

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน



นางสาวอาทิตย์ยา สิงห์ชัย

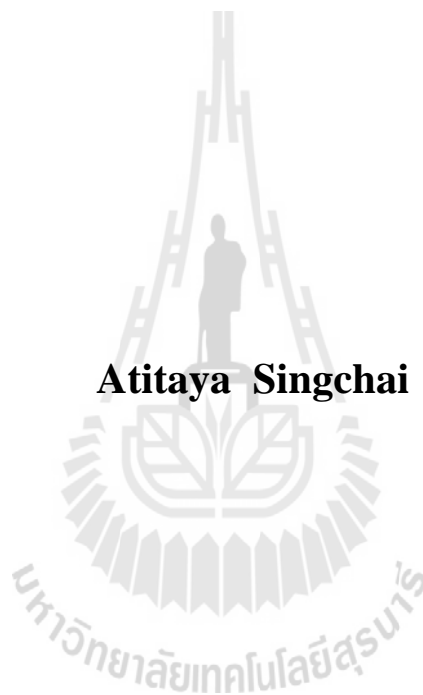
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2556

**GENETIC ANALYSIS OF HIGH OLEIC ACID
IN SUNFLOWER**



Atitaya Singchai

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science Program in Crop Science
Suranaree University of Technology
Academic Year 2013**

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักศึกษานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร. รุจ มรกต)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. จิตติพร มะณีโกวา)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(อ. ดร. ชีรยุทธ เกิดไทย)

กรรมการ

(ผศ. ดร. หนูเดือน เมืองแสน)

กรรมการ

(ศ. ดร. ชูกิจ ลิ้มปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ผศ. ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อาทิตยา สิงห์ชัย : การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน

(GENETIC ANALYSIS OF HIGH OLEIC ACID IN SUNFLOWER)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติพร มะณีโกวา, 68 หน้า.

น้ำมันทานตะวันที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูงซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว จัดเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพสูงและมีคุณสมบัติทางโภชนาการที่ดีเยี่ยม การหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการคัดเลือกลักษณะนี้ จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ และ 2) หาลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล SSR กับลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยวิธีมาตรฐาน ใช้ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง (PI 649855, 80-85เปอร์เซ็นต์) ผสมพันธุ์กับสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ (2A, 20-23 เปอร์เซ็นต์) เพื่อสร้างประชากร F_1 จากนั้นผสมตัวเองต้น F_1 เพื่อสร้างประชากร F_2 แล้วนำ 4 ประชากร ได้แก่ พันธุ์พ่อ-แม่ F_1 และ F_2 มาปลูกทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิก ผลการทดลองพบว่าประชากร F_2 มีการกระจายตัวแบบปกติ โดยประชากรส่วนใหญ่มีการกระจายตัวอยู่ในช่วง 50-70เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 64.35 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูง ส่วนที่ 2 เพื่อหาความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล SSR กับลักษณะกรดโอเลอิกสูง โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 37 ไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่า 13 ไพรเมอร์สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ จากนั้นเลือก 5 จาก 13 ไพรเมอร์มาตรวจสอบในประชากร F_2 จำนวน 90 ต้น เมื่อนำมาวิเคราะห์ลิงค์เกจโดยวิธี simple regression พบว่าจาก 5 ไพรเมอร์ มี 2 ไพรเมอร์ (ORS 311, ORS 339) ที่มีลิงค์เกจกับตำแหน่ง QTL ของลักษณะกรดโอเลอิกสูง (Sig.=0.028 และ 0.021 ตามลำดับ) ดังนั้นสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงในประชากรนี้ได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

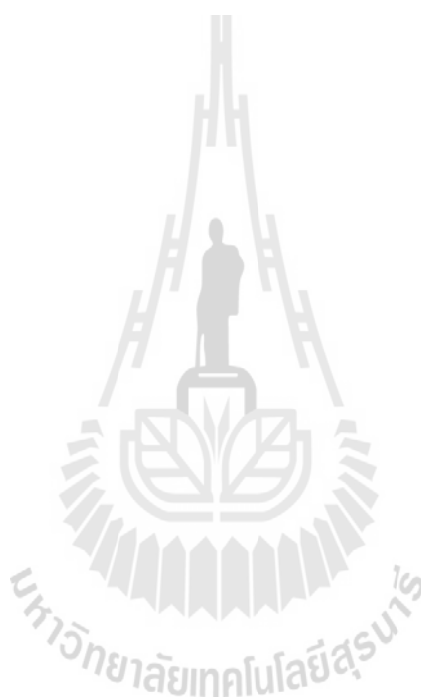
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ATTAYA SINGCHAI : GENETIC ANALYSIS OF HIGH OLEIC ACID IN
SUNFLOWER. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. THITIPORN
MACHIKOWA, Ph.D., 68 PP.

Helianthus annuus L./FATTY ACID COMPOSITION/MICROSATELLITE
/MOLECULAR MARKER

High oleic sunflower oil which classified as unsaturated fatty acid is a premium quality with high nutritional value. Identification of molecular markers for this trait would have a great impact on sunflower breeding program. The objectives of this research were 1) to identify polymorphic SSR markers between high and low oleic acid content in sunflower, and 2) to investigate the genetic linkage between SSR markers and high oleic acid trait in sunflower. This research was divided into 2 parts. The first part was conducted to analyze oleic acid by standard method. A high (PI 649855, 80-85%) and a low (2A, 20-23%) oleic acid sunflower lines were crossed to construct F₁ population. F₁ plants were then self-pollinated to develop F₂ population. Four populations including parents, F₁ and F₂ were evaluated. The segregation of oleic acid content in F₂ population showed normal distribution. High frequency of F₂ progenies was found between 50-70% of oleic acid content which had the mean (64.35%) in the medium-high level. In the second part, the association between 37 SSR markers and high oleic acid content was evaluated. The result showed that high and low oleic acid sunflower genotypes could be distinguished by 13 primers. Then, 5 out of 13 primers (N1-3F, ORS 311, ORS 339, ORS 1088 and ha 4149) were used for examination in F₂ population (90 plants). Linkage analysis was performed by simple regression, and found that 2 primers (ORS 311 and ORS 339) were associated with

QTL of high oleic acid trait (Sig. = 0.028 and 0.021, respectively). Therefore, these primers would be potentially used as markers for selection of the high oleic acid sunflower.



School of Crop Production Technology

Academic Year 2013

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย ดังนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะณีโกวา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา การช่วยเหลือ และการเอาใจใส่ทั้งทางด้านการเรียนและงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ให้จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ คำปรึกษา แนะนำ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร.ธีรยุทธ เกิดไทย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฉาณีย์ ต้นตสวัสดิ์ ผู้ให้ความรู้ คำแนะนำและคำปรึกษาในการ ทำการทดลองเป็นอย่างดี

คุณนวลปรางค์ อุทัยดา คุณสมยงค์ พิมพ์พร คุณศิริวรรณ เพชรสมบัติ เจ้าหน้าที่ประจำ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้คำปรึกษาและ อำนวยความสะดวกในการทำทดลอง

คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงษ์ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ และให้กำลังใจจนทำให้ทำการทดลองได้ สำเร็จ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้กรุณามอบทุนการศึกษา “ ทุนเรียนดี ” และสนับสนุน ทุนวิจัยส่วนหนึ่งสำหรับทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2555

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็น กำลังใจให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาที่ให้การเลี้ยงดู อบรม ส่งเสริมการศึกษาเป็น อย่างดี และเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุด ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในทุก ๆ ด้านของชีวิตด้วยดี ตลอดมา

อาทิตยา สิงห์ชัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

GC	=	Gas chromatography
SSR	=	Simple sequence repeats
SFA	=	Saturated fatty acid
MUFA	=	Monounsaturated fatty acid
PUFA	=	Polyunsaturated fatty acid
NCRPIS	=	North central regional plant introduction station
NIR	=	Near-infrared spectroscopy
bp	=	Base pair
LG	=	Linkage group
RCBD	=	Randomized complete block design
PLSR	=	Partial least square regression
MSC	=	Multiplicative scattering correction
UV	=	Ultraviolet
cM	=	centi-Morgan

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2 ทัศนวิสัยวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ความสำคัญของทานตะวัน	3
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน	4
2.3 น้ำมันทานตะวัน	7
2.4 น้ำมันทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูง.....	9
2.5 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทย	9
2.6 พันธุกรรมและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง.....	11
2.7 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช	13
2.8 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้มี ปริมาณกรดโอเลอิกสูง	15
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1	การสร้างประชากรและการวัดลักษณะทางฟีโนไทป์ ของปริมาณกรดโอเลอิก	19
3.1.1	พันธุ์ทานตะวัน	19
3.1.2	การสร้างประชากร	19
3.1.3	การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิก.....	20
3.1.3.1	การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยวิธี Gas chromatography (GC).....	20
3.1.3.2	การวิเคราะห์กรดไขมัน โดย Near-Infrared Spectroscopy (NIR).....	22
3.1.4	การวิเคราะห์การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร F_2	22
3.2	การวัดลักษณะทางจีโนไทป์ของลักษณะกรดโอเลอิกโดยใช้เครื่อง หมายโมเลกุล SSR	23
3.2.1	การแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง และต่ำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 37 ไพโรมอร์.....	23
3.2.1.1	การสกัดดีเอ็นเอ.....	23
3.2.1.2	ไพโรมอร์ที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มี กรดโอเลอิกสูงและต่ำ	24
3.2.1.3	การแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูง และต่ำโดยใช้ 37 SSR ไพโรมอร์.....	28
3.2.2	การแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงด้วย ไพโรมอร์ที่ได้จากการคัดเลือก	29
3.2.2.1	การทดสอบซ้ำ 15 ไพโรมอร์ที่ได้จากการคัดเลือก ในประชากร F_2	29
3.2.2.2	การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้น โดยใช้ 5 ไพโรมอร์.....	29

สารบัญ (ต่อ)

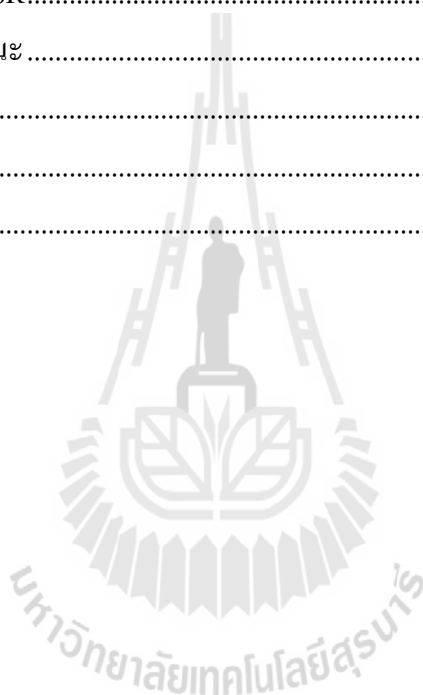
หน้า

3.3	การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่มีลิงค์เกจ (linkage) กับปริมาณกรดโอเลอิกสูง.....	29
3.3.1	การตรวจสอบลิงค์เกจระหว่างข้อมูลฟีโนไทป์กับข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยวิธี simple regression	30
3.3.2	การตรวจสอบลิงค์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงด้วยโปรแกรม Mapmaker sion.....	30
4	ผลการทดลอง	31
4.1	การวัดลักษณะทางฟีโนไทป์ของปริมาณกรดโอเลอิก	31
4.1.1	การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยวิธี Gas Chromatography	31
4.1.2	การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดย Near-Infrared Spectroscopy	32
4.1.3	การวิเคราะห์การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร F ₂	32
4.2	การวัดลักษณะทางจีโนไทป์ของลักษณะกรดโอเลอิกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR.....	35
4.2.1	การแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำโดยใช้ 37 SSR ไพรเมอร์	35
4.2.2	การแยกความแตกต่างของต้นทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำในประชากร F ₂ ด้วยไพรเมอร์ที่ได้จากการคัดเลือก	38
4.2.2.1	การทดสอบซ้ำ 15 ไพรเมอร์ที่ได้จากการคัดเลือกในประชากร F ₂	38
4.2.2.2	การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ เป็นรายต้นโดยใช้ 5 ไพรเมอร์	47
4.3	การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่มีลิงค์เกจ (linkage) กับปริมาณกรดโอเลอิกสูง.....	48
4.3.1	การตรวจสอบลิงค์เกจระหว่างข้อมูลฟีโนไทป์กับข้อมูลทางจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยวิธี simple regression	47
4.3.2	การตรวจสอบลิงค์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงที่ด้วยโปรแกรม Mapmaker	49

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5	สรุปผลการทดลอง.....	51
5.1	การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร F ₂	51
5.2	การวัดลักษณะทางจีโนไทป์ของลักษณะกรดโอเลอิกโดยใช้เครื่องหมาย โมเลกุล SSR.....	51
5.3	ข้อเสนอแนะ.....	52
	รายการอ้างอิง.....	53
	ภาคผนวก.....	58
	ประวัติผู้เขียน.....	68



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	คุณค่าทางอาหารของน้ำมันทานตะวัน..... 3
2.2	กรดไขมันในน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ..... 7
3.1	สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลอง..... 19
3.2	SSR ไพโรมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือก..... 25
3.3	องค์ประกอบในการทำ PCR..... 28
4.1	ปริมาณกรดโอเลอิกที่วิเคราะห์ได้โดย Gas Chromatography..... 31
4.2	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดโอเลอิกของประชากรต่าง ๆ ของคู่ผสม 2A x PI 649855..... 32
4.3	การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร P ₁ P ₂ F ₁ และ F ₂ 33
4.4	ปริมาณกรดโอเลอิกในทานตะวันกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ..... 38
4.5	จำนวนต้น F ₂ ที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่..... 47
4.6	ผลการวิเคราะห์ simple regression ระหว่างปริมาณกรดโอเลอิกกับข้อมูลจาก เครื่องหมายโมเลกุล SSR 5 ไพโรมอร์..... 48

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของต้นทานตะวัน	5
2.2 ภาพตัดขวางแสดงโครงสร้างของดอกทานตะวัน	6
2.3 ส่วนประกอบของเมล็ดทานตะวัน	6
2.4 โครงสร้างการเรียงอะตอมของกรดโอเลอิก (C18:1) ซึ่งเป็นกรดไขมัน ไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว	8
2.5 โครงสร้างการเรียงอะตอมของกรดลิโนเลอิก (C18:2) ซึ่งเป็นกรดไขมัน ไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน	8
3.1 ขั้นตอนในการทดลองเพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่สามารถแยก ความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ	18
3.2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ	24
4.1 การกระจายตัวของลักษณะกรดโอเลอิกในประชากร P ₁ P ₂ F ₁ และ F ₂	34
4.2 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ N1-3F ถึง ORS 309 ใน 3% agarose gel	36
4.3 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ORS 310 ถึง ORS 321 ใน 3% agarose gel	36
4.4 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ORS 322 ถึง ORS 339 ใน 3% agarose gel	36
4.5 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ha 4149 ถึง ORS 822 ใน 3% agarose gel	37
4.6 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ORS 920 ถึง ORS 488 ใน 3% agarose gel	37
4.7 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ORS 878 ถึง ORS 899 ใน 3% agarose gel	37
4.8 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรเมอร์ N1-3F ใน 2% agarose gel	42
4.9 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรเมอร์ ORS 296 ใน 2% agarose gel	42
4.10 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรเมอร์ ORS 309 ใน 2% agarose gel	42
4.11 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรเมอร์ ORS 311 ใน 2% agarose gel	43

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.12 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 319 ใน 2% agarose gel.....	43
4.13 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 321 ใน 2% agarose gel.....	43
4.14 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 333 ใน 2% agarose gel.....	44
4.15 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 337 ใน 2% agarose gel.....	44
4.16 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 339 ใน 2% agarose gel.....	44
4.17 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 371 ใน 2% agarose gel.....	45
4.18 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 488 ใน 2% agarose gel.....	45
4.19 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 598 ใน 2% agarose gel.....	45
4.20 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 822 ใน 2% agarose gel.....	46
4.21 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ORS 1088 ใน 2% agarose gel.....	46
4.22 การแยกความแตกต่างของประชากร F ₂ ด้วยไพรมอร์ ha 4149 ใน 2% agarose gel.....	46
4.23 ผลการวิเคราะห์ linkage ด้วยโปรแกรม Mapmaker.....	49

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญพืชหนึ่ง ผลผลิตของทานตะวันส่วนใหญ่อยู่ในเขตอบอุ่น ได้แก่ รัสเซีย อาร์เจนตินา และประเทศในแถบยุโรปตะวันออก ในปี พ.ศ. 2555 มีพื้นที่การปลูกทานตะวันทั่วโลกประมาณ 155,269,400 ไร่ และปริมาณการผลิตทั่วโลกประมาณ 37,449,403 ตัน ส่วนในประเทศไทยปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกทานตะวันประมาณ 190,000 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) พื้นที่ปลูกทานตะวันแหล่งใหญ่ที่สุดของไทยอยู่ในแถบภาคกลางเช่น จังหวัดลพบุรี สระบุรี ซึ่ง 2 จังหวัดนี้ มีพื้นที่ปลูกประมาณร้อยละ 60 ของประเทศ น้ำมันที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดทานตะวันมีคุณภาพสูง ประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เช่น ลิโนเลอิกและโอเลอิก

น้ำมันทานตะวันเป็นน้ำมันที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ โดยประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (ลิโนเลอิก) และเชิงเดี่ยวสูง ซึ่งน้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมักทำให้เกิดการเหม็นหืน ดังนั้นการปรับเปลี่ยนให้มีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวโอเลอิกสูงขึ้น จะทำให้น้ำมันมีความเสถียรสูงส่งผลให้การเหม็นหืนลดลง ลักษณะกรดโอเลอิกสูงในน้ำมันทานตะวันเป็นลักษณะปริมาณที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่ (polygenes) และมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะ ทำให้ความแปรปรวนของลักษณะมีลักษณะต่อเนื่อง (continuous distribution) ซึ่งการคัดเลือกโดยใช้ฟีโนไทป์ทำได้ยาก เนื่องจากการแสดงออกของลักษณะมีทั้งลักษณะทางพันธุกรรม และมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ขั้นตอนการคัดเลือกในแต่ละชั่วอายุต้องทราบปริมาณกรดโอเลอิกในเมล็ดของแต่ละต้น เนื่องจากต้องปลูกทานตะวันจนได้เมล็ดจึงจะสามารถวิเคราะห์ได้ การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันโดยวิธีมาตรฐาน คือ Gas chromatography (GC) ถึงแม้การวิเคราะห์ให้ผลแม่นยำ แต่ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์สูง และสารเคมีที่ใช้เป็นสารเคมีอันตราย การคัดเลือกต้นทานตะวันที่เมล็ดมีปริมาณกรดโอเลอิกสูง โดยวิธีดังกล่าวมักทำได้ช้า และได้ผลไม่แม่นยำ อันเนื่องจากสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการปรากฏของลักษณะ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลจึงนับได้ว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะกรดโอเลอิกสูง มีความถูกต้องและแม่นยำสูง ในการวิจัยนี้เลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง

ทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ โดยเครื่องหมายโมเลกุล SSR สามารถแยกความแตกต่างได้สูง (highly polymorphism) สามารถแสดงลักษณะการข่มร่วมกัน (co-dominant) ได้ และขั้นตอนในการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้

1.2.2 เพื่อหาลิงค์เกจเครื่องหมายโมเลกุล SSR กับลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 สร้างประชากรทานตะวัน P_1 P_2 F_1 และ F_2 โดยผสมระหว่างสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ คือ สายพันธุ์ 2A กับพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงคือ PI 649855 แล้วแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 37 ไพรเมอร์

