะอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ใช้ต้นทุนค่อนข้างต่ำ และที่สำคัญเราไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการศึกษามาก่อน เหมือนเทคนิคอื่นๆ เช่น อาร์เอฟแอลพี (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) หรือ เอสเอสอาร์ (SSR; Simple Sequence Repeat) เนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นการใช้ไพรเมอร์คู่สั้นๆจึงทำให้เกิดข้อจำกัดมากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งความ sensitive ของเทคนิค นั่นคือ ถ้าเราเปลี่ยน parameter ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นเครื่องพีซีอาร์ ก็จะทำให้การยืนยันผลเปลี่ยนไปได้ (Loudon et al., 1994) นอกจากนี้ Meunier และคณะ., 1993 ยังรายงานว่า การเปลี่ยนเอนไซม์ *Taq* polymerase ที่ใช้ในกระบวนการเพิ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ยังมีผลต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดและจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไปด้วย แต่ถึงอย่างไรก็ยังมีรายงานถึงผลสำเร็จของการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโมเลกุลบ่งชี้และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆด้วย เช่นจากการรายงานของ Newton และ Graham., 1994 ว่าใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นผลสำเร็จในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Bacillus thuringiensis* และ จากรายงานของ Deragon และ Landry., 1992 ยังใช้อาร์เอพีดีในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชนิดต่างๆ เช่น สตอเบอรี่ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เล่ย์ ถั่วเหลือง มะเขือเทศ มันฝรั่ง และข้าวโพดอีกด้วย ดังนั้น RAPD จึงถูกนำมาใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โมเลกุลบ่งชี้ และความสำคัญทางพันธุกรรมของไผ่ตงเขียวในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้

จากการทดลองการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โมเลกุลบ่งชี้ และความสำคัญทางพันธุกรรมของไผ่ตงเขียวในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจากการใช้ไพรเมอร์มากกว่า 2 ชุด จากตารางที่ 2 และ ผลจากรูปที่ 4 พบการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถหาความสัมพันทางพันธุกรรมของไผ่ตงเขียวในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีได้ โดยสาเหตุที่ต้องใช้ข้อมูลมากกว่า 2 ชุดนั้นเนื่องจากทางทีมวิจัยได้ลองใช้ข้อมูลจากไพรเมอร์ชุดเดียวเพื่อหาความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียวแล้วพบว่าจากข้อมูลชุดเดียวไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียวแต่ละสายพันธุ์ได้ โดยส่วนใหญ่ยังถือได้ว่าเป็นพันธุ์เดียวกัน หรืออยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ดังรูปที่ 3) จากนั้นทางทีมวิจัยได้มีการยืนยันและหาความสัมพันธ์ของไผ่ตง 5 สายพันธุ์ที่มีลักษณะดี (รสหวาน หน่อใหญ่ และหน่อดก) โดยได้

ทดลองเหมือนการทดลองกับไผ่ตง 18 สายพันธุ์ และใช้ไพรเมอร์คู่ที่ให้ผลดี แล้วพบว่าสามารถใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ตงเขียวกับ 5 สายพันธุ์ดีได้

แต่เนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิคอาร์เอพีดีคือการทำผลซ้ำเพื่อยืนยันผลค่อนข้างจะมีประสิทธิภาพต่ำ คือเราไม่สามารถยืนยันผลเดิมได้ 100% หรือในระดับที่น่าเชื่อถือ โดยจากการลองทำผลซ้ำจากไพรเมอร์หลายคู่จากตารางที่ 1 กับหลายสายพันธ์แล้วพบว่ามีไพรเมอร์เพียงบางคู่เท่านั้นที่สามารถยืนยันผลได้มากกว่า 70% นั่นคือไพรเมอร์คู่ที่ 3, 5, 6, 7 และ 23 จากตารางที่ 2 และจากรูปที่ 9 และ 10 ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหาการยืนยันผลซ้ำของอาร์เอพีดี ทางคณะผู้วิจัยจึงหาเทคนิคใหม่ที่มีประโยชน์เหมือนอาร์เอพีดี แต่สามารถแก้ปัญหาการยืนยันผลของอาร์เอพีดีได้ นั่นคือเทคนิคที่เรียกว่า เอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism)