1.3.2 วิเคราะห์หาลิงค์เกจเครื่องหมายโมเลกุล SSR กับลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

1.4.2 พบลิงค์เกจที่เชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล SSR กับลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน เพื่อใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของทานตะวัน

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญพืชหนึ่ง น้ำมันที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดทานตะวันมีคุณภาพสูง ประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เช่น ลิโนเลอิก และโอเลอิก (ตารางที่ 2.1) ผลผลิตของทานตะวันส่วนใหญ่อยู่ในเขตอบอุ่น ได้แก่ รัสเซีย อาร์เจนตินา และประเทศในแถบยุโรปตะวันออก สำหรับประเทศไทยมีการส่งเสริมให้มีการปลูกทานตะวันเป็นอาชีพเสริมมากขึ้น (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2557) เพื่อเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอกับอุตสาหกรรมพืชน้ำมัน และความต้องการของผู้บริโภค ทั้งนี้ เพราะทานตะวันเป็นพืชที่มีอายุสั้น ระบายกรลิก ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดีกว่าพืชอื่นๆ

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางอาหารของน้ำมันทานตะวัน

Fatty acid	Traditional sunflower	High oleic sunflower
Palmitic acid (16:0)	5.0-8.0%	2.6-5.0%
Stearic acid (18:0)	2.0-7.0%	2.9-6.2%
Oleic acid (18:1)	14.0-40.0%	75.0-90.7%
Linoleic acid (18:2)	48.0-74.0%	2.1-17.0%
Linolenic (18:3)	0.1-0.8%	<0.3%
Tocopherols (mg/kg)	440-1520	450-1120

ที่มา : CODEX STAN 210-1999

ในปี พ.ศ. 2555 มีพื้นที่การปลูกทานตะวันทั่วโลกประมาณ 155,269,400 ไร่ และปริมาณการผลิตทั่วโลกประมาณ 37,449,403 ตัน สำหรับในประเทศไทยมีการส่งเสริมการปลูกทานตะวันเพื่อเป็นการค้ามาตั้งแต่ปี 2531 โดยมีพื้นที่ปลูกประมาณ 7,500 ไร่ และค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงปี 2536 มีพื้นที่ปลูกประมาณ 40,000 ไร่ จากนั้นพื้นที่ปลูกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง ปี 2547 มีพื้นที่ปลูกทานตะวันประมาณ 320,763 ไร่ ได้ผลผลิตรวมประมาณ 49,077 ตัน หรือประมาณร้อยละ 49 ของความต้องการภายในประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ซึ่งปัจจุบันความต้องการใช้

เมล็ดทานตะวันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมมีประมาณ 1,000,000 ตัน ทำให้ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศทุกปี ทั้งในรูปเมล็ดและน้ำมัน พื้นที่ปลูกทานตะวันแหล่งใหญ่ที่สุดของไทยอยู่ในแถบภาคกลาง เช่น จังหวัดลพบุรี สระบุรี มีพื้นที่ปลูกประมาณร้อยละ 60 ของประเทศ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2557)

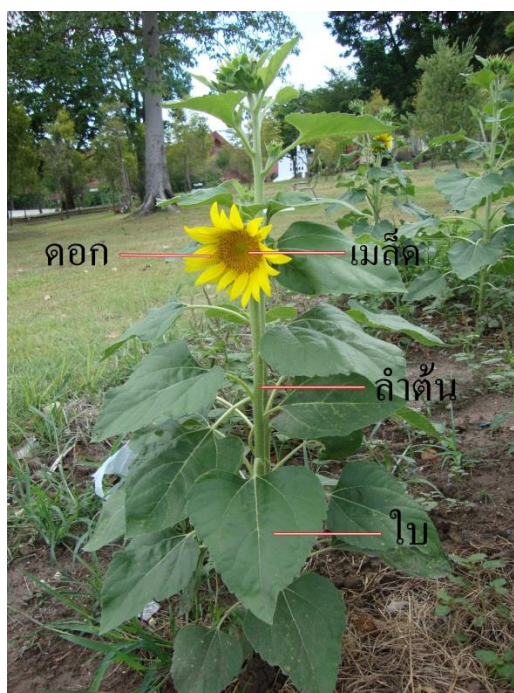
ทานตะวันเป็นพืชที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาพของเขตร้อนได้ดี ไม่ไวแสง สามารถออกดอกให้ผลได้ทุกสภาพช่วงแสง ปลูกได้ในพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวโพด ข้าวฟ่าง เมื่อทานตะวันตั้งตัวได้แล้ว จะมีความทนทานต่อสภาพแห้งและร้อนได้ดีพอสมควร และจะเริ่มเติบโตทันทีเมื่อมีฝน นอกจากนี้ทานตะวันยังมีความทนทานต่อสภาพอากาศเย็นจัดได้ดีกว่าข้าวโพด ข้าวฟ่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะต้นกล้า ทานตะวันเจริญเติบโตได้ดีในดินหลายประเภท แต่จะขึ้นได้ดีในสภาพดินที่มีฟิวดินหนาและอุ้มความชื้นไว้ได้ดี สามารถทนต่อสภาพความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ตลอดจนสภาพดินเกลือและเป็นด่างจัดได้พอสมควร ซึ่งดินเหล่านี้จะมีอยู่เป็นจำนวนมากในเขตแห้งแล้งทั่ว ๆ ไป ทานตะวันชอบอากาศอบอุ่นในเวลากลางวันและอากาศเย็นในเวลากลางคืน อุณหภูมิที่เหมาะสม คืออยู่ระหว่าง 18-25 องศาเซลเซียส ดินมีความเป็นกรดเป็นด่าง 5.7-8 มีหน้าดินลึก อุ้มน้ำได้ดี ไม่ทนต่อน้ำขัง และดินที่เป็นกรด หากดินที่ปลูกมีความชื้นต่ำจะทำให้ผลผลิตของเมล็ดจะต่ำลงมาก

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน

ทานตะวัน เป็นพืชในตระกูลเดียวกับเบญจมาศ คำฝอย ดาวเรือง (Asteraceae) เป็นพืชล้มลุกที่มีปลูกกันมากในเขตอบอุ่น การที่มีชื่อเรียกว่า “ทานตะวัน” เพราะลักษณะการหันของช่อดอกและใบจะหันไปทางทิศของดวงอาทิตย์ คือ หันไปทางทิศตะวันออกในตอนเช้า และทิศตะวันตกในตอนเย็น แต่การหันจะลดน้อยลงเรื่อย ๆ หลังจากมีการผสมเกสรไปจนกระทั่งถึงช่วงดอกแก่ ซึ่งช่อดอกจะหันไปทิศตะวันออกเสมอ ซึ่งลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวันแสดงในภาพที่ 2.1

ราก เป็นระบบรากแก้วหยั่งลึกลงไปประมาณ 150-270 เซนติเมตร มีรากแขนงค่อนข้างแข็งแรงแผ่ขยายไปด้านข้างได้ยาวถึง 60-150 เซนติเมตร เพื่อช่วยค้ำจุนลำต้นได้ดีและสามารถใช้ความชื้นระดับผิวดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลำต้น ส่วนใหญ่ไม่มีแขนง แต่บางพันธุ์มีการแตกแขนง ขนาดของลำต้น ความสูง การแตกแขนงขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม การโค้งงอของลำต้นตรงส่วนที่เป็นก้านช่อดอกมีหลายแบบแบบที่ต้องการ คือ แบบที่ส่วนโค้งตรงก้านช่อดอกคิดเป็นร้อยละ 15 ของความสูงของลำต้น พันธุ์ที่มีการแตกแขนง อาจมีความยาวของแขนงสูงกว่าลำต้นหลัก แขนงอาจแตกมาจากส่วนโคนหรือยอดหรือตลอดลำต้นก็ได้



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของต้นทานตะวัน

ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้าม หลังจากที่มีใบเกิดแบบตรงกันข้ามอยู่ 5 คู่แล้ว ใบที่เกิดหลังจากนั้นจะมีลักษณะวน จำนวนใบบนต้นอาจมีตั้งแต่ 8-70 ใบ รูปร่างของใบแตกต่างกันตามพันธุ์ สีของใบอาจมีตั้งแต่เขียวอ่อน เขียว และเขียวเข้ม ใบที่เกิดออกมาจากตาขอดีใหม่ ๆ ก้านใบจะอยู่ในแนวตั้งจนกระทั่งใบมีความยาว 1 เซนติเมตร ปลายยอดจะค่อย ๆ โค้งลงมาเมื่อใบแก่แล้วก็จะโค้งลงมาเป็นรูปตัวยู การสร้างใบจะมีมากจนกระทั่งดอกบาน หลังจากนั้นการสร้างใบจะลดน้อยลง

ดอก เป็นรูปจาน เกิดอยู่บนตาขอดีของลำต้นหลัก หรือแขนงลำต้น มีเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกอยู่ระหว่าง 6-37 เซนติเมตร ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ดอกมีลักษณะเป็นแบบช่อดอก ประกอบด้วยดอกย่อยเป็นจำนวนมากดังแสดงในภาพที่ 2.2 ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1. ดอกย่อยที่อยู่รอบนอกจานดอก เป็นดอกที่ไม่มีเพศ (เป็นหมัน) มีกลีบดอกสีเหลืองส้ม
2. ดอกย่อยที่อยู่ในจานดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้ที่พร้อมจะผสมได้ก่อนเกสรตัวเมีย และสายพันธุ์ผสมเปิดส่วนใหญ่ผสมตัวเองน้อยมาก

ในแต่ละจานดอกจะมีดอกย่อยอยู่ประมาณ 700-3,000 ดอก ในพันธุ์ที่ให้น้ำมัน ส่วนพันธุ์อื่น ๆ อาจมีดอกย่อยถึง 8,000 ดอก การบานหรือการแก่ของดอกจะเริ่มจากวงรอบนอกเข้าไปสู่ศูนย์กลางของดอก ดอกบนกิ่งแขนงจะมีขนาดเล็ก แต่ถ้าเป็นแขนงที่แตกออกมาตอนแรก ๆ ดอกจะมีขนาดใหญ่เกือบเท่ากับดอกบนลำต้นหลัก ส่วนใหญ่พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า มักจะเลือกต้นชนิดที่มีดอกเดี่ยว เพื่อความสมบูรณ์ของดอกและให้เมล็ดที่มีคุณภาพดี



ภาพที่ 2.2 ภาพตัดขวางแสดงโครงสร้างของดอกทานตะวัน

เมล็ด (หรือ ผล) ประกอบด้วยเนื้อใน ซึ่งถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเปลือกที่แข็งแรง (ภาพที่ 2.3) เมื่อผลสุก ส่วนของดอกที่อยู่เหนือรังไข่จะร่วง ผลที่มีขนาดใหญ่จะอยู่วงรอบนอก ส่วนผลที่อยู่ข้างในใกล้ ๆ กึ่งกลางจะมีผลเล็กลงเมล็ดทานตะวันแบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ คือ

1. เมล็ดใช้สกัดน้ำมัน จะมีเมล็ดเล็ก สีดำ เปลือกเมล็ดบาง ให้น้ำมันมาก
2. เมล็ดใช้รับประทาน จะมีเมล็ดใหญ่กว่าประเภทแรก เปลือกหนาไม่ติดกับเนื้อในเมล็ด เพื่อสะดวกในการแกะแล้วใช้เนื้อในรับประทาน โดยอบหรือปรุงแต่งขนมหวาน หรือทำเป็นแป้งประกอบอาหาร หรือใช้เมล็ดคั่วกับเกลือแล้วแกะเปลือกออกรับประทานเนื้อข้างในเป็นอาหารว่าง เช่นเดียวกับเมล็ดแตงโม
3. เมล็ดใช้เลี้ยงนก ใช้เมล็ดเป็นอาหารเลี้ยงนก หรือไก่โดยตรง



ภาพที่ 2.3 ส่วนประกอบของเมล็ดทานตะวัน

2.3 น้ำมันทานตะวัน

มูลค่าทางเศรษฐกิจของทานตะวันล้วนมาจากการสกัดน้ำมัน การสกัดน้ำมันจากเมล็ดทานตะวันนับได้ว่ามีมูลค่าสูงถึง 80% ของมูลค่าทั้งหมดของทานตะวัน (Fick and Miller, 1997) องค์ประกอบของน้ำมันขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ของส่วนเปลือกและความเข้มข้นของน้ำมันในเมล็ด เปอร์เซ็นต์ส่วนเปลือกของทานตะวันแต่ละสายพันธุ์อาจอยู่ในช่วง 10-60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณน้ำมันในเมล็ดอยู่ในช่วง 260-720 กรัม/กิโลกรัม เปอร์เซ็นต์ของส่วนเปลือกและปริมาณน้ำมันในเมล็ดทานตะวันของพันธุ์ที่มีปริมาณน้ำมันสูงจะอยู่ในช่วงระหว่าง 20-25 เปอร์เซ็นต์ และ 570-670 กรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (Miller and Fick, 1997) เมล็ดพันธุ์ลูกผสมส่วนใหญ่จะมีปริมาณน้ำมันในเมล็ดประมาณ 400-500 กรัม/กิโลกรัม น้ำมันทานตะวันจัดได้ว่าเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพดี เนื่องจากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (โอเลอิกและลิโนเลอิก) ไม่มีองค์ประกอบที่เป็นพิษ และมีคุณสมบัติทางโภชนาการที่ดีเยี่ยม (ตารางที่ 2.2)

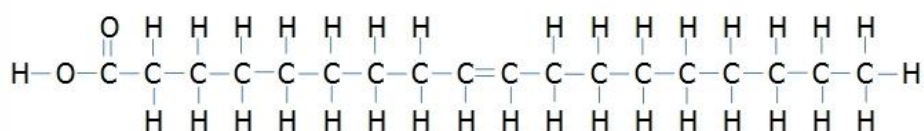
ตารางที่ 2.2 กรดไขมันในน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ

น้ำมัน	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
น้ำมันรำข้าว	18	45	37
น้ำมันมะกอก	14	77	9
น้ำมันคาโนลา	6	58	36
น้ำมันมะพร้าว	92	6	2
น้ำมันทานตะวัน	12	21	67
น้ำมันปาล์ม	50	39	10
น้ำมันถั่วเหลือง	16	24	60
น้ำมันดอกคำฝอย	10	15	75
น้ำมันข้าวโพด	13	20	62
น้ำมันถั่วลิสง	17	37	40
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	28	22	27
น้ำมันปาล์มเคอเนล	86	12	2

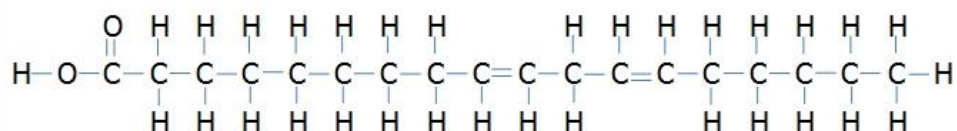
SFA = กรดไขมันอิ่มตัว, MUFA = กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว, PUFA = กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน
ที่มา : นัยนา บุญทวีวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์ (2545)

อย่างไรก็ตาม การรับประทานไขมันที่มีกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวต้องมีสัดส่วนที่เหมาะสมจึงจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพ คือ ช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด (Mensink *et al.*, 1994, Willett, 1994) หากร่างกายได้รับไขมันที่มีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวมากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน จะเกิด Oxidized LDL น้อย ซึ่งลดการเกิดหลอดเลือดแข็ง นอกจากการช่วยลดคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดการอุดตันในผนังหลอดเลือดแดงแล้ว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวยังสามารถเพิ่มหรือคงระดับคอเลสเตอรอลที่ดี หรือ HDL-C (High Density Lipoprotein Cholesterol) ที่ช่วยพาโคเลสเตอรอลในเซลล์และกระแสเลือดไปเผาผลาญได้อีกด้วย ดังนั้น กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวจึงมีส่วนช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ และยังช่วยทำให้ผนังหลอดเลือดแดงทำงานได้ดีขึ้นอีกด้วย

โดยปกติแล้วน้ำมันทานตะวันประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol) ซึ่งอยู่ในรูปของของเหลวในสภาวะอุณหภูมิห้องและมีจุดเดือดต่ำ น้ำมันดังกล่าวจะประกอบด้วยกรดไขมันชนิดหลัก ๆ ก็กรดไขมันอิ่มตัวคือ ปาล์มิติก C16:0 (70 กรัม/กิโลกรัม) และสเตียริก C18:0 (40 กรัม/กิโลกรัม) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว คือ โอเลอิก C18:1 (200 กรัม/กิโลกรัม) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนคือ ลิโนเลอิก C18:2 (690 กรัม/กิโลกรัม) โดยปริมาณของโอเลอิกและลิโนเลอิกมีสัดส่วนสูงถึง 89 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณกรดลิโนเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงถึง 680-720 กรัม/กิโลกรัม



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างการเรียงอะตอมของกรดโอเลอิก (C18:1) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างการเรียงอะตอมของกรดลิโนเลอิก (C18:2) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (ภาพที่ 2.4) เป็นกรดไขมันที่มีแขนคู่เพียง 1 ตำแหน่ง มีโอกาสถูกออกซิไดส์ เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้น้อยกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่มีแขนคู่หลายตำแหน่ง ในขณะที่กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนเป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (ภาพที่ 2.5) ซึ่งในภาวะที่มีออกซิเจน ตำแหน่งพันธะคู่จะถูกออกซิไดส์ ถ้ากรดไขมันมีตำแหน่งแขนคู่มาก จะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายมากขึ้น

น้ำมันทานตะวันที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ไม่ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมมากนัก เนื่องจากราคาที่สูงกว่าน้ำมันจากพืชชนิดอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตาม มีการใช้น้ำมันทานตะวันในการทำน้ำมันทาผิว น้ำมันเคลือบเงา และพลาสติก เนื่องจากคุณสมบัติในการแห้งเร็วของตัวน้ำมันเอง รวมไปถึงน้ำมันจากพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตเป็นกาว เคมีเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกำจัดศัตรูพืชที่เป็นสารไม่มีขั้ว (Hydrophobic pesticides) สารลดแรงตึงผิว รวมไปถึงพลาสติกและสารเติมแต่งพลาสติก น้ำมันปรับผ้านุ่ม น้ำมันหล่อลื่นสังเคราะห์และน้ำมันเคลือบ โดยในการนำน้ำมันไปใช้ประโยชน์นั้นขึ้นอยู่กับขอบเขตในด้านราคาซึ่งมีความสัมพันธ์กับเคมีปิโตรเลียมเป็นหลัก

2.4 น้ำมันทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูง

น้ำมันทานตะวันชนิดที่มีกรดโอเลอิกสูงประกอบไปด้วยกรดโอเลอิก 800 กรัม/กิโลกรัม มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวพาล์มิติกและสเตียริกที่ระดับปานกลางเท่านั้น (90 กรัม/กิโลกรัม) ทำให้น้ำมันชนิดนี้ เป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากไม่มีไขมันชนิดทรานส์เป็นองค์ประกอบซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยา hydrogenation และเนื่องจากด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนหรือเสถียรต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงทำให้น้ำมันชนิดนี้เป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ อีกทั้งยังเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมโพลีโพรพิลีน โดยมีอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเป็นอุตสาหกรรมที่รองรับการใช้งานเป็นหลัก

ในสหรัฐอเมริกา นักปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน ได้ทำการพัฒนาพันธุ์ทานตะวันที่น้ำมันมีปริมาณกรดโอเลอิกปานกลาง (550-700 กรัม/กิโลกรัม) คือ พันธุ์ NuSun® (National Sunflower Association, Bismarck, North Dakota) ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีกว่าน้ำมันจากพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง และคาโนลา โดยน้ำมันที่ได้จากทานตะวันพันธุ์นี้ไม่จำเป็นต้องผ่านการเติมไฮโดรเจน

2.5 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทย

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันมีวัตถุประสงค์หลักคือ เพื่อเพิ่มผลผลิต และเปอร์เซ็นต์น้ำมัน โดยการปรับปรุงพันธุ์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การนำพืชมาจากแหล่งอื่น หรือการรวบรวมพันธุ์ โดยเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะตรงตามต้องการจากแหล่งที่มีอยู่จากบริเวณใกล้เคียง หรือนำมาจากต่างประเทศ (introduction) ใช้เป็นพ่อแม่เพื่อการผสมพันธุ์ ต้นไม้ที่นำเข้ามาจะต้องปราศจากโรคแมลงศัตรูพืช และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้ เช่น เสาวรี ตังสกุล และคณะ (2553) ทำการรวบรวมพันธุ์ทานตะวันที่มีปลูกภายในประเทศ ทั้งพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์ผสมเปิด ได้จำนวน 60 พันธุ์/สายพันธุ์ จากนั้นนำพันธุ์ที่ได้มาปลูกและคัดเลือกจากลักษณะดีเด่นของสายพันธุ์ได้จำนวน 40 พันธุ์/สายพันธุ์ นำพันธุ์ที่ได้ทั้งหมดมาสร้างสายพันธุ์แท้โดยการปลูกให้ผสมตัวเอง (selfing) จำนวน 4 รอบ เพื่อให้มีความเป็นพันธุ์แท้ (homozygous) มากขึ้น จนได้สายพันธุ์แท้ชั่วที่ 4 (S_4 inbred line) จำนวน 76 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการรวมตัวและคัดเลือกจนได้พันธุ์แท้ดีเด่น 8 สายพันธุ์ซึ่งมีความสามารถในการรวมตัวสูงและให้ลูกที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี นำสายพันธุ์ที่ได้มาสร้างเป็นพันธุ์สังเคราะห์ได้ 1 พันธุ์

2. การคัดเลือกพันธุ์ เป็นการคัดเลือกพันธุ์ให้ตรงตามความต้องการจากพันธุ์ที่มีรวบรวมไว้แล้วนำมาปลูกและใช้เป็นพ่อแม่ในการผสมพันธุ์ โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ทำการพัฒนาทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์โดยสกัดสายพันธุ์จากพันธุ์ทานตะวันที่ปลูกในประเทศไทย ทดสอบสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (GCA) และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง จากนั้นจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ตามเปอร์เซ็นต์น้ำมันแล้วทำการผสมพันธุ์ภายในกลุ่ม จนได้พันธุ์สังเคราะห์ 6 พันธุ์ และจากการทดสอบผลผลิต พบว่าผลผลิตอยู่ในระดับที่น่าพอใจ มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันใกล้เคียงกับพันธุ์แปซิฟิก 33 โดยเฉพาะพันธุ์สังเคราะห์ High Oil Open และ Medium Oil Cross ซึ่งได้ขอรับรองพันธุ์จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และให้ชื่อพันธุ์สุรนารี 471 และสุรนารี 473 ตามลำดับ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2548) ฐิติพร มะณีโกวา (2554) ทำการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ โดยทำการคัดเลือกเพื่อเพิ่มความสม่ำเสมอของลักษณะต่าง ๆ ของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์จำนวน 4 พันธุ์ โดยใช้การคัดเลือก 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 คัดเลือกแบบ mass selection โดยคัดเลือกก่อนการผสมพันธุ์ 1 รอบ วิธีที่ 2 คัดเลือกแบบ mass selection จำนวน 2 รอบ โดยคัดเลือกก่อนการผสมพันธุ์ 1 รอบ และหลังการผสมพันธุ์อีก 1 รอบ วิธีที่ 3 คัดเลือกแบบ mass selection โดยคัดเลือกหลังการผสมพันธุ์ 2 รอบ ใช้การคัดเลือกแบบแปลงย่อย ร่วมด้วยในทุกวิธี จากผลการทดลองพบว่าวิธีที่ 2 ทำให้ทุกประชากรมีความสม่ำเสมอของลักษณะต่าง ๆ สูงกว่าวิธีที่ 3 โดยประชากรที่มีความสม่ำเสมอของความสูง อายุออกดอก ผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ น้ำมันสูง ได้แก่ HOC_SM, S473_SM และ S475_SM

3. การผสมพันธุ์ เป็นการสร้างพันธุ์ใหม่ขึ้น จาก การรวบรวมเอาลักษณะที่ดีในแต่ละพันธุ์ให้เข้ามาอยู่ในพันธุ์เดียวกัน โดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่แล้วคัดเลือกและทดสอบจนกระทั่งลักษณะที่ต้องการมีความคงที่ เช่น เฉลิมขวัญ สุขเกษม (2555) ได้ทำการผสมพันธุ์

ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ (2A, 5A) เข้ากับสายพันธุ์ทานตะวันที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูง (PI 649855) เพื่อศึกษาอัตราพันธุกรรม การแสดงออกของยีน และการถ่ายทอดลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน โดยใช้ประชากรพื้นฐาน 6 ประชากร ได้แก่ P₁ P₂ F₁ F₂ BC₁ และ BC₂ มาปลูกทดสอบในแปลงปลูก พบว่าลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมด้วยยีนหลักจำนวน 2 คู่ โดยยีนมีการแสดงออกแบบบวก ไม่มีการข่มข้ามคู่ (epistasis) และมีอัตราพันธุกรรมแบบกว้างและแบบแคบในระดับปานกลาง (62.83 และ 58.68 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ)

อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทยถึงแม้จะปรับปรุงให้มีผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง แต่ยังไม่มีการปรับปรุงพันธุ์ให้มีกรดโอเลอิกสูง

2.6 พันธุกรรมและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง

ในพืชแต่ละชนิดมียีนในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ แตกต่างกัน โดยลักษณะกรดโอเลอิกสูงในน้ำมันเป็นลักษณะหนึ่งที่มีการศึกษาแล้วในพืชหลายชนิด เช่น ในมันฝรั่ง ได้มีการศึกษาทางพันธุกรรมของลักษณะกรดโอเลอิกสูงของมันฝรั่งอะซิโอเปียสายพันธุ์กลาย (Del Rio-Celestino and De Haro-Bailon, 2007) พบว่าการกระจายตัวของลักษณะกรดโอเลอิกสูงนั้นชี้ให้เห็นถึงการควบคุมการเพิ่มปริมาณกรดโอเลอิกโดย 2 วิธี วิธีแรกเกิดขึ้นบนสายโซ่ของ C18:1 ถึง C22:1 และมียีน *fad2* เข้ามาเกี่ยวข้องกับกระบวนการ desaturation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก C18:1 (กรดโอเลอิก) เป็น C18:2 (กรดลิโนเลอิก) สำหรับในวิธีที่ 2 พบว่าวิธี C18:1 อาจได้รับอิทธิพลจาก OL locus ด้วย Schierholt *et al.* (2000) พบเช่นกันว่า ลักษณะกรดโอเลอิกสูงขึ้นอยู่กับควบคุมของ *fad2* locus ซึ่งได้ศึกษาในทานตะวัน โดยการผสมระหว่างพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง 2 พันธุ์ (line 7488 x line 19661) จากนั้นนำประชากรในรุ่น F₂ มาวิเคราะห์การกระจายตัว โดยการเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมัน และวิเคราะห์ bulk segregant analysis พบเครื่องหมายโมเลกุล AFLP 3 เครื่องหมายที่มีตำแหน่งอยู่บนแผนที่ทางพันธุกรรมที่ใกล้กับยีน *fad2*

ในถั่วลิสง Moore and Knauft (1989) ได้ทำการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง 2 สายพันธุ์ ได้ลูก F₁ F₂ F₃ และลูกผสมกลับ เมื่อปลูกทดสอบและวิเคราะห์ พบว่าลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมโดยยีนค้อย 2 คู่ (*ol₁*, *ol₂*) ต่อมา Jung *et al.* (2000a, b) ทำการศึกษาถั่วลิสงสายพันธุ์กลายที่มีปริมาณน้ำมันในเมล็ดต่ำ แต่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูง นำมาผสมพันธุ์กับสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำได้ประชากรในรุ่น F₂ จากนั้นปลูกทดสอบและวิเคราะห์ลักษณะกรดโอเลอิกสูง พบว่ากรดโอเลอิกสูงของสายพันธุ์กลายนี้เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของยีนที่สำคัญ 2 รูปแบบ คือ การกลายพันธุ์ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน oleate desaturase โดยมีผลทำให้มีระดับ activity ของยีนต่ำลง และการกลายพันธุ์นั้น ไปลดการ transcript ของยีน oleate desaturase ซึ่งมีผลให้ปริมาณของกรดโอเลอิกลดต่ำลง

ในดอกคำฝอย Hamdan *et al.* (2009) ทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะโอเลอิกสูงโดยนำสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ 1 สายพันธุ์ผสมพันธุ์กับสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง 2 สายพันธุ์ จากนั้นทำการทดสอบและวิเคราะห์การกระจายตัวของลูกในชั่ว F_1 F_2 และ F_3 พบว่าลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมโดยยีนด้อยเพียงยีนเดียว (*ol*)

Liu *et al.* (2002) ทำการปรับปรุงพันธุ์ฝ้ายให้มีกรดโอเลอิกและกรดสเตียริกสูงโดยใช้เทคนิค gene silencing โดยการนำ hpRNA-mediated PTGS ในฝ้ายไปลดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ desaturase ผลจากการลดระดับการแสดงออกของยีน *ghFAD2-1* Δ 12-desaturase ทำให้ปริมาณกรดโอเลอิกเพิ่มขึ้นจาก 13 เปอร์เซ็นต์ เป็น 78 เปอร์เซ็นต์ และการลดการแสดงออกของยีน *ghSAD-1* Δ 9-desaturase เพิ่มปริมาณของกรดสเตียริกจาก 2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีผลทำให้กรดพาล์มิติกมีปริมาณลดลงจาก 26 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 15 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

สำหรับในทานตะวันนั้น มีรายงานว่าทานตะวันพันธุ์แรกที่มีกรดโอเลอิกสูง (75%) คือพันธุ์ Pervenetz ซึ่งปรับปรุงพันธุ์มาจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีไดเมทิลซัลโฟเนตแล้วทำการคัดเลือก (Soldatov, 1976) จนได้สายพันธุ์ที่มีการกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ในช่วง 50-80% ต่อมาในปี 1984 Fick ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะกรดโอเลอิกในทานตะวันพบว่าถูกควบคุมโดยยีนเด่น 1 คู่ (*Ol*) โดยมีการข่มแบบไม่สมบูรณ์ (partially dominant gene) และ Urie (1985) ก็พบเช่นเดียวกันว่า ลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมโดยยีนเด่น 1 คู่เท่านั้น อย่างไรก็ตาม ในระยะต่อมาได้มีการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะกรดโอเลอิกสูง พบว่าถูกควบคุม โดยยีนเด่นจำนวน 3 คู่ คือ Ol_1 , Ol_2 และ Ol_3 (Miller *et al.*, 1987; Fernandez-Martinez *et al.*, 1988; Fernandez-Martinez *et al.*, 1989) โดยคณะวิจัยได้อธิบายว่า ลักษณะกรดโอเลอิกสูงอาจถูกควบคุมโดยยีนจำนวน 1, 2 หรือ 3 ยีนนั้นขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของพันธุ์พ่อแม่ที่มีกรดโอเลอิกต่ำด้วย (Fernandez-Martinez *et al.*, 1989)

ลักษณะกรดโอเลอิกในน้ำมันทานตะวันเป็นลักษณะปริมาณที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่ (polygenes) (Miller *et al.*, 1987; Fernandez-Martinez *et al.*, 1988; Fernandez-Martinez *et al.*, 1989) และมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะ ทำให้ความแปรปรวนของลักษณะมีลักษณะต่อเนื่อง (continuous distribution) ซึ่งการคัดเลือกโดยใช้ฟีโนไทป์ทำได้ยาก เนื่องจากการแสดงออกของลักษณะมีทั้งลักษณะทางพันธุกรรมและมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ขั้นตอนการคัดเลือกในแต่ละชั่วอายุต้องทราบปริมาณกรดโอเลอิกในเมล็ดของแต่ละต้น เนื่องจากต้องปลูกทานตะวันจนได้เมล็ดจึงจะสามารถวิเคราะห์ได้ และการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน โดยวิธีมาตรฐาน คือ Gas chromatography (GC) ถึงแม้การวิเคราะห์ให้ผลแม่นยำ แต่ต้องใช้เวลาาน มีราคาในการวิเคราะห์สูง และสารเคมีที่ใช้เป็นสารเคมี

อันตราย (Pérez-Vich *et al.*, 1998) ทำให้การคัดเลือกต้นทานตะวันที่เมล็ดมีปริมาณกรดโอเลอิกสูงในแต่ละชั่วอายุโดยวิธีดังกล่าวมักทำได้ช้า และได้ผลไม่แม่นยำ อันเนื่องจากสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการปรากฏของลักษณะ ดังนั้นจำเป็นต้องหาวิธีการที่ช่วยให้การคัดเลือกทำได้รวดเร็วขึ้นและลดอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อลักษณะซึ่งจะทำให้การคัดเลือกลักษณะกรดโอเลอิกสูงทำได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูง เช่น การใช้เครื่องหมายโมเลกุล เป็นต้น

2.7 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ลักษณะบางลักษณะของพืช เช่น สีดอก อาจถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียวแต่ลักษณะอื่นๆ ที่มีความซับซ้อนของลักษณะมากกว่า เช่น ผลผลิตของพืช ความสูง ปริมาณน้ำมันหรือปริมาณแป้ง อาจถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีน โดยปกติแล้วนักปรับปรุงพันธุ์จะคัดเลือกพืชโดยคัดเลือกจากสิ่งที่สังเกตได้หรือลักษณะที่สามารถประเมินค่าได้ เรียกว่า ฟีนোটป์ (phenotype) ซึ่งการคัดเลือกลักษณะที่มีความซับซ้อนโดยพิจารณาจากฟีนোটป์นั้นทำได้ยาก เพราะมีผลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูง

ในปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลได้ถูกนำมาวิเคราะห์ตรวจสอบความแตกต่างของลำดับที่จำเพาะระหว่างสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดหรือมากกว่า เครื่องหมายโมเลกุลนับได้ว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นระหว่างหรือภายในชนิด (species) ประชากร (populations) พันธุ์ (varieties) และสายพันธุ์ (breeding lines) ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างหรือลักษณะของพืช (morphological marker) และสามารถคัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการจากพืชได้โดยตรง วิธีการนี้ จึงมีความถูกต้อง แม่นยำสูงและมีประสิทธิภาพกว่าการคัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏให้เห็นหรือลักษณะฟีนোটป์ซึ่งมักจะผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น เครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Simple Sequence Repeat (SSR), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), inter-Simple Sequence Repeat (iSSR)

นักปรับปรุงพันธุ์ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ (marker-assisted selection, MAS) เพื่อช่วยในการระบุยีนที่เฉพาะเจาะจง เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายพันธุกรรมที่ว่าเป็นคือ สายหรือลำดับของกรดนิวคลีอิกซึ่งสร้างขึ้นจากส่วนของดีเอ็นเอ โดยมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับลำดับของดีเอ็นเอของยีนที่สนใจและถูกส่งต่อโดยกฎพื้นฐานทางพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งไปสู่รุ่นต่อไป เมื่อพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลและยีนมีตำแหน่งอยู่ใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกัน ก็ดูเหมือนว่าทั้งเครื่องหมายโมเลกุลและยีนนั้นๆ จะอยู่ใกล้ชิดกันแบบนี้ในทุกส่วนของพืช

นั้น ลักษณะดังกล่าวนี้ เรียกว่า ความเชื่อมโยงทางพันธุกรรม (genetic linkage) ซึ่งความเชื่อมโยงนี้สามารถใช้ทำนายได้ว่าพืชมียีนที่ต้องการหรือไม่

2.7.1 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) เครื่องหมายโมเลกุล RFLPs เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดแรกที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการทำแผนที่จีโนมของมนุษย์ (Bostein *et al.*, 1980) พัฒนาขึ้นมาโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากนั้นทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย agarose gel เพื่อแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามขนาดของดีเอ็นเอที่ตัดได้ จากนั้นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะถูกย้ายไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยวิธี blotting แล้วจึง hybridize แผ่นเมมเบรนด้วยดีเอ็นเอโพรบ (probe) ซึ่งจะมีดีเอ็นเอเพียงบางท่อนเท่านั้นที่สามารถจับกับตำแหน่งที่จำเพาะซึ่งเป็นเบสคู่สมกับ โพรบได้ จากนั้นจึงทำการตรวจสอบสัญญาณจากการ hybridize ลักษณะเด่นของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้คือ สามารถแยกความแตกต่างที่ดีเอ็นเอโดยตรง ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง การตรวจสอบจะเจาะจงที่ยีนหรือตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม (locus specific marker) ผลที่ได้จึงมีความแม่นยำและสามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) นอกจากนี้เครื่องหมาย RFLPs ยังแสดงการข่มร่วมกัน (co-dominant marker) ซึ่งจะช่วยให้ออกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตระหว่างกลุ่มที่เป็น โฮโมไซกัส (homozygous) และ เฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้

2.7.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เครื่องหมายโมเลกุล RAPD เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตั้งอยู่บนพื้นฐานของการเข้าคู่กันแบบสุ่มของชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสแบบสุ่ม (Welsh and McClelland, 1990, Williams *et al.*, 1990) โดยการเข้าคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการเรียงตัวที่ถูกต้องและระยะทางที่เหมาะสมของลำดับเบสแบบสุ่มที่กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนมซึ่งเป็นคู่สมกับไพรเมอร์ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 10 นิวคลีโอไทด์ ทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง ดังนั้น แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นจึงมีหลายแถบ โดยความแตกต่างของเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD นั้นขึ้นอยู่กับการเพิ่มขึ้นหรือการสูญเสียตำแหน่งจับกับดีเอ็นเอสายต้นแบบของไพรเมอร์ และการแทรกสอดและขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณตำแหน่งจับของไพรเมอร์ ดังนั้น ในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ในการตรวจสอบความแตกต่างจึงไม่จำเป็นที่จะต้องมีข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้นๆ เนื่องจากไพรเมอร์จะไปจับกับดีเอ็นเอสายต้นแบบแบบสุ่มตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในสายดีเอ็นเอนั้น และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ทำงานได้

2.7.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เครื่องหมายโมเลกุล AFLP เป็นอีกหนึ่งประเภทของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์เป็นพื้นฐาน (Vos *et al.*, 1995) โดย

เปลี่ยนแปลงระบบการตรวจจับสัญญาณจากการทำไฮบริไดเซชันของเครื่องหมายโมเลกุล RFLP เป็นระบบการ amplification แทน โดยเป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบความแตกต่างของซันดีเอ็นเอ ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว นำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซันดีเอ็นเอจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ซันดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับ ซันดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบรหัส (adapter) สองชนิด จากนั้นหากมีการเข้าสู่ที่เฉพาะเจาะจงระหว่างไพรเมอร์กับซันดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบรหัส (adapter) และเบสคัดลอก (N) ในซันดีเอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้ซันดีเอ็นเอเหล่านั้น มีการเพิ่มปริมาณขึ้น โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ต่อจากนั้นจึงนำซันดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณนั้นมาแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสใน "denaturing polyacrylamide gel electrophoresis"

2.7.4 Simple Sequence Repeat (SSR) เครื่องหมายโมเลกุล SSR หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่อไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือ STR (Short Tandem Repeats) เป็นอีกประเภทหนึ่งของลำดับดีเอ็นเอที่โดดเด่นด้วยการมีจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์เป็น 2, 3, 4 หรือ 5 นิวคลีโอไทด์ อยู่สูง (เช่น CACACACACACACA..., CATCATCATCATCAT..., ACGTACGTACGT... หรือ TAAAATAAAAATAAAA...) และลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนม โดยรูปแบบความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้เกิดขึ้นจากการจับกันอย่างจำเพาะของซันดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ โดยผ่านทางการทำพีซีอาร์และแยกความแตกต่างของขนาดของดีเอ็นเอที่ได้บน agarose หรือ polyacrylamide gel เป็นต้น ซึ่งจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์จะแปรผันไปตามแต่ละจีโนมไทป์ จากคุณสมบัติของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ที่ว่าสามารถแยกความแตกต่างได้สูง สามารถแสดงลักษณะการข่มร่วมกัน (co-dominant) ได้ ขั้นตอนในการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน ทำให้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นอีกหนึ่งตัวเลือกในการศึกษาจีโนมของสิ่งมีชีวิต

2.8 การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้มีปริมาณกรดโอเลอิกสูง

เครื่องหมายโมเลกุล นับได้ว่ามีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะกับการปรับปรุงพันธุ์พืชในลักษณะปริมาณซึ่งถูกควบคุมโดยยีนมากกว่า 2 คู่ และสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะ เนื่องจากช่วยย่นระยะเวลาและเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการคัดเลือกพันธุ์พืชนั้น ๆ สำหรับลักษณะกรดโอเลอิกสูงในน้ำมันทานตะวันจัดเป็นลักษณะปริมาณที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิมทำได้ยาก ผลที่ได้อาจไม่แม่นยำ และการคัดเลือกต้องใช้เวลาอันยาวนาน ดังนั้น จึงมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการคัดเลือกลักษณะ

กรดโอเลอิกสูงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดเพื่อการคัดเลือก
ดังนี้

2.8.1 เครื่องหมายโมเลกุล RAPD Dehmer and Friedt (1998) ได้รายงานผลการพัฒนา
เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน โดยการพัฒนาเครื่องหมาย
โมเลกุลนี้โดยใช้ประชากรในรุ่น F_2 ซึ่งเป็นรุ่นที่มีการกระจายตัวของยีนสูง และพบการกระจายตัว
ของประชากรที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูงต่อประชากรที่มีกรดโอเลอิกต่ำมีอัตราส่วนเป็น 3:1 ซึ่งเป็น
อัตราส่วนการกระจายตัวตามทฤษฎี ผลจากการวิเคราะห์ bulked segregant analysis พบ 2 ไพรเมอร์
ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงออกจากกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำได้อย่าง
ชัดเจน คือ ไพรเมอร์ OP-AC10 และ OP-F15 โดยทั้ง 2 ไพรเมอร์นี้พบแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาด
แตกต่างกัน คือ 765 และ 690 คู่เบสตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำไพรเมอร์ทั้งสองนี้มาทดสอบกับ
ประชากรที่อยู่ในกลุ่ม bulked เป็นรายต้นแล้ววิเคราะห์ linkage โดยใช้โปรแกรม Mapmaker ซึ่ง
พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เป็น 7.2 และ 7.0 เซ็นติเมอร์แกน (cM) ตามลำดับ

2.8.2 เครื่องหมายโมเลกุล SSR การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้เข้ามาช่วยในการ
ปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้มีกรดโอเลอิกสูงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ สามารถแยกความ
แตกต่างได้สูง แสดงลักษณะการข่มร่วมกัน (co-dominant) ได้ โดย Nagarathna *et al.* (2011) ได้ทำ
การทดลองซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายของสายพันธุ์ทานตะวันที่มีปริมาณ
น้ำมันและกรดโอเลอิกสูง และหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะกรดโอเลอิกสูง โดยใช้
สายพันธุ์ทานตะวันในการทดลองจำนวน 350 สายพันธุ์ประกอบด้วย *cms*-lines, *RHA*-lines,
germplasm lines และสายพันธุ์แท้ (inbred lines) เบื้องต้นทำการประเมินสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกมา
โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR พบว่าในไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบจำนวน 1 ไพรเมอร์นั้น สามารถ
แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ และเพื่อ
เป็นการยืนยันผลการประเมินไพรเมอร์ข้างต้นจึงทำการทดสอบกับพันธุ์ลูกผสมอีกครั้ง โดยใน
ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ GC-MS (gas
chromatography–mass spectroscopy) ส่วนปริมาณน้ำมันวิเคราะห์โดยใช้ NMR spectrometer ซึ่งจาก
การวิเคราะห์พบว่าปริมาณน้ำมันอยู่ในช่วง 28-44 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ระหว่าง
23.63-90.58 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบด้วย SSR ไพรเมอร์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่าง
ระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง (77.7-82.9 เปอร์เซ็นต์) และปานกลาง (48.9-51.0 เปอร์เซ็นต์) ออก
จากกันได้อย่างชัดเจน โดยต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 800-900 คู่เบส แต่ไม่พบ
แถบดีเอ็นเอในต้นที่มีกรดโอเลอิกปานกลางและต่ำ ต่อมา Grandon *et al.* (2012) ทำการทดสอบ
SSR ไพรเมอร์จำนวน 386 ไพรเมอร์ที่พบอยู่บนแผนที่จีโนมของทานตะวัน โดยทำการทดสอบใน
ประชากรรุ่น F_2 (R285 x R023) จำนวน 115 ต้น ซึ่งจาก 386 ไพรเมอร์พบว่ามี 82 ไพรเมอร์ที่

สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้และจากจำนวน 82 ไพโรเมอร์นี้พบว่า 53 ไพโรเมอร์เป็นเครื่องหมายที่ทราบตำแหน่งบนดีเอ็นเอและกระจายตัวอยู่บน linkage groups ทั้ง 16 กลุ่มของทานตะวัน

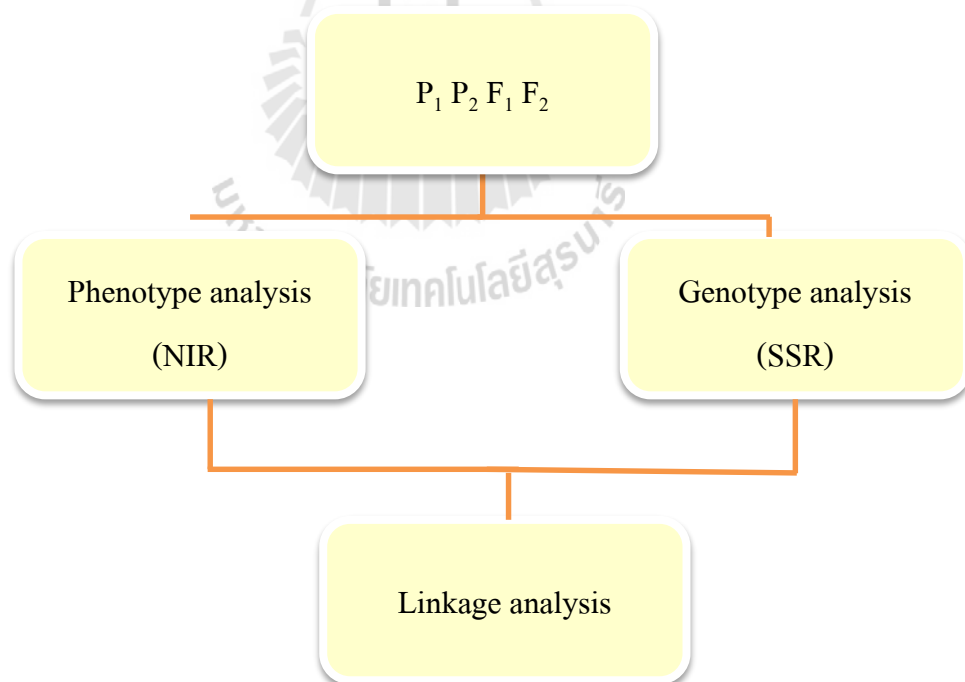
ลักษณะกรดโอเลอิกในน้ำมันทานตะวันเป็นลักษณะปริมาณที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่ และมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะ ทำให้ความแปรปรวนของลักษณะมีลักษณะต่อเนื่อง ซึ่งการคัดเลือกโดยใช้ฟีโนไทป์ทำได้ยาก ดังนั้นการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ทำได้อย่างรวดเร็วและผลที่ได้ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดหนึ่งที่สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะกรดโอเลอิกสูงได้ดี การวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ ในการบ่งชี้ลักษณะปริมาณกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีลักษณะกรดโอเลอิกสูงและต่ำได้ โดยใช้การวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน ซึ่งขั้นตอนในการทดสอบประกอบด้วยการสร้างประชากร F_2 โดยนำสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำและสูง มาทำการผสมข้ามจนได้ลูกชั่วที่ 1 จากนั้นผสมตัวเองเพื่อให้ได้ลูกในชั่วที่ 2 ซึ่งในชั่วนี้จะนำเมล็ดมาปลูกทดสอบแล้ววิเคราะห์หาปริมาณกรดโอเลอิก ในขณะเดียวกันก็ทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อบ่งชี้ลักษณะความแตกต่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ linkage ระหว่างลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์โดยมีขั้นตอนการวิจัยดังนี้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนในการทดลองเพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ

3.1 การสร้างประชากรและการวัดลักษณะทางฟีโนไทป์ของปริมาณกรดโอเลอิก

3.1.1 พันธุ์ทานตะวัน

พันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงคือ PI649855 (80–85%) ซึ่งได้รับเมล็ดจาก NCRPIS (North Central Region Plant Introduction Station) ประเทศสหรัฐอเมริกา และสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ คือ 2A (20–23%) แต่เป็นสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง โดยสายพันธุ์นี้ได้จากการคัดเลือกของโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (จูติพร มะชิโกวา, 2554) รายละเอียดข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณกรดโอเลอิกแสดงในตารางที่ 3.1 (เฉลิมขวัญ สุขเกษม, 2555)

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์	แหล่งรวบรวมพันธุ์	ปริมาณกรดโอเลอิก (%)
2A (Inbred line)	มทส ¹ ประเทศไทย	20 - 23
PI 649855	NCRPIS ² /USDA สหรัฐอเมริกา	80 - 85

¹มทส = มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

²NCRPIS = North Central Region Plant Introduction Station

3.1.2 การสร้างประชากร

สายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ PI 649855 และ 2A โดยกำหนดให้พันธุ์ PI 649855 ซึ่งมีกรดโอเลอิกสูงเป็นพันธุ์พ่อ และสายพันธุ์ 2A ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำเป็นพันธุ์แม่ โดยมีขั้นตอนการสร้างประชากรต่างๆ ดังนี้

1) ประชากร F_1 ปลูกทานตะวันสายพันธุ์ 2A และ PI 649855 โดยให้มีช่วงเวลาการออกดอกพร้อมกันทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อดอกเริ่มบานทำการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ (2A) กับสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง (PI 649855) โดยให้สายพันธุ์ 2A เป็นพันธุ์แม่ ได้ลูกผสม F_1 จำนวน 1 คู่ผสม ได้แก่

พันธุ์แม่ (P_2)		พันธุ์พ่อ (P_1)
2A	x	PI 649855

หมายเหตุ : P_1 คือ พันธุ์ที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูง และ P_2 คือ พันธุ์ที่มีปริมาณกรดโอเลอิกต่ำ

เมื่อได้เมล็ด F_1 แล้ว แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บไว้สำหรับขั้นตอนการปลูกทดสอบ และส่วนที่ 2 สำหรับใช้ในการผลิตประชากร F_2 ในรุ่นต่อไป

2) ประชากร F_2 นำเมล็ด F_1 ที่ได้จากข้อ 1 มาปลูกให้ผสมตัวเอง เมื่อถึงระยะที่ดอกบาน (ระยะ R5) คลุมดอกด้วยถุงกระดาษเพื่อป้องกันการผสมข้าม เมื่อถึงระยะที่ดอกบานทำการช่วยผสมภายในดอกของแต่ละต้น และเมื่อถึงระยะที่จานดอกมีสีน้ำตาล ทำการเก็บเกี่ยวเป็นรายต้น แล้วนำเมล็ด F_2 เพื่อนำไปปลูกทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3) การปลูกทดสอบ นำเมล็ดทานตะวันของประชากร P_1 P_2 F_1 และ F_2 มาปลูกทดสอบในสภาพแปลงปลูก โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (Randomized complete block design, RCBD) มีระยะระหว่างแถว 70 เซนติเมตร และระยะระหว่างต้น 30 เซนติเมตร ทำการให้น้ำ ปุ๋ย และกำจัดวัชพืชตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร เมื่อถึงระยะสุกแก่ทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดเป็นรายต้น เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำมันและปริมาณกรดโอเลอิก

3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิก

เมื่อทานตะวันที่ปลูกทดสอบทุกประชากร (P_1 P_2 F_1 และ F_2) ถึงระยะสุกแก่ ทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดทานตะวันในแต่ละประชากรเป็นรายต้น จากนั้นนำเมล็ดมาวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิก โดยในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกจะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การวิเคราะห์โดยวิธี Gas Chromatography และการวิเคราะห์โดยวิธี Near-Infrared Spectroscopy

3.1.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยวิธี Gas Chromatography (GC) วิธีนี้เป็นวิธีที่วิเคราะห์เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐาน (standard) สำหรับการ calibrate เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้ Near-Infrared Spectroscopy โดยเริ่มจากการสุ่มเมล็ดจากประชากร P_1 7 ต้น, P_2 2 ต้น, F_1 7 ต้น และ F_2 21 ต้น รวมตัวอย่างทั้งหมด 37 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกเพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการวัดปริมาณกรดโอเลอิก โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การสกัดน้ำมันออกจากเมล็ดทานตะวัน ตามวิธีการของ Garces and Mancha (1993) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างเมล็ดทานตะวัน 3 กรัมแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม chloroform : methanol (2 : 1 v/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นย่อยตัวอย่างแล้วกรองกากตะกอนออกจากตัวอย่างด้วยชุดกรองปั๊มลม (suction pump) นำตัวอย่างที่กรองได้มาทำการแยกชั้นด้วยกรวยแยก (separating funnel) จากนั้นเติม chloroform 30 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และ 0.58% NaCl 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่า 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ชั้นไขมันแยกตัวแล้วแยกเฉพาะส่วนที่เป็นชั้นไขมัน เติม Na_2SO_4 แล้วกรองตัวอย่างเพื่อนำน้ำมันที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิก

2) การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิก ตามวิธีการของ AOCS (1997) คุ้ดตัวอย่างน้ำมัน 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองปากเกลียว เติม 0.5 M methanolic NaOH 1.5 มิลลิลิตร แล้วเป่าด้วย N₂ 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วเขย่าให้ไขมันแตกตัว และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 17 : 0 Methyl ester 1 มิลลิลิตร BF₃ in methanol 2 มิลลิลิตร แล้วเป่าด้วย N₂ เป็นเวลา 30 นาที ปิดฝาแล้วนำตัวอย่างไปต้มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้ให้เย็น เติม iso-octane 1 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อให้เกิดชั้นชัดเจน คุ้ดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นไขมันชั้นบนสุด จากนั้นทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีก 1 ครั้ง แล้วปรับปริมาตรตัวอย่างด้วย iso-octane ให้ได้ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

3) การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันโดยเครื่อง GC นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์ ปริมาณกรดโอเลอิกด้วยเครื่อง GC (Agilent Technology, 7890A) โดยมีขั้นตอนดังนี้

Oven Temperature : 175 องศาเซลเซียส

Front Inlet (SS Inlet):

- Temperature: 240 องศาเซลเซียส
- Pressure: 38 PSI
- Flow: 12.9 มิลลิลิตร/นาที
- Septum Purge Flow: 3.0 มิลลิลิตร/นาที

Back Detector (FID):

- Temperature: 250 องศาเซลเซียส
- Fuel Flow: 30.0 มิลลิลิตร/นาที
- Utility Flow: 400.0 มิลลิลิตร/นาที
- Makeup Flow: 25.0 มิลลิลิตร/นาที
- Signal value: 33.6 pA
- Column Flows: 0.9 มิลลิลิตร/นาที

3.1.3.2 การวิเคราะห์กรดไขมันโดย Near-Infrared Spectroscopy (NIR) การวัดโดยวิธี NIR เป็นการวัดการดูดกลืนแสงจากโมเลกุลของตัวอย่างเมล็ดพืช โดยการนำตัวอย่างเมล็ด P₁ 15 ต้น P₂ 12 ต้น F₁ 50 ต้น และ F₂ 90 ต้น ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับที่ใช้วิเคราะห์ GC ที่บดละเอียด มาวัดด้วยความยาวคลื่นแสงโดยเครื่อง NIR (BUCHI (Thailand) Ltd., 2012) ในช่วง 750-2,500 นาโนเมตร จากนั้นนำสเปกตรัมที่ได้จากการวัดโดย NIR มาประมวลผลแล้วนำมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติกับข้อมูลของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ข้อมูลที่วัดได้จากวิธีมาตรฐาน (GC) ที่ได้จากข้อ 3.3.1 มาใช้ในการสร้างสมการสำหรับทำนาย เพื่อเปลี่ยนค่าจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเป็นปริมาณกรดโอเลอิก ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- 1) เมื่อเก็บเกี่ยวทานตะวันแล้วนำเมล็ดมาลดความชื้นโดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 2) นำเมล็ดคอบแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียด
- 3) นำตัวอย่างที่บดละเอียดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย NIR Spectroscopy (NIRFlex N-500) ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจจะเป็นสเปกตรัม
- 4) การวิเคราะห์ข้อมูล คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงสเปกตรัมและปริมาณกรดโอเลอิก (ที่ได้จากวิธี GC ในข้อ 3.3.1) ด้วยวิธีทางสถิติแบบหลายตัวแปร (Partial least square regression : PLSR) และใช้วิธีการเปรียบเทียบแบบ Cross validation จากนั้นนำสเปกตรัมที่ได้มาปรับแต่ง (pre-treatment spectrum) ด้วยวิธี Multiplicative Scattering Correction (MSC) และ Normalize by Closure เมื่อได้สมการที่เหมาะสมนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกของตัวอย่างของประชากรต่าง ๆ ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงเป็นปริมาณกรดโอเลอิกมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

3.1.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร F₂

หลังจากวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยวิธี NIR แล้วนำข้อมูลปริมาณกรดโอเลอิกที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและวาเรียนซ์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากร P₁ P₂ F₁ และ F₂ และวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรโดยใช้ไค-สแควร์ โดยมีการแบ่งปริมาณกรดโอเลอิกเป็น 3 ระดับ (Izquierdo *et al.*, 2002) ดังนี้

กรดโอเลอิกต่ำ	1-50 เปอร์เซ็นต์
กรดโอเลอิกปานกลาง	50-65 เปอร์เซ็นต์
กรดโอเลอิกสูง	>65 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์การกระจายตัวของประชากร P_1 , P_2 , F_1 และ F_2 นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนเป็น ฮิสโตแกรมและทดสอบการกระจายตัวของประชากร โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของปริมาณกรด โอลิโกสูง : ต่ำ ของ F_2 โดยใช้ไค-สแควร์ (Severine *et al.*, 2002)

$$x^2 = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

เมื่อ $i = 1, 2, \dots, n$; $o =$ ค่าสังเกตได้ และ $e =$ ค่าคาดหวัง

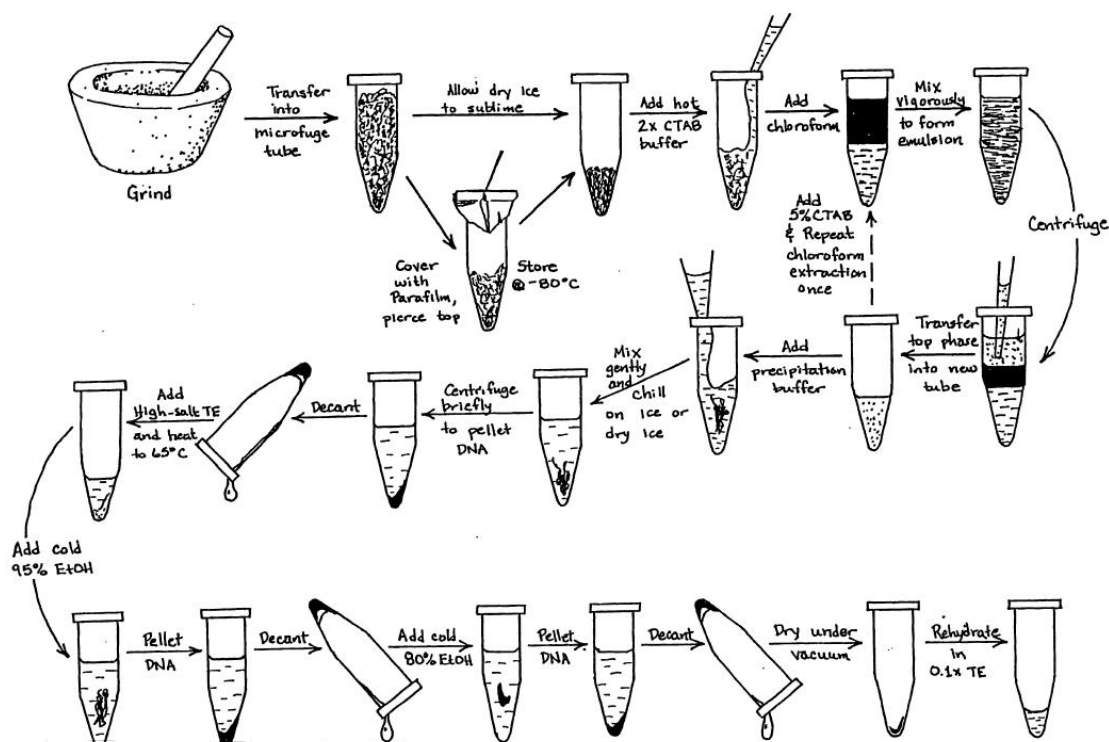
นำค่าไค-สแควร์ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับค่าไค-สแควร์จากตาราง ที่ $df = n-1$ ทั้งนี้ n คือ จำนวนชั้นของการกระจายตัวของข้อมูล หากไม่มีค่านัยสำคัญ แสดงว่าเป็นไปตามทฤษฎี แต่หากมีค่านัยสำคัญแสดงว่าอัตราส่วนของค่าสังเกตไม่สอดคล้องกับอัตราส่วนของค่าคาดหวัง

3.2 การวัดลักษณะทางจีโนไทป์ของลักษณะกรดโอลิโกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

3.2.1 การแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันต้นที่มีกรดโอลิโกสูงและต่ำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 37 ไพรเมอร์

3.2.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ ปลูกทานตะวันประชากร 2A และ PI 649855 หลังจากนั้น 30 วันเก็บตัวอย่างใบอ่อนเป็นรายต้น โดยมีตัวอย่าง P_1 14 ต้น P_2 36 ต้น และ F_2 90 ต้น จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Rogers and Bendich (1985) ดังภาพที่ 3.2

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยเครื่อง ND-1000 Spectrophotometer (คิมห์ ฟุยนตร์พาณิชย์ และคณะ, 2554) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พร้อมทั้งตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ไปแยกขนาดภายใต้สนามไฟฟ้า 100 โวลต์ บน 1.2% Agarose แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้กล้อง UV (Gel-Documentary)



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (Rogers and Bendich, 1985)

3.2.1.2 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ การทดลองนี้ได้เลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันที่มีลักษณะกรดโอเลอิกสูงและต่ำจำนวน 37 ไพรมเมอร์ โดยประกอบด้วย 34 ORS ไพรมเมอร์ (Iqbal *et al.*, 2010), 2 HA ไพรมเมอร์ (Darvishzadeh *et al.*, 2010) และไพรมเมอร์ N1-3F (Nagarathna *et al.*, 2011) ซึ่งมีรายละเอียดดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 SSR โพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือก

No.	Primer name	Forward sequence	Reverse sequence	LG	No. Allele	Reference
1	ha 2879	CATACCGTTCTTGTTT	CAACCTCCTAGGTCA	-	2	Darvishzadeh <i>et al.</i> (2010)
2	ha 4149	CAAAAACCTCTCTCCGTTGGC	GACTCCAAAGTCCACCAAATC	-	2	Darvishzadeh <i>et al.</i> (2010)
3	N1-3F	GAGAAGAGGGAGGTGTGAAG	AGCGGTTATGGTGAGGTCAG	-	-	Nagarathna <i>et al.</i> (2011)
4	ORS 16	GAGGAAATAAATCTCCGATTCA	GCAAGGACTGCAATTTAGGG	7	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
5	ORS 160	TCCCTTCCTTTCATCGTCTGCT	TGGCAATTTGCCAAGGACC	-	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
6	ORS 188	CTTCGTAGCCAACCTCCCACC	CAATGGTTGACAATGGGTTTGC	9	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
7	ORS 287	CGGATTCACTGCTTTCCAAT	GCATAGTTGCCCATCAGAGTAA	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
8	ORS 290	TCTTTACTTCCACGGTGCACTA	GCATTCACAACAAACATCATCA	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
9	ORS 296	CCTTGCACTTAGCCCA	GCATTCACAACAAACATCATCA	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
10	ORS 300	GAATGCGGAGACAAAGGCT	ATAAGTGTGGCGGTGGAAGA	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
11	ORS 301	CGTGACCTGTGAAACACCAA	CGATAACCGTGTGAAATCGTG	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
12	ORS 309	CATTTGGATGGAGCCACTTT	GATGAAGATGGGGAATTTGTG	4	4	Tang <i>et al.</i> (2002)
13	ORS 310	AATCCCACGCAAACCTTCAA	GGGTAAATGGGGCAACCTAT	16	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
14	ORS 311	TCCCGAATTAGCCAAAGAAC	GGTGTGGGTGTTGCAGCTAT	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)

ตารางที่ 3.2 SSR ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือก (ต่อ)

No.	Primer name	Forward sequence	Reverse sequence	LG	No. Allele	Reference
15	ORS 315	GCCGTGAATAATGGGATTGA	GATTGGGTCAGCTTGTGTGA	5	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
16	ORS 316	TGGCGTCTTCATAGCATCAG	GAGATTTGAGCTTCGTGTTGC	13	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
17	ORS 318	TCCATGAGTTGGTCGTATGC	CCGCATATTGAAACTGCATC	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
18	ORS 319	TCATCAATCCAAGCACCAA	TTGGGCCGTAAACCCTTAAC	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
19	ORS 321	TGTCGAAGAGTTGTCGGAAC	GGGAAGGTGAAACCCTAACC	15	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
20	ORS 322	TGCACCACTTGGAACCTGAC	GCATTCATCCATAGTCATCAAGA	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
21	ORS 323	CGGGAAACTAGGATCAGAGG	GCCGGAGGATTAGAGGAGTT	7	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
22	ORS 324	CACTTCTACTCCATCTTCTTCATCAA	ATGATGCTCCGCAACAGTTT	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
23	ORS 331	TGAAGAAGGGTTGTTGATTACAAG	GCATTGGGTTTACCATTCT	7,16	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
24	ORS 332	GACCAGCCGCATATTTCAA	AAACCGGCCTCTTATTTGGT	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
25	ORS 333	CGGTTAAGATGGTTCAGTTGG	ATATTAAGTTTTGGTTTTAGCCAGAA	16	-	Haddadi <i>et al.</i> (2010)
26	ORS 337	TTGGTTCATTCATCCTTGGTC	GGGTTGGTGGTTAATTCGTC	4	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
27	ORS 339	CCCTCTTCTCTCCCTTACTTT	AAATCCGCACTCCAATATGC	-	-	Tang <i>et al.</i> (2002)
28	ORS 371	GGTGCCTTCTCTTCTTGTG	CACACCACCAAACATCAACC	1	-	Tang <i>et al.</i> (2002)

ตารางที่ 3.2 SSR ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือก (ต่อ)

No.	Primer name	Forward sequence	Reverse sequence	LG	No. Allele	Reference
29	ORS 488	CCCATTCACTCCTGTTTCCA	CTCCGGTGAGGATTTGGATT	3	3	Tang <i>et al.</i> (2002)
30	ORS 598	CCAAATGTGAGGTGGGAGAA	ATAGTCCCTGACGTGGATGG	1	3	Tang <i>et al.</i> (2002)
31	ORS 822	CAATGCCATCTGTCATCAGCTAC	AAACAAACCTTTGGACGAAACTC	1	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
32	ORS 878	TGCAAGGTATCCATATTCCACAA	TATACGCACCGGAAAGAAAGTC	10	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
33	ORS 899	GCCACGTATAACTGACTATGACCA	CGAATACAGACTCGATAAACGACA	16	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
34	ORS 920	CGTTGGACGAAGAACTTGATTT	ACTTCCGTTTGTTCGGAGCTT	16	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
35	ORS 988	TTGATTTGGTGAAAGTGTGAAGC	CGAACATTATTTACATCGCTTTGTC	17	2	Tang <i>et al.</i> (2002)
36	ORS 1068	AATTTGTCGACGGTGACGATAG	TTTTGTCATTTTATTACCCAAGG	4	4	Tang <i>et al.</i> (2002)
37	ORS 1088	ACTATCGAACCTCCCTCCAAAC	GGATTTCTTTCATCTTTGTGGTG	10	2	Tang <i>et al.</i> (2002)

LG = Linkage group

3.2.1.3 การแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำโดยใช้ 37 SSR ไพรเมอร์ นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ (กรดโอเลอิกสูง) และพันธุ์แม่ (กรดโอเลอิกต่ำ) มาใช้ในการประเมิน SSR ไพรเมอร์ ทั้ง 37 ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยการนำดีเอ็นเอของทานตะวันที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR องค์กรประกอบในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 องค์กรประกอบในการทำ PCR

Content	Stock conc.	Final conc.	1 tube
Toptaq	2X	1X	12.5 μ l
Forward primer	10 μ M	0.3 μ M	0.75 μ l
Reverse primer	10 μ M	0.3 μ M	0.75 μ l
DNA	50 ng/ μ l	10 ng/ μ l	5 μ l
DI water			6 μ l
Total			25 μ l

โดยมีอุณหภูมิของขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

	Preheat	95°C	3 นาที
ทำซ้ำ 10 รอบ โดยลดอุณหภูมิในช่วง Elongation ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส	Denaturation	95°C	30 วินาที
	Elongation	64°C	30 วินาที
	Extension	72°C	45 วินาที
33 รอบ	Denaturation	94°C	30 วินาที
	Elongation	54°C	30 วินาที
	Extension	72°C	45 วินาที
	Final Extension	72°C	20 นาที

หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปแยกขนาดภายใต้สนามไฟฟ้า 100 โวลต์ บน 3% agarose gel เป็นเวลา 45 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ เพื่อตรวจสอบ

ไพรมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้อย่างชัดเจน หลังจากนั้นนำไพรมอร์ที่คัดเลือกได้ไปทดสอบกับประชากร F_2 ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงด้วยไพรมอร์ที่ได้จากการคัดเลือก

3.2.2.1 การทดสอบซ้ำ 15 ไพรมอร์ที่ได้จากการคัดเลือกในประชากร F_2 เมื่อสร้างประชากร F_2 ที่จะใช้ในการแยกความแตกต่างตามขั้นตอนที่ 3.2 จากนั้นปลูกทดสอบประชากร F_2 ที่ได้พร้อมกับพ่อ-แม่พันธุ์ ลงในแปลงปลูก เมื่อทานตะวันอายุ 15 วันหลังปลูก เก็บใบอ่อนทานตะวัน มาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนที่ 3.2.1.1 จากนั้นสุ่มเลือกตัวอย่าง โดยดูจากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกในข้อ 3.1.3.2 เพื่อใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูง (H) จำนวน 5 ตัวอย่างและตัวแทนของกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำ (L) จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างด้วยไพรมอร์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 3.2.1.3 จำนวน 15 ไพรมอร์ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของต้นตัวอย่างโดยวิธี PCR โดยมีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.3 และมีอุณหภูมิตามขั้นตอนดังกล่าวตามข้อ 3.2.1.3 จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกความแตกต่างโดยใช้ 2% agarose gel เป็นเวลา 40 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจสอบตรวจสอบไพรมอร์ ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ แล้วคัดเลือกไพรมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนไปทดสอบกับประชากร F_2 เป็นรายต้นในขั้นตอนต่อไป

3.2.2.2 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นโดยใช้ 5 ไพรมอร์ หลังจากคัดเลือกไพรมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้แล้ว (ผลจากข้อ 3.2.2.1) นำไพรมอร์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ซ้ำเพื่อยืนยันผลในประชากร F_2 เป็นรายต้น โดยนำดีเอ็นเอของ F_2 จำนวน 90 ต้น มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยมีองค์ประกอบแสดงในตารางที่ 3.3 และมีขั้นตอนตามข้อ 3.2.1.3 และแยกความแตกต่างบน 2% agarose gel เป็นเวลา 40 นาที และปฏิบัติเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.2.2.1

3.3 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่มีลิงก์เกจ (linkage) กับปริมาณกรดโอเลอิกสูง

หลังจากแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นด้วยไพรมอร์ที่คัดเลือกได้จากในขั้นตอนที่ 3.2.2.2 แล้ว นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรมอร์มาตรวจสอบการมีลิงก์เกจระหว่างเครื่องหมาย SSR (จีโนไทป์) กับปริมาณกรดโอเลอิก (ฟีโนไทป์) ด้วยวิธี simple regression และวิธีใช้โปรแกรม Mapmaker v. 3.0b

3.3.1 การตรวจสอบลิงค์เกอร์หว่างข้อมูลทางฟีโนไทป์กับข้อมูลทางจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยวิธี simple regression

หลังจากแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นด้วยไพรมอร์ที่คัดเลือกได้แล้ว เก็บข้อมูลจีโนไทป์จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยการให้ระดับคะแนนดังนี้ ตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อให้ระดับคะแนนเป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ให้ระดับคะแนนเป็น 0 และข้อมูลฟีโนไทป์ คือ ปริมาณกรดโอเลอิกที่วิเคราะห์โดยวิธี NIR จากนั้นนำข้อมูลจีโนไทป์และฟีโนไทป์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ simple regression ด้วยโปรแกรม SPSS v.14 (SPSS Inc, 2005) หากพบนัยสำคัญแสดงว่าฟีโนไทป์มี regression กับจีโนไทป์ ซึ่งบ่งชี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล SSR นั้นเชื่อมโยงอยู่กับ QTL หรือยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวัน

3.3.2 การตรวจสอบลิงค์เกอร์กับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงด้วยโปรแกรม Mapmaker

หลังจากแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นด้วยไพรมอร์ที่คัดเลือกได้แล้ว เก็บข้อมูลจีโนไทป์จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยการให้ระดับคะแนนดังนี้ ตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อให้ระดับคะแนนเป็น A ส่วนตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ให้ระดับคะแนนเป็น B และตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอให้ระดับคะแนนเป็น - (missing data) และข้อมูลฟีโนไทป์ คือ ปริมาณกรดโอเลอิกที่วิเคราะห์โดยวิธี NIR จากนั้นนำข้อมูลจีโนไทป์และฟีโนไทป์มาวิเคราะห์ linkage กับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงโดยใช้โปรแกรม Mapmaker v.3.0b (Lander *et al.*, 1987)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสร้างประชากรและการวัดลักษณะทางฟีโนไทป์ของปริมาณกรดโอเลอิก

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ การวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน (GC) และการวิเคราะห์โดย Near-Infrared Spectroscopy (NIR) ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยวิธี Gas Chromatography

นำตัวอย่างเมล็ดทานตะวันมาสกัดน้ำมันและทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยใช้วิธี GC เพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้เป็นค่ามาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดยวิธี NIR ซึ่งปริมาณกรดโอเลอิกที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละประชากรแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่า ในประชากร P₁ (พันธุ์ PI649855) มีปริมาณกรดโอเลอิกสูงโดยมีค่าเฉลี่ย 67.47 เปอร์เซ็นต์ ประชากร P₂ (สายพันธุ์ 2A) มีปริมาณกรดโอเลอิกประมาณ 21.51 เปอร์เซ็นต์ F₁ มีปริมาณกรดโอเลอิกเฉลี่ย 39.03 เปอร์เซ็นต์ และ F₂ มีปริมาณกรดโอเลอิกเฉลี่ย 40.72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าที่ได้จากตัวอย่าง 37 ตัวอย่างนี้จะใช้เป็นค่ามาตรฐานสำหรับ calibrate ค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้การวัดโดยวิธี NIR

ตารางที่ 4.1 ปริมาณกรดโอเลอิกที่วิเคราะห์ได้โดย Gas Chromatography

ประชากร	จำนวนต้น	กรดโอเลอิก (%)
P ₁	7	67.47±10.90 ¹
P ₂	2	21.51±7.57
F ₁	7	39.03±16.51
F ₂	21	40.72±20.06

¹ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error; SE)

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกโดย Near-Infrared Spectroscopy

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร P₁ 11 ต้น P₂ 4 ต้น F₁ 50 ต้น และ F₂ 90 ต้น โดยใช้ NIR Spectroscopy (NIRFlex N-500) ปริมาณกรดโอเลอิกที่วิเคราะห์ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดโอเลอิกของประชากรต่าง ๆ โดยวิธี NIR

ประชากร	จำนวนต้น	ช่วง (%)	กรดโอเลอิก (%)
P ₁ (PI 649855)	11	62.3-77.0	71.78±4.86 ¹
P ₂ (2A)	4	23.5-27.0	24.74±0.79
F ₁	50	44.7-75.6	61.36±1.05
F ₂	90	48.8-81.9	64.35±0.76

¹ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error; SE)

จากตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยของประชากร P₁, P₂, F₁ และ F₂ ของคู่ผสม 2A x PI 649855 ซึ่งสายพันธุ์ 2A เป็นสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง แต่มีกรดโอเลอิกต่ำ จากผลการทดลองนี้พบว่า ประชากร P₂ (2A) มีปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ในช่วง 23.5-27.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.74 เปอร์เซ็นต์ ประชากร P₁ (PI 649855) มีปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ในช่วง 62.3-77.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 71.78 เปอร์เซ็นต์ F₁ มีปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ในช่วง 44.7-75.6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 61.36 เปอร์เซ็นต์ และ F₂ มีปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ในช่วง 48.8-81.9 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 64.35 เปอร์เซ็นต์

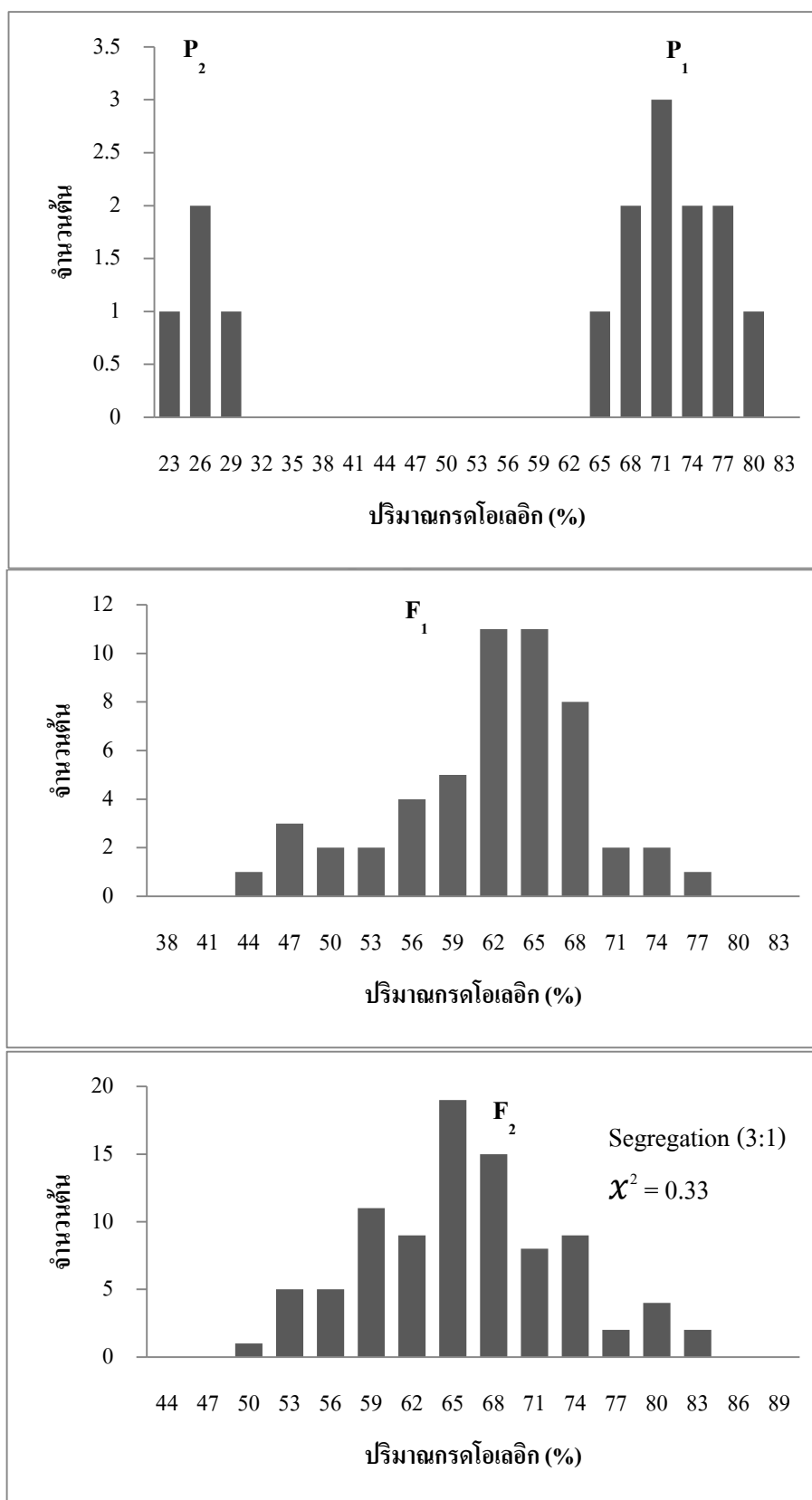
4.1.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร F₂

เมื่อนำค่าปริมาณกรดโอเลอิกของประชากร F₂ ที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะกรดโอเลอิกได้ผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร P_1 P_2 F_1 F_2

ปริมาณ กรดโอเลอิก	ประชากร/จำนวนต้น			
	P_1	P_2	F_1	F_2
	(สูงสุด 77.00)	(สูงสุด 27)	(สูงสุด 75.57)	(สูงสุด 81.88)
80.01-90.00				2
70.01-80.00	5		3	16
60.01-70.00	6		30	47
50.01-60.00			12	20
40.01-50.00			5	5
30.01-40.00				
20.01-30.00		4		
10.01-20.00				
0.00-10.00				
	(ต่ำสุด 62.27)	(ต่ำสุด 23.50)	(ต่ำสุด 44.70)	(ต่ำสุด 48.81)
จำนวนต้น	11	4	50	90
ค่าเฉลี่ย	71.78	24.74	61.36	64.35

การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร P_1 P_2 F_1 และ F_2 ของคู่ผสม 2A x PI 649855 แสดงในตารางที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.1 พบว่าในประชากร P_2 มีการกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ในช่วง 23.5-27.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำสุด 23.5 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงที่สุด 27.0 เปอร์เซ็นต์ P_1 อยู่ในช่วง 62.3-77.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำสุด 62.3 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงที่สุด 77.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยระหว่างพ่อและแม่แล้วพบว่า มีค่า 48.26 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ประชากร F_1 มีการกระจายตัวอยู่ในช่วง 44.7-75.6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำสุด 44.7 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงที่สุด 75.6 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยของลูกผสม F_1 เท่ากับ 61.36 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่ (midparent; MP) ซึ่งบ่งชี้ว่า ยีนควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงมีการแสดงออกแบบข่มบางส่วน (partially positive dominance) สำหรับการกระจายตัวของ F_2 อยู่ในช่วง 48.8-81.9 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าต่ำสุด 48.8 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณกรดโอเลอิกสูงที่สุด 81.9 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าเฉลี่ยสูงกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่ เช่นเดียวกับประชากร F_1 บ่งชี้ว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกเป็นการข่มบางส่วน



ภาพที่ 4.1 การกระจายตัวของลักษณะกรดโอเลอิกในประชากร P₁ P₂ F₁ และ F₂

จากตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.1 แสดงการกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในแต่ละประชากร พบว่า ประชากร F_2 มีการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) อยู่ระหว่างประชากร P_1 และ P_2 โดยมีความถี่สูงอยู่ในช่วง 50-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นช่วงที่ปริมาณกรดโอเลอิกอยู่ในระดับปานกลาง-สูง และมีแนวโน้มไปทางพันธุ์ P_1 (PI 649855) ที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูง สำหรับการกระจายตัวของประชากร F_1 ก็พบเช่นเดียวกันว่าการกระจายตัวมีแนวโน้มไปทางด้านกรดโอเลอิกสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของเจลิมขวัณ สุขเกษม (2555) ที่รายงานว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะกรดโอเลอิกสูงเป็นแบบข่มบางส่วน (partially dominance) เป็นผลให้การแสดงออกของลูกในชั่ว F_1 และ F_2 โน้มเอียงไปทาง P_1

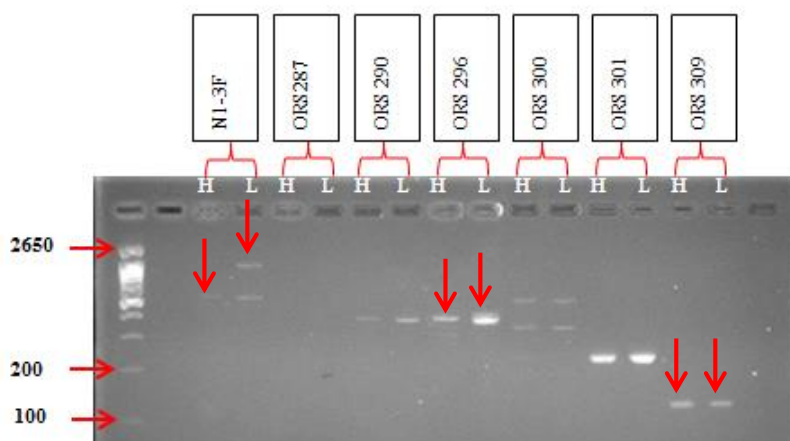
เมื่อทำการทดสอบการสอดคล้องของการกระจายตัวของลูกชั่ว F_2 โดยใช้ไค-สแควร์ พบว่ามีการกระจายตัวที่มีอัตราส่วนของต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง : ต่ำ-ปานกลางเท่ากับ $3/4 : 1/4$ ($\chi^2 = 0.33 < \chi^2_{0.05} = 3.84$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Urie (1985) และ Tshediso (2013) ที่พบว่าทานตะวันในชั่ว F_2 มีการกระจายตัวของลักษณะกรดโอเลอิกสูง : ต่ำ เท่ากับ $3 : 1$ ซึ่งจากการวิเคราะห์อัตราส่วนดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมโดยยีนหลักจำนวน 1 คู่ (Fick, 1984; Urie, 1985; Fernandez-Martinez *et al.*, 1989)

4.2 การวัดลักษณะทางจีโนไทป์ของลักษณะกรดโอเลอิกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

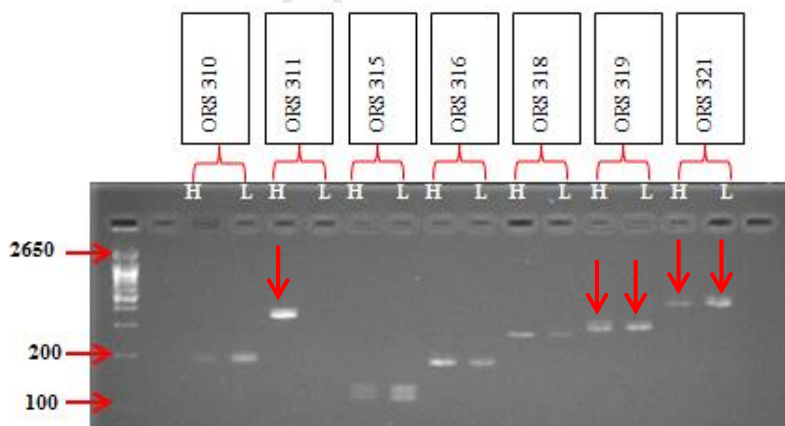
4.2.1 การแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำโดยใช้ 37 SSR ไพรเมอร์

เมื่อนำดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง (PI 649855) และ โอเลอิกต่ำ (2A) มาประเมินโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 37 ไพรเมอร์ เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ 15 ไพรเมอร์ ได้แก่ N1-3F, ORS 296, ORS 309, ORS 311, ORS 319, ORS 321, ORS 333, ORS 337, ORS 339, ORS 371, ORS 488, ORS 598, ORS 822, ORS 1088 และ ha 4149 (ภาพที่ 4.2-4.7) โดยบางไพรเมอร์แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแบบ monomorphic และบางไพรเมอร์แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic

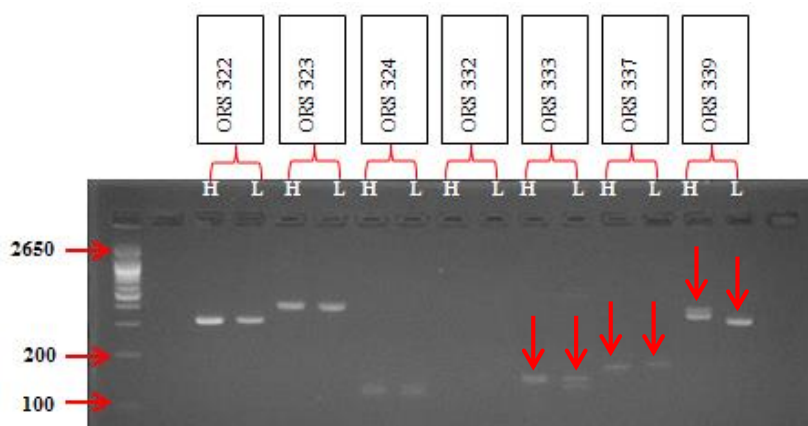
สำหรับไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างแบบ monomorphic ได้แก่ ORS 296 (ภาพที่ 4.2), ORS 309 (ภาพที่ 4.2), ORS 311 (ภาพที่ 4.3), ORS 319 (ภาพที่ 4.3), ORS 321 (ภาพที่ 4.3), ORS 337 (ภาพที่ 4.4), ORS 598 (ภาพที่ 4.5), ORS 822 (ภาพที่ 4.5), ha 4149 (ภาพที่ 4.5) และ ORS 1088 (ภาพที่ 4.6) และไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างแบบ polymorphic ได้แก่ N1-3F (ภาพที่ 4.2), ORS 333 (ภาพที่ 4.4), ORS 339 (ภาพที่ 4.4), ORS 371 (ภาพที่ 4.5) และ ORS 488 (ภาพที่ 4.6) อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ทั้งหมดจะนำไปทดสอบซ้ำในประชากร F_2 ต่อไป



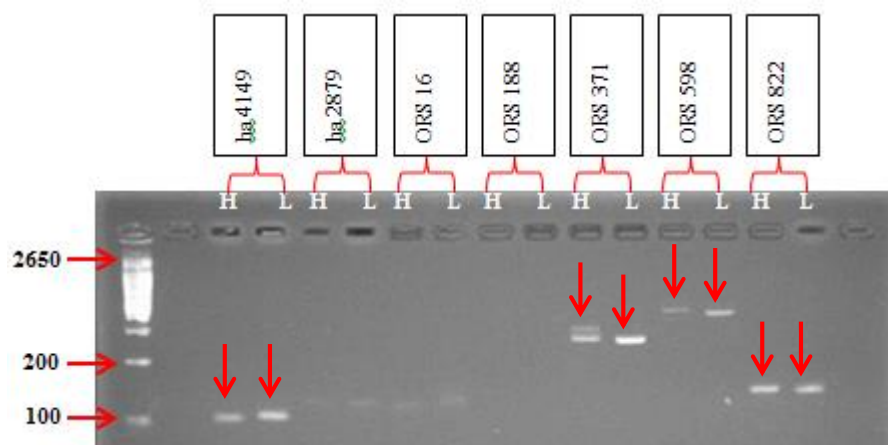
ภาพที่ 4.2 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ N1-3F ถึง ORS 309 ใน 3% agarose gel
(H = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง, L = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ)



ภาพที่ 4.3 ผลการประเมิน โดยใช้ไพรเมอร์ ORS 310 ถึง ORS 321 ใน 3% agarose gel
(H = พันธุ์ที่มีกรด โอเลอิกสูง, L = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ)



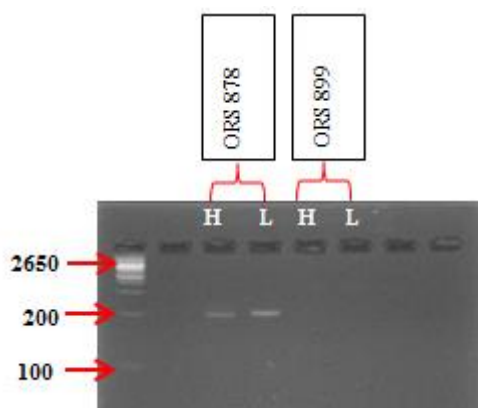
ภาพที่ 4.4 ผลการประเมิน โดยใช้ไพรเมอร์ ORS 322 ถึง ORS 339 ใน 3% agarose gel
(H = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง, L = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ)



ภาพที่ 4.5 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ha 4149 ถึง ORS 822 ใน 3% agarose gel
(H = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง, L = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ)



ภาพที่ 4.6 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ORS 920 ถึง ORS 488 ใน 3% agarose gel
(H = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง, L = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ)



ภาพที่ 4.7 ผลการประเมินโดยใช้ไพรเมอร์ ORS 878 ถึง ORS 899 ใน 3% agarose gel
(H = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง, L = พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ)

4.2.2 การแยกความแตกต่างของต้นทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำในประชากร F_2 ด้วยไพรมอร์ที่ได้จากการคัดเลือก

4.2.2.1 การทดสอบซ้ำ 15 ไพรมอร์ที่ได้จากการคัดเลือกในประชากร F_2 หลังจากที่ทำการศึกษาคัดเลือกไพรมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ จากข้อ 4.2 จำนวน 15 ไพรมอร์ ได้แก่ N1-3F, ORS 296, ORS 309, ORS 311, ORS 319, ORS 321, ORS 333, ORS 337, ORS 339, ORS 371, ORS 488, ORS 598, ORS 822, ORS 1088 และ ha 4149 จากนั้นนำไพรมอร์เหล่านี้มาทดสอบแยกความแตกต่างของลักษณะกรดโอเลอิกสูงและต่ำในประชากร F_2 โดยทดสอบกับตัวอย่างที่มีกรดโอเลอิกสูงซึ่งมีปริมาณกรดโอเลอิก 79.35-81.88 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 ตัวอย่าง (H1-H5) และตัวอย่างที่มีกรดโอเลอิกต่ำซึ่งมีปริมาณกรดโอเลอิก 48.81-50.45 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 ตัวอย่าง (L1-L5) ปริมาณกรดโอเลอิกของแต่ละตัวอย่างแสดงในตารางที่ 4.4 และผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 4.8-4.22

ตารางที่ 4.4 ปริมาณกรดโอเลอิกในทานตะวันกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำ

รหัสต้น	ปริมาณกรดโอเลอิก (%)	รหัสต้น	ปริมาณกรดโอเลอิก (%)
L1	48.81	H1	81.88
L2	50.29	H2	80.96
L3	50.37	H3	79.35
L4	50.45	H4	78.67
L5	50.14	H5	78.58

H = ต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง L = ต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำ

จากภาพที่ 4.8 แสดงการทดสอบไพรมอร์ N1-3F สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียวกับพันธุ์พ่อ (มีกรดโอเลอิกสูง) ซึ่งปรากฏ 2 แถบ อยู่ในช่วง 600-1,100 bp ในขณะที่ต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบเพียงแถบเดียว (ประมาณ 600bp) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Nagarathna *et al.* (2011) ที่พบว่าไพรมอร์ดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ โดยต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 800-900 bp ในขณะที่กลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (ประมาณ 600 bp) เช่นเดียวกัน

ไพรมอร์ ORS 296 เมื่อนำไพรมอร์นี้มาทดสอบซ้ำกับประชากร F_2 พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ (ภาพที่ 4.9) โดยแถบดีเอ็นเอที่

พบอยู่ในช่วง 550-600 bp ในขณะที่ผลการทดสอบในข้อที่ 4.2 พบว่าไพรเมอร์ ORS 296 สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำในรุ่นพ่อ-แม่ออกจากกันได้ โดยต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำ (L) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง (H) มีขนาดอยู่ในช่วง 500-600 bp ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าของต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำนั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ PCR ไม่เท่ากัน ส่งผลให้แถบดีเอ็นเอของต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำมีขนาดใหญ่กว่าต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง เมื่อนำมาทดสอบซ้ำกับประชากร F_2 จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับผลการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ORS 822 (ภาพที่ 4.20) ที่พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 170 bp อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ต้น F_2 จำนวน 10 ต้น ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้ ซึ่งอาจเนื่องจากไพรเมอร์นี้อาจไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะกรดโอเลอิกสูง

ไพรเมอร์ ORS 309 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ทั้งในพันธุ์พ่อ-แม่ และในต้น F_2 (ภาพที่ 4.10) โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 120-130 bp ส่วนกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 110 bp และ Tang *et al.* (2002) ได้รายงานว่าเครื่องหมายโมเลกุล ORS 309 มีตำแหน่งบน LG 4 ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การแสดงออกของลักษณะกรดโอเลอิกสูง

ไพรเมอร์ ORS 311 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ทั้งในพันธุ์พ่อ-แม่ และสามารถแยกความแตกต่างได้ในประชากร F_2 ได้ (ภาพที่ 4.11) โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงจะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (480-500 bp) ส่วนกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (500 bp)

ไพรเมอร์ ORS 319 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ทั้งในพันธุ์พ่อ-แม่ (ภาพที่ 4.12) โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 300 bp ส่วนกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 310 bp เมื่อวิเคราะห์ต้น F_2 จำนวน 10 ต้น พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้บางส่วน

ไพรเมอร์ ORS 321 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงจะพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (500 bp) ส่วนกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูง (ภาพที่ 4.13) เมื่อวิเคราะห์ต้น F_2 จำนวน 10 ต้น พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้

ไพรเมอร์ ORS 333 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ทั้งในพันธุ์พ่อ-แม่ (ภาพที่ 4.14) เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่พบในพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงมีขนาดประมาณ 200 bp ส่วนพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำมีขนาดประมาณ 180 bp แต่ในรุ่นลูกพบว่าบางส่วนมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (co-dominant) ซึ่งการมีแถบดีเอ็นเอในรูปแบบนี้ไม่สามารถแยกความ

แตกต่างระหว่างต้นที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูง-ต่ำได้ ปรากฏการณ์เช่นนี้อาจเนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุล ORS 333 มีตำแหน่งอยู่บน LG 16 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ QTL ที่มี การทับซ้อนกัน (overlapping) ระหว่าง QTL ที่ควบคุมลักษณะปริมาณกรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิก (Haddadi *et al.*, 2010) จึงทำให้บางต้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำได้

ไพรเมอร์ ORS 337 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ในพันธุ์พ่อ-แม่ (ภาพที่ 4.15) โดยแถบดีเอ็นเอที่พบในพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงมีขนาด 200 bp ส่วนพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำมีขนาดประมาณ 210 bp สำหรับในประชากร F₂ ต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบเหมือนพันธุ์พ่อ-แม่ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างได้ และมีรายงานว่าไพรเมอร์นี้อยู่บน LG 4 (Tang *et al.*, 2002) ซึ่งเป็น LG ที่มี QTL ที่เชื่อมโยงกับลักษณะกรดโอเลอิกสูง

ไพรเมอร์ ORS 339 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ในพันธุ์พ่อ-แม่ (ภาพที่ 4.16) โดยแถบดีเอ็นเอที่พบในพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงมีขนาดประมาณ 200-300 bp ส่วนพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำมีขนาดประมาณ 200 bp แต่ในรุ่นลูกมี 1 ต้นที่พบว่า มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (co-dominant) ซึ่งการมีแถบดีเอ็นเอในรูปแบบดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์พ่อ-แม่ได้ แต่ไม่สามารถแยกปริมาณกรดโอเลอิกสูงได้ เมื่อวิเคราะห์ต้น F₂ จำนวน 10 ต้น พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้

ผลการทดสอบไพรเมอร์ ORS 371 แสดงดังภาพที่ 4.17 พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ในพันธุ์พ่อ-แม่ แต่แถบดีเอ็นเอที่พบในประชากรที่มีกรดโอเลอิกต่ำส่วนใหญ่เป็นแบบเดียวกับแถบดีเอ็นเอที่พบในพันธุ์แม่ (พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ) ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาดประมาณ 280 bp เกือบทั้งหมด แต่ในต้น F₂ ที่มีกรดโอเลอิกสูงส่วนใหญ่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ มีเพียง 1 ตัวอย่างที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบพันธุ์พ่อ (พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง) โดยมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 280-300 bp เมื่อวิเคราะห์ต้น F₂ จำนวน 10 ต้น พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้บางส่วน สำหรับไพรเมอร์ ORS 371 มีรายงานว่า มีตำแหน่ง QTL บน LG 1 (Poormohammad *et al.*, 2007) ซึ่งมีลิงค์เกจกับลักษณะกรดโอเลอิกสูง

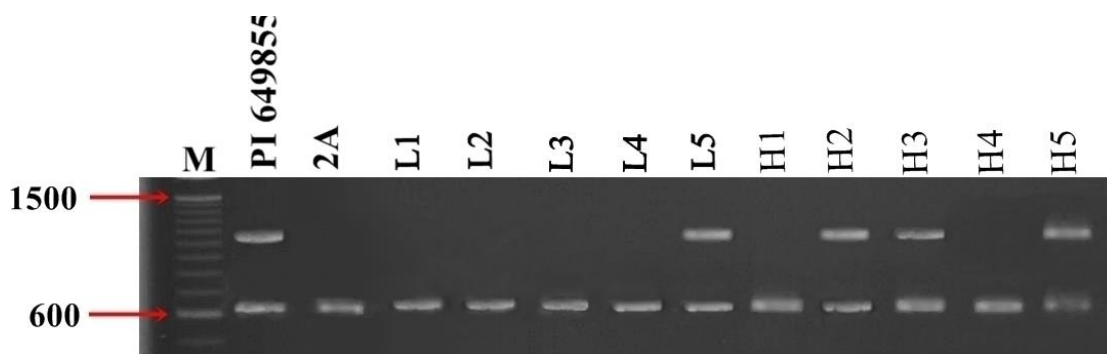
ผลการทดสอบไพรเมอร์ ORS 488 แสดงดังภาพที่ 4.18 พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่พบครั้งหนึ่งเป็นแบบเดียวกับแถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ (พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ) ซึ่งมีขนาดประมาณ 280 bp ในขณะที่พันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงแถบดีเอ็นเอที่พบมี 2 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 280-300 bp เมื่อวิเคราะห์ต้น F₂ จำนวน 10 ต้น พบว่ามีต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ-แม่จำนวน 4 ต้น ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างได้บางส่วน สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล ORS 488 นี้มีตำแหน่งบน LG 3 (Tang *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามยังไม่มียานงานว่ามีลิงค์เกจกับบริเวณที่มียีนควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง

ไพรมอร์ ORS 598 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่มีกรดโอเลอิกสูงกับต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำได้ (ภาพที่ 4.19) โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่มีขนาด 570 bp ในขณะที่กลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบเช่นกัน แต่มีขนาด 540 bp อย่างไรก็ตามการทดสอบในลูกรุ่น F_2 พบแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่มีขนาด 540 bp ซึ่งเหมือนต้นแม่ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ แต่ในกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับพันธุ์พ่อเพียง 2 ต้น ดังนั้นจึงสามารถแยกความแตกต่างของรุ่น F_2 ได้เพียงบางส่วน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Tang *et al.* (2002) พบว่า เครื่องหมาย โมเลกุล ORS 598 มีตำแหน่งบน LG 1 แต่เครื่องหมาย โมเลกุล ORS 598 อาจไม่มีลิงค์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง

ไพรมอร์ ORS 1088 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงกับกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำได้ (ภาพที่ 4.21) โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 120 bp ในขณะที่กลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 170bp เมื่อวิเคราะห์ต้น F_2 จำนวน 10 ต้น พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้ โดยเครื่องหมาย โมเลกุล ORS 1088 นี้มีรายงานว่ามีตำแหน่งบน LG 10 (Haddadi *et al.*, 2010) ซึ่งมีตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง

ผลการทดสอบไพรมอร์ ha 4149 แสดงดังภาพที่ 4.22 พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ โดยกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกต่ำมีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (ประมาณ 180 bp) และกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (ช่วงประมาณ 180-200 bp) เมื่อวิเคราะห์ต้น F_2 จำนวน 10 ต้น พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นได้บางส่วน ซึ่ง Poormohammad *et al.* (2007) ได้รายงานไว้ว่าเครื่องหมาย โมเลกุล ha 4149 อยู่บน LG 17

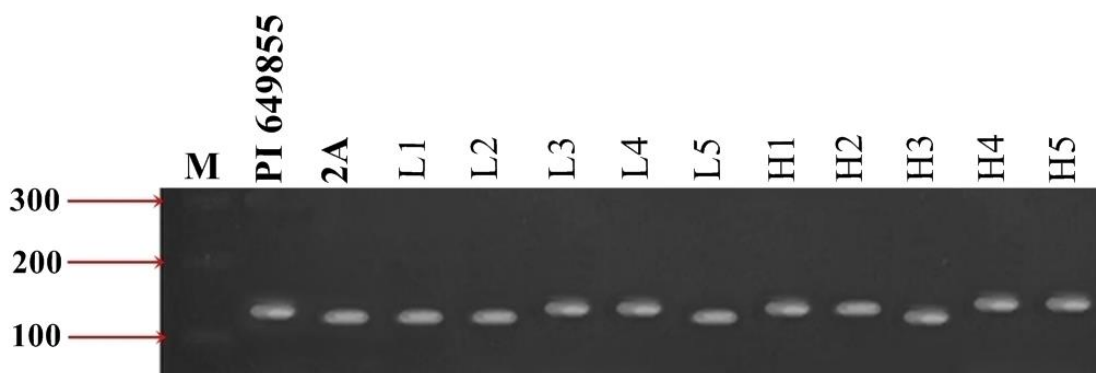
จากการนำ 15 ไพรมอร์มาทดสอบซ้ำเพื่อแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูงและต่ำในประชากร F_2 พบไพรมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำมี 13 ไพรมอร์ ได้แก่ N1-3F, ORS 309, ORS 311, ORS 319, ORS 321, ORS 333, ORS 337, ORS 339, ORS 371, ORS 488, ORS 598, ORS 1088 และ ha 4149 และมีเพียง 2 ไพรมอร์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรได้ อย่างไรก็ตามจาก 13 ไพรมอร์นั้นมีความสามารถในการแยกแตกต่างกัน คือ บางไพรมอร์สามารถแยกได้ 3 ต้น จาก 10 ต้น บางไพรมอร์สามารถแยกได้ 7 ต้น บางไพรมอร์สามารถตรวจสอบได้ต้นที่เหมือนพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำเท่านั้น และแยกต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงได้น้อยมาก ดังนั้นจึงได้เลือกไพรมอร์มาทดสอบต่อจำนวน 5 ไพรมอร์ ได้แก่ N1-3F, ORS 311, ORS 339, ORS 1088 และ ha 4149 โดยความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่แยกได้ในประชากร F_2 ที่ใช้ทดสอบ 10 ต้น ซึ่งได้ใช้ตัวอย่าง 5 ต้นเป็นต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำและกรดโอเลอิกสูง พบว่า 5 ไพรมอร์นี้สามารถแยกความแตกต่างของต้นได้ 7, 6, 4, 5 และ 3 ต้นตามลำดับ



ภาพที่ 4.8 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ N1-3F ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



ภาพที่ 4.9 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 296 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



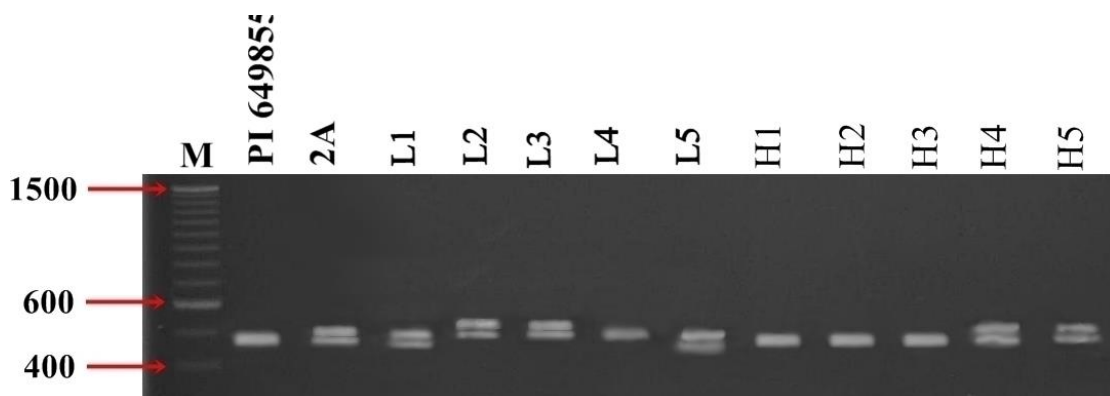
ภาพที่ 4.10 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 309 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



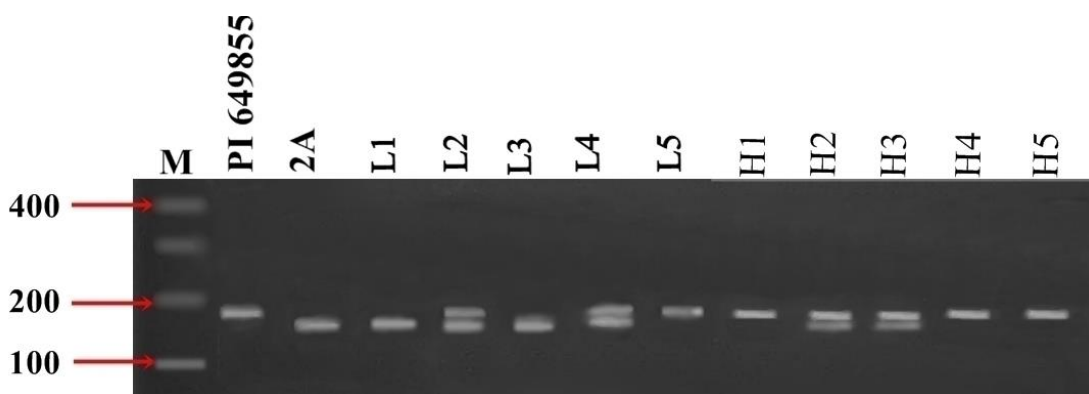
ภาพที่ 4.11 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 311 ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



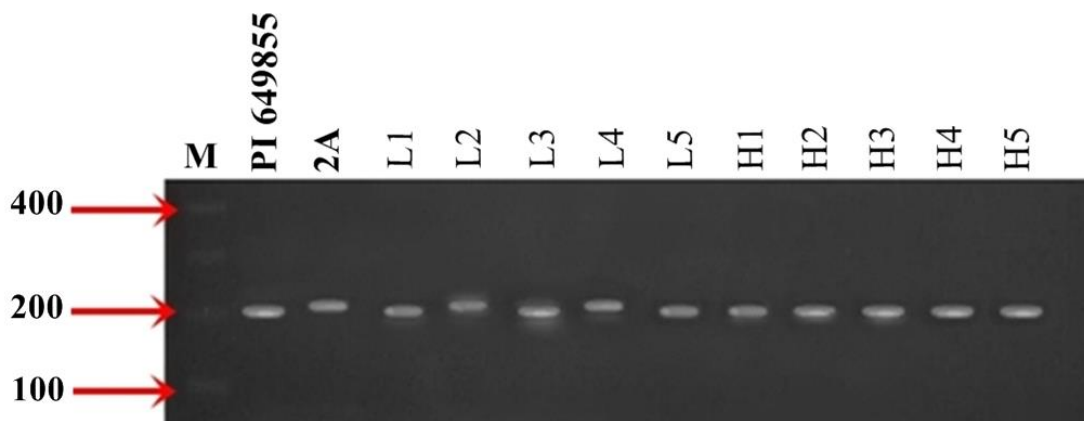
ภาพที่ 4.12 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 319 ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



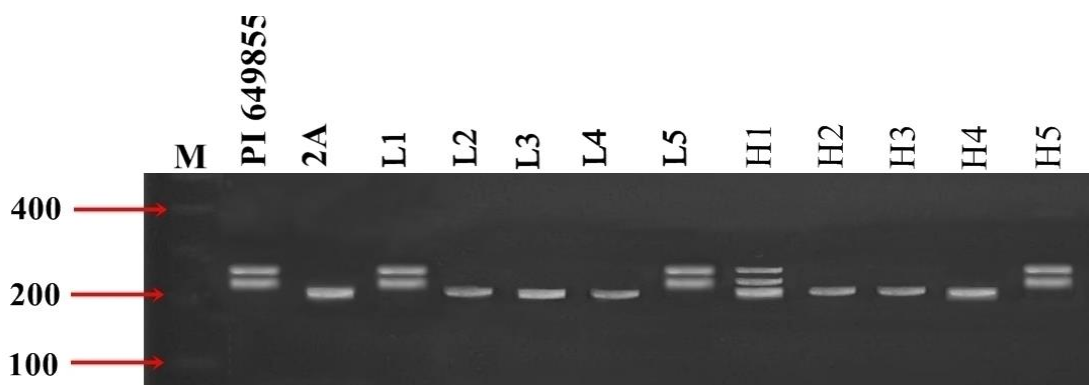
ภาพที่ 4.13 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 321 ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



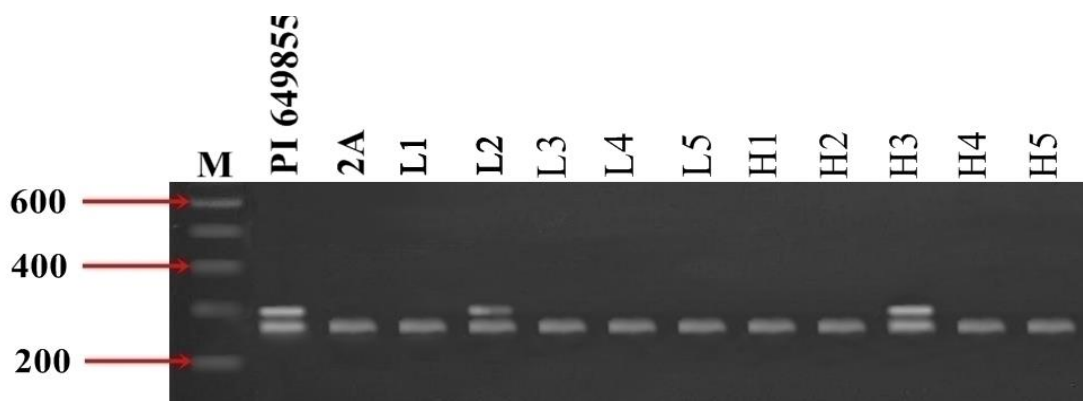
ภาพที่ 4.14 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 333 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



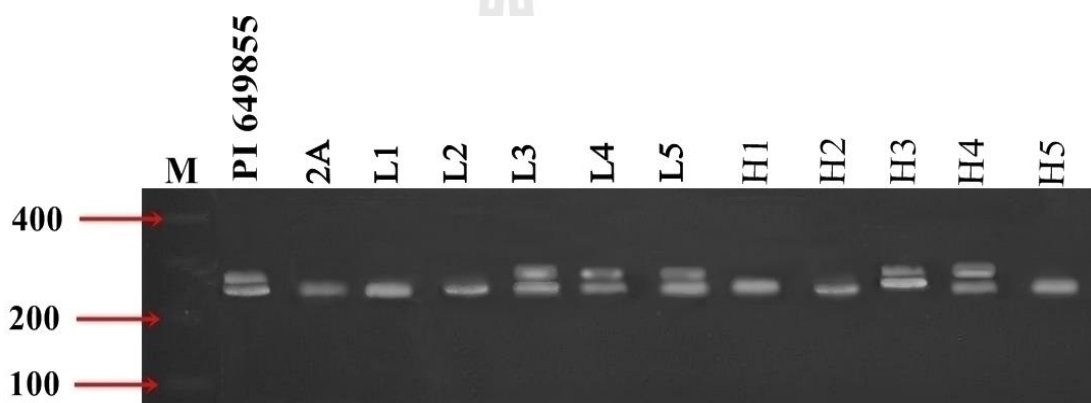
ภาพที่ 4.15 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 337 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



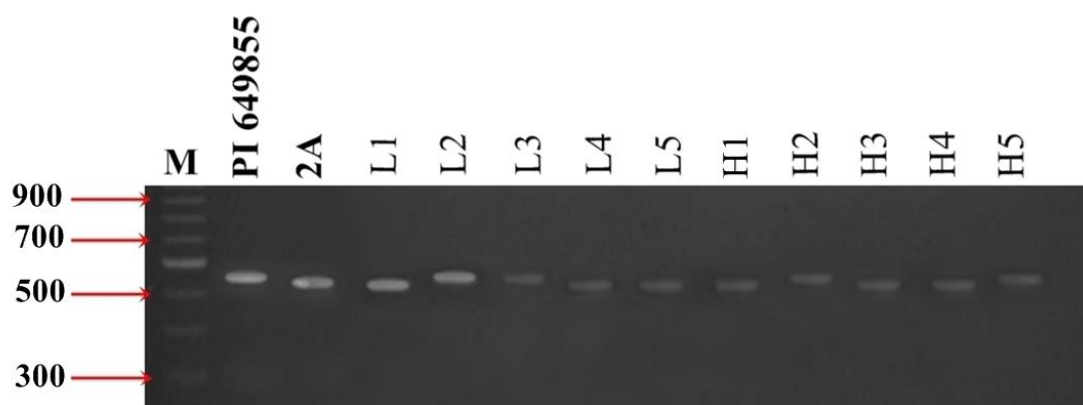
ภาพที่ 4.16 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 339 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



ภาพที่ 4.17 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 371 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



ภาพที่ 4.18 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 488 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



ภาพที่ 4.19 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 598 ใน 2% agarose gel
(M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



ภาพที่ 4.20 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 822 ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



ภาพที่ 4.21 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ORS 1088 ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)



ภาพที่ 4.22 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 ด้วยไพรเมอร์ ha 4149 ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder, L = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ, H = ต้น F_2 ที่มีกรดโอเลอิกสูง)

4.2.2.2 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นโดยใช้ 5 ไพรเมอร์ หลังจากคัดเลือกไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้แล้ว นำทั้ง 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ N1-3F, ORS 311, ORS 339, ORS 1088 และ ha 4149 มาทดสอบกับประชากร F_2 เป็นรายต้น เก็บข้อมูลแถบดีเอ็นเอ (genotype data) เพื่อเปรียบปริมาณกรดโอเลอิก (phenotype data) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 จำนวนต้น F_2 ที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูงและกรดโอเลอิกต่ำ

ไพรเมอร์	แถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์		แถบดีเอ็นเอเหมือนทั้ง
	กรดโอเลอิกสูง	กรดโอเลอิกต่ำ	
N1-3F	47 ต้น	43 ต้น	0 ต้น
ORS 311	42 ต้น	48 ต้น	0 ต้น
ORS 339	44 ต้น	37 ต้น	9 ต้น
ORS 1088	34 ต้น	36 ต้น	20 ต้น
ha 4149	22 ต้น	58 ต้น	10 ต้น

ผลการทดสอบจาก 5 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ N1-3F พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง 47 ต้น คิดเป็น 52.2 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำ 43 ต้น คิดเป็น 47.8 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ ORS 311 พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง 42 ต้น คิดเป็น 46.7 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำ 48 ต้น คิดเป็น 53.3 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ ORS 339 พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง 44 ต้น คิดเป็น 48.9 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำ 37 ต้น คิดเป็น 41.1 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ ORS 1088 พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง 34 ต้น คิดเป็น 37.8 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำ 36 ต้น คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ ha4149 พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกสูง 22 ต้น คิดเป็น 24.4 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นที่มีกรดโอเลอิกต่ำ 58 ต้น คิดเป็น 64.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไพรเมอร์ ORS 339, ORS 1088 และ ha 4149 พบแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ co-dominant จึงไม่สามารถแยกให้อยู่ในกลุ่มเหมือนพ่อหรือแม่ได้ ซึ่งไพรเมอร์ ha 4149 พบแถบดีเอ็นเอแบบนี้มากที่สุดถึง 22.2 เปอร์เซ็นต์

4.3 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่มีลิงก์เกจ (linkage) กับปริมาณกรดโอเลอิกสูง

4.3.1 การตรวจสอบลิงก์เกจระหว่างข้อมูลทางฟีโนไทป์กับข้อมูลทางจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยวิธี simple regression

เมื่อเก็บข้อมูลแถบดีเอ็นเอและปริมาณกรดโอเลอิกที่ได้แล้ว นำแต่ละไพรเมอร์มาวิเคราะห์ simple regression ด้วยโปรแกรม SPSS v.14 ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ simple regression ระหว่างปริมาณกรดโอเลอิกกับข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุล SSR 5 ไพรเมอร์

Parameters	ไพรเมอร์				
	N1-3F	ORS 311	ORS 339	ORS 1088	ha 4149
intercept	-0.110	-0.332	-0.396	0.310	0.556
R ²	0.032	0.052	0.057	0.009	0.0004
Adjusted R ²	0.021	0.041	0.047	-0.002	-0.011
Std. of estimation	0.497	0.491	0.630	0.771	0.688
Slop value (b)	0.010	0.012	0.017	0.008	-0.001
Sig.	0.087	0.028	0.021	0.379	0.851

ผลการวิเคราะห์ simple regression ระหว่างปริมาณกรดโอเลอิกกับข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุล 5 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 4.6) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ORS 311 และ ORS 339 มีนัยสำคัญกับปริมาณกรดโอเลอิก (Prob.= 0.028 และ 0.021 ตามลำดับ) แสดงว่าลักษณะปริมาณกรดโอเลอิกมี regression กับจีโนไทป์ บ่งชี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล ORS 311 และ ORS 339 มีลิงก์เกจอยู่กับตำแหน่ง QTL หรือบริเวณที่มียีนควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง และยังพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 ชนิดนี้มีความแปรปรวนต่อลักษณะกรดโอเลอิกสูงเท่ากับ 4.1 และ 4.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (adjusted R² = 0.041 และ 0.047) ซึ่งเป็นค่าที่ไม่สูงมากนัก แสดงว่าตำแหน่ง QTL ที่พบนี้น่าจะเป็น minor QTL กล่าวคือลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมด้วย QTL ตำแหน่งอื่นอีก ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลอีก 3 ชนิด (N1-3F, ORS 1088 และ ha 4149) นั้น ไม่พบความสัมพันธ์ บ่งชี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้อาจไม่มีลิงก์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง ถึงแม้ว่า Tang *et al.* (2002) ได้รายงานว่าเครื่องหมาย ORS 1088 จะมีตำแหน่งอยู่บน LG 10 ที่มีความเชื่อมโยงกับลักษณะกรดโอเลอิกสูง

4.3.2 การตรวจสอบลิงค์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง ด้วยโปรแกรม

Mapmaker

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอและปริมาณกรดโอเลอิกที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบลิงค์เกจของเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงด้วยโปรแกรม Mapmaker ผลที่ได้ปรากฏดังภาพที่ 4.23

```

*                               MAPMAKER/EXP
*
*                               (version 3.0b)
*
*
*
*****
*****

data from 'sample.raw' are loaded
  F2 intercross data  (93 individuals, 5 loci)
'photo' is on: file is 'sample.out'

4> sequence all
sequence #1= all

5> group
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 50.0

unlinked= N1_3F ORS311 ORS339 ORS1088 ha4149

6> q
save data before quitting? [yes] yes
saving map data in file 'sample.maps'... ok
saving two-point data in file 'sample.2pt'... ok

```

ภาพที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์ linkage ด้วยโปรแกรม Mapmaker

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 ไพรเมอร์ไปวิเคราะห์ลิงค์เกจโดยใช้โปรแกรม Mapmaker ผลที่ได้พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 ไพรเมอร์ไม่มีลิงค์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงในทานตะวันที่ระยะห่างมากกว่า 50 cM บ่งชี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวอาจเป็น minor gene หรืออาจอยู่คนละโครโมโซมกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง

จากการทดลองแยกความแตกต่างของประชากร F_2 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี simple regression พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล SSR ไพรเมอร์ ORS311 และ ORS339 มีลิงค์เกจกับตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง แต่

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mapmaker พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 ไพรเมอร์ดังกล่าวไม่มีลิงค์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง บ่งชี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล ORS 311 และ ORS 339 อาจเป็น minor QTL ที่ถูกควบคุมโดย QTL ตำแหน่งอื่นอีก เนื่องจากลักษณะกรดโอเลอิกสูงนั้นเป็นลักษณะปริมาณที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลอีก 3 ชนิด ได้แก่ N1-3F, ORS 1088 และ ha 4149 ไม่พบความสัมพันธ์กับตำแหน่ง QTL สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล ORS 1088 นั้นมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับตำแหน่งบน LG 10 (Tang *et al.*, 2002) แต่จากการทดลองครั้งนี้ไม่พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลนี้มีความสัมพันธ์กับตำแหน่ง QTL ซึ่งอาจเนื่องจากการใช้ประชากรของงานทดลองนี้แตกต่างจากงานทดลองดังกล่าว ดังนั้นการนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 ชนิด ที่มีลิงค์เกจกับ QTL ของลักษณะกรดโอเลอิกสูงไปพัฒนาโดยการทดสอบกับประชากรที่มีการกระจายตัวสูงและมีจำนวนประชากรในการทดสอบเป็นจำนวนมากอาจทำให้ข้อมูลที่ได้มีความชัดเจนมากขึ้นและสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการคัดเลือกลักษณะกรดโอเลอิกสูงได้ อีกทั้งในการศึกษาขั้นต่อไปควรเลือกไพรเมอร์ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ โดยเป็นไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งบน LG ที่มีตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูงอยู่ ซึ่งทำให้มีโอกาสพบเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงหรือมีลิงค์เกจกับยีนได้มากขึ้น นอกจากนี้ในการทดลองนี้มีประชากร F_2 ที่ใช้ทดสอบเพียง 90 ต้น ซึ่งอาจเป็นประชากรที่น้อย ในขณะที่มีรายงานว่าลักษณะนี้ถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะ



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร F_2

จากการศึกษาการกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร P_1 P_2 F_1 และ F_2 โดยใช้ทานตะวันพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกสูง (PI 649855) ผสมพันธุ์กับสายพันธุ์ที่มีกรดโอเลอิกต่ำ (2A) จนได้ประชากร F_2 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดโอเลอิกของประชากร P_1 P_2 F_1 และ F_2 พบว่าในประชากร F_1 มีการกระจายตัวแบบปกติและอยู่ในช่วง 40-80 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำสุด 44.70 เปอร์เซ็นต์ ค่าสูงที่สุด 75.57 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ย 61.36 เปอร์เซ็นต์ F_2 มีการกระจายตัวอยู่ในช่วง 50-90 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำสุด 48.81 เปอร์เซ็นต์ สูงที่สุด 81.88 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ย 64.35 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าเฉลี่ยของ F_1 และ F_2 มีแนวโน้มไปในทางกรดโอเลอิกสูง (ใกล้กับ PI 649855) ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่าลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมโดยยีนข่มบางส่วน (partially dominance) เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของปริมาณกรดโอเลอิกในประชากร F_2 พบว่ามีอัตราส่วนของต้นที่มีกรดโอเลอิก สูง : ต่ำ-ปานกลาง เท่ากับ 3 : 1 บ่งชี้ว่าลักษณะกรดโอเลอิกสูงถูกควบคุมโดยยีนหลักเพียง 1 คู่ และยีนมีการแสดงออกแบบข่มบางส่วน

5.2 การวัดลักษณะทางจีโนไทป์ของลักษณะกรดโอเลอิกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

จากการทดลองแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 37 ไพรเมอร์ กับพันธุ์พ่อ (กรดโอเลอิกสูง) และพันธุ์แม่ (กรดโอเลอิกต่ำ) พบว่ามี 15 ไพรเมอร์ ที่อาจจะแยกความแตกต่างได้ จึงนำไปทดสอบซ้ำในประชากร F_2 จำนวน 10 ต้น ผลการทดสอบพบว่ามีอย่างน้อย 13 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรทั้งสองได้ชัดเจน จากนั้นนำไพรเมอร์ที่แยกความแตกต่างได้ทั้ง 13 ไพรเมอร์ไปทดสอบอีกครั้งกับประชากร F_2 กลุ่มที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำได้ จากนั้นเลือกไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างได้อย่างชัดเจนจำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ N1-3F, ORS 311, ORS 339, ORS 1088 และ ha 4149 ไปทดสอบกับประชากร F_2 เป็นรายต้น และวิเคราะห์ลิงค์เกจกับลักษณะกรดโอเลอิกสูงโดยวิธี simple regression พบว่าไพรเมอร์ ORS 311 และ ORS 339 มีนัยสำคัญกับปริมาณกรดโอเลอิก (Sig.= 0.028 และ 0.021 ตามลำดับ) และมีค่า $R^2 = 0.041$ และ 0.047 ตามลำดับ แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุล ORS 311 และ ORS 339 มีลิงค์เกจกับตำแหน่ง QTL

ของลักษณะกรดโอเลอิกสูง ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองดังกล่าว พบอย่างน้อย 13 ไพรมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างทานตะวันต้นที่มีกรดโอเลอิกสูงและต่ำออกจากกันได้ ดังนั้นสามารถนำไพรมอร์ทั้ง 13 ไพรมอร์ไปใช้แยกความแตกต่างของลักษณะกรดโอเลอิกสูงอย่างคร่าว ๆ ได้ ซึ่งในอนาคตจำเป็นต้องทำการศึกษาและทดลองต่อไปในประชากรที่หลากหลายและมีประชากรขนาดใหญ่จนพบไพรมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างและมีลิงค์เกจกับยีนที่ควบคุมลักษณะกรดโอเลอิกสูง จึงจะสามารถนำไพรมอร์ดังกล่าวไปใช้คัดเลือกพันธุ์ทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้มีกรดโอเลอิกสูงอย่างมาก เนื่องจากการคัดเลือกที่ระดับจีโนมไทป์โดยตรงซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลงและสามารถคัดเลือกได้อย่างแม่นยำ



รายการอ้างอิง

- คิมห์ พูนตร์พาณิชย์, สุรียา ตันติวิวัฒน์, ยินดี ชาญวิวัฒนา, อรณูช ลีลาพร และ ธราธร ทิรมลจิตติ. (2554). ระบบเครือข่ายพันธุกรรมควบคุมวิถีการพัฒนายของเอ็มบริโอมน้ำสำหรับ friable embryogenic callus (FEC) [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://158.108.17.142/BotSeminar/fullpaper/O-40.pdf>.
- เฉลิมขวัญ สุขเกษม. (2555). อิทธิพลของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมต่อปริมาณกรดโอเลอิกในทานตะวัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 57 หน้า.
- จิตติพร มะชิโกวา. (2554). โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน. ใน รายงานการวิจัย มทส. 56 หน้า.
- นัยนา บุญทวีวัฒน์ และเรวดี จงสุวัฒน์. (2545). น้ำมันรำข้าว ทางเลือกเพื่อสุขภาพของคนไทย. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 23.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ, ปิยะดา ทิพย์ส่อง, กิตติ สัจจาวัฒนา, มนตรี แหนงใหม่, ชัยยะ แสงอุ่น, ยศศักดิ์ แก้มค้างพลู, ยุพยงค์ จันทร์จำ, จุฑามาศ เพ็ชร์ชัย, ภาคภูมิ ศรีหมื่นไวย และจิตติพร มะชิโกวา. (2548). การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. ใน รายงานการวิจัยโครงการพัฒนาการผลิตทานตะวัน ระยะที่ 2. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 46 หน้า.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2557). ผลงานชุมชนเพื่อการพึ่งพาตนเอง [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://nstda.or.th/rural/03tech-urban05-3.html>.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). การผลิตทานตะวัน [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.oae.go.th>
- เสาวรี ตั้งสกุล, ศุภชัย แก้วมีชัย, สมยศ พิษิตพร, เพิ่มศักดิ์ สุภาพรเหมินทร์, สมศักดิ์ ศรีสมบุญ และเสน่ห์ เครือแก้ว. (2553). ความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เบอร์ 1. ใน การประชุมวิชาการ งาน ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 2. หน้า 148-155.
- AOCS. (1997). Preparation of methyl esters of fatty acids, Official and Recommended Practices of the AOCS, AOCS Press, Official Method Ce. pp.2-66.
- Bostein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.** 32: 314-331.

- BUCHI (Thailand) Ltd. (2012). Manual NIRFlex N-500. 19 pp.
- Codex stan 210-1999. (1999). Codex standard for named vegetable oils. pp.1-16.
- Darvishzadeh, R., Azizi, M., Hatami-Maleki, H., Bernousi, I., Abdollahi Mandoulakani, B., Jafari, M. and Sarrafi, A. (2010). Molecular characterization and similarity relationships among sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines using some mapped simple sequence repeats. **Afr. J. Biotechnol.** 9: 7280-7288.
- Dehmer, K.J. and Friedt, W. (1998). Development of molecular marker for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Ind. Crop. Prod.** 7: 311-315.
- Del Rio-Celestino, M.R. and De Haro-Bailon, F. (2007). Inheritance of high oleic acid content in the seed oil of mutant Ethiopian mustard lines and its relationship with erucic acid content. **J. Agri. Sci.** 145: 353-365.
- Fernandez-Martinez, J., Dominguez-Gimenez, A. and Jimenez-Ramirez, A. (1988). Breeding for high content of oleic acid in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil. **Helia.** 11: 11-15.
- Fernandez-Martinez, J., Dominguez-Gimenez, A. and Jimenez-Ramirez, A. (1989). Genetic analysis of the high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Euphytica.** 41: 39-51.
- Fick, G.N. (1984). Inheritance of high oleic acid in seed oil of sunflower. *In Proceedings of the 6th Sunflower Forum*, Bismarck, ND: National Sunflower Association.
- Fick, G.N. and Miller, J.F. (1997). Sunflower breeding. *In: A.A. Schneiter (ed) Sunflower Technology and Production*. CSSA, Madison, WI, USA. pp. 395-439.
- Garces, R. and Mancha, M. (1993). One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. **Anal.Biochem.** 211: 139-143.
- Grandon, G.N., Moreno, V., Scorcione, C., Gioco, O.J., Alvarez, D., Paniego, N. and Heinz, R. (2012). Characterization on sunflower inbred lines (*Helianthus annuus* L.) for high oleic acid content using SSR markers. **INTA.** 2: 1-7.
- Hamdan, Y.A.S., Perez-Vich, B., Velasco, L. and Fernández-Martínez, J. (2009). Inheritance of high oleic acid content in safflower. **Euphytica.** 168: 61-69.
- Haddadi, P., Yazdi-samadi, B., Langlade, N.B., Naghavi, M.R., Berger, M., Kalantari, A., Calmon, A., Muary, P., Vincourt, P. and Sarrafi, A. (2010). Genetic control of protein, oil and fatty acids content under partial drought stress and late sowing conditions in sunflower (*Helianthus annuus*). **Afr. J. Biotechnol.** 9(40): 6768-6782.

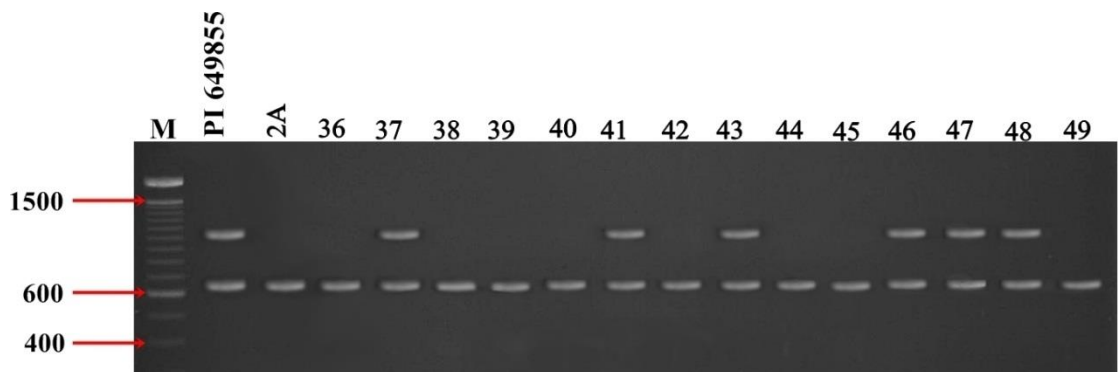