เอเอฟแอลพี เป็นอีกเทคนิคนึงในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หาโมเลกุลบ่งชี้ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เช่นเดียวกับอาร์เอพีดี และเป็นเทคนิคใหม่ที่รวมเอาเทคนิคอาร์เอพีดี และอาร์เอฟแอลพีเข้าด้วยกัน โดยจะรวมผลประโยชน์ของทั้งสองเทคนิคและลดปัญหาที่เกิดขึ้นกับทั้งสองเทคนิคเช่นกัน นั่นคือไม่ต้องรู้ลำดับเบสดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาเหมือนอาร์เอพีดี แต่สามารถยืนยันผลซ้ำได้เหมือนอาร์เอฟแอลพี แต่ต้นทุนที่ใช้ต่ำกว่าอาร์เอฟแอลพี แต่ข้อจำกัดอย่างหนึ่งของ เอเอฟแอลพีที่ทางผู้วิจัยได้พบคือ เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีแบบปลอดรังสี นั่นคือย้อมเจลที่ได้ด้วยสารซิลเวอร์ น้ำที่ใช้ในการทดลองจะต้องเป็นน้ำDeionize water หรือน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นมาอย่างดีเท่านั้น มิเช่นนั้นจะทำให้ผลเจลที่ได้ไม่ชัดเจน และการวิเคราะห์ผลโดยการ score ชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นค่อนข้างลำบาก แต่ถึงอย่างไรด้วยข้อดีของเทคนิคเอเอฟแอลพีหลายๆข้อ ดังนั้นเอเอฟแอลพี จึงยังถูกนำมาใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หาโมเลกุลบ่งชี้ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ตงเขียวจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทั้ง 23 สายพันธุ์ และ 2 สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ตงเขียว (ตงดำ และไผ่รวก) ก็ถูกนำมาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบเช่นกัน โดยไพรเมอร์คู่ที่ใช้จะดูได้จากตารางที่ 2 และจะเห็นผลความสัมพันธ์จากการรวมข้อมูลจากทุกไพรเมอร์ได้จากรูปที่ 12

จากรูปแสดงความสัมพันธ์ของไผ่ตงเขียว และ ที่ไม่ใช่ตงเขียว จะพบว่าไผ่ตงเขียวแต่ละสายพันธุ์ค่อนข้างที่จะมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม และเป็นที่น่าแปลกใจอย่างหนึ่งคือจากการทดลองเปรียบเทียบกับไผ่รวก และ ตงดำแล้วพบว่า แทนที่ตงดำจะมีความใกล้กับตงเขียว แต่กลับกลายเป็นว่าไผ่รวกมีความใกล้ชิดมากกว่า โดยจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับตงเขียวได้เลย ซึ่งจากผลดังกล่าวนี้ทำให้เราสรุปได้ว่า เราไม่สามารถคาดคะเนความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้จากลักษณะภายนอก หรือจากการคาดคะเนความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเช่นตงเขียวกับตงดำที่น่าจะอยู่ในกลุ่มเดียวกันเพราะเป็นไผ่ตงเหมือนกัน นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังได้นำ

ข้อมูลทางกายภาพของไผ่ตงเขียวจากฟาร์มมหาวิทยาลัยที่มีการบันทึกข้อมูล การแตกกอ ขนาดของหน่อ รสชาด ลักษณะของใบ ปล้อง ขน เป็นต้น เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบลักษณะความสัมพันธ์และหาความสอดคล้องกับข้อมูลทางพันธุกรรม ปรากฏว่าไม่พบความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกันอย่างสิ้นเชิง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลทางกายภาพต้องอาศัยความรู้ ความชำนาญ เป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางโมเลกุลลาร์เพื่อหาความสัมพันธ์ ของสิ่งมีชีวิตที่ได้ผลดีและแน่นอนกว่า

นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานของการใช้เทคนิค เอเอฟแอลพีกับการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น Vos และคณะ., 1995 ที่ใช้เอเอฟแอลพีในการหา point mutation (addition, deletion, และ insertion) ของสิ่งมีชีวิต และ Huys และคณะ 1996 และ Jiang และคณะ., 1999 ยังรายงานว่าสามารถใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี ในการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* เช่นเดียวกับการรายงานของ Arias และคณะ., 1997 นอกจากนี้ Janssen และคณะ., 1996 และ Kein และคณะ., 1997 ยังเปรียบเทียบการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพีในการหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ด้วย

จากการรายงานดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าทั้งเทคนิค อาร์เอพีดี และ เอเอฟแอลพี สามารถใช้หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หาโมเลกุลบ่งชี้ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงใช้ทั้งสองเทคนิคนี้ทำการทดลองหาความสัมพันธ์ของไผ่ตงจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยนี้ถือว่าเป็นการวิจัยเบื้องต้นเกี่ยวกับข้อมูลทางพันธุกรรมของไผ่ตงเขียว (*Dendrocalamus asper*) ซึ่งจากการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพีแล้วพบว่า ทั้งสองเทคนิคนี้สามารถทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ได้ ซึ่งสามารถสรุปได้เป็นข้อๆดังต่อไปนี้

1. การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ใช้เป็นโมเลกุลบ่งชี้ และสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ตงทั้ง 18 สายพันธุ์ได้
2. 5 สายพันธุ์ที่มีลักษณะดีของไผ่ตงเขียว (รสหวาน หน่อใหญ่ และหน่อดก) สามารถถูกนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีเช่นเดียวกัน
3. ด้วยข้อจำกัดของเทคนิคอาร์เอพีดี เทคนิคเอเอฟแอลพีจึงถูกนำมาใช้แทน และ หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ใช้เป็นโมเลกุลบ่งชี้ และ สามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ตงเขียวทั้ง 23 สายพันธ์และสองสายพันธ์ที่ไม่ใช่ตงเขียวได้
4. เทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ที่ไม่รู้สายพันธุ์มาก่อนได้ เช่นจากการนำไผ่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทดสอบเทียบกับพันธุ์ที่ทราบอยู่แล้ว พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้

ดังนั้นเทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี จึงเป็นเทคนิคที่สามารถประยุกต์กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ เพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ใช้เป็นโมเลกุลบ่งชี้ และสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้นอกจากนี้หากเกษตรกรต้องการจะพิสูจน์ว่าไผ่ของตนมีความสัมพันธ์กับไผ่จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี หรือ จากแหล่งอื่น ยังสามารถใช้เทคนิคทั้งสองนี้พิสูจน์ได้

หนังสืออ้างอิง

คำนึง คำอุดม. 2542. หน่อไม้ไผ่ตง. สำนักพิมพ์เกษตรกรรม, กรุงเทพมหานคร.

สมปอง สุคนสิทธิ์. 2544. การปลูกไผ่ตง. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. สำนักพิมพ์เกษตรสาส์น. นนทบุรี.

สุทัศน์ เดชวิสิทธิ์. 2544. การปลูกไม้ไผ่. สำนักพิมพ์เกษตรสาส์น. นนทบุรี.

Arias, C., Verdonck, L., Swings, J., Aznar, R., and Garay, E. (1997). A polyphasic approach to study the intra specific diversity amongst *Vibrio vulnificus* isolates. **Syst. Appl. Microbiol.** 20: 622-633.

Cusack, V. (1999). Bamboo World. Kyodo Printing Co. Pte Ltd. Australia.

Deragon, J. M., and Landry, B. S. (1992). PCR Methods Appl; 1. 175.

Ellwoth, D. L., Rittenhouse, K. D., and Honeycutt, R. L. (1993). Artifactual variation in Random amplified polymorphic DNA banding patterns. **Biotechniques**. 14: 214-217.

GENSET Singapore Biotech. Pte Lld. Primers synthesize.

GibcoBRL. (2001). AFLP Analysis System I Kit. (Cat No. 10544).

Goto, S., Thakur, R. C., and Ishii, K. (1998). Determination of genetic stability in long-term micropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. Using RAPD markers. **Plant Cell Reports**. 18: 193-197.

Huys, G., Coopman, R., Janssen, P., and Kersters. K. (1996). High-resolution genotypic analysis of the genus Aeromonas by AFLP fingerprinting. Int. **J. Syst. Bacteriol**. 46: 572-580.

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., and Kersters, K. (1996). Evalution of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**. 142: 1881-1893.

Jiang, S. C., Matte, G., Mattee, G., Huq, A., and Colwell, R. R. (1999). Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibiro cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Appl. Environ. Microbiol**. 66: 148-153.

Kasetsart University. (2000). Nonradioactive AFLP Techniques Workshop. 17-20 October 2000. Department of Genetic faculty of science. Bangkok. Thailand.

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ** นางมารินา **นามสกุล** เกตุทัต-คาร์นส์

2. **รหัสประจำตัว** นักวิจัยแห่งชาติ 38-40-0999

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

4. **ประวัติการศึกษา**

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
1995	ประกาศนียบัตร	-	Industrial iotechnolog	-	Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH	เยอรมัน
1995	ปริญญาเอก	Ph.D.	Biology	lant Molecular Biology	University of California, San Diego	USA
1988	ปริญญาตรี	B.Sc.	Biology	Plant Science nd Technolog	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

5. **สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ**

- Recombinant Protein production
- Molecular Biology
- Molecular Genetics
- Transcription Factor

6 **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย**

1 Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2, 1995 หัวหน้าโครงการ

2 Purification of the Enzyme Taq DNA Polymerase หัวหน้าโครงการ

3 Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA Probe, หัวหน้าโครงการ

4 Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, ผู้ร่วมวิจัย

ประวัติผู้วิจัยร่วม

1 ชื่อ นางสาว กนกอร **นามสกุล** ศรีลุนช่าง

2 รหัสประจำตัว นักวิจัยแห่งชาติ -

3 ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

4 ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา
	ปริญญาโท	M.Sc.	Biotechnology	Plant Biotechnology	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
1998	ปริญญาตรี	B.Sc.	Animal Production	Animal Production	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5 สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

- DNA Fingerprint
- Molecular Biology

6 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย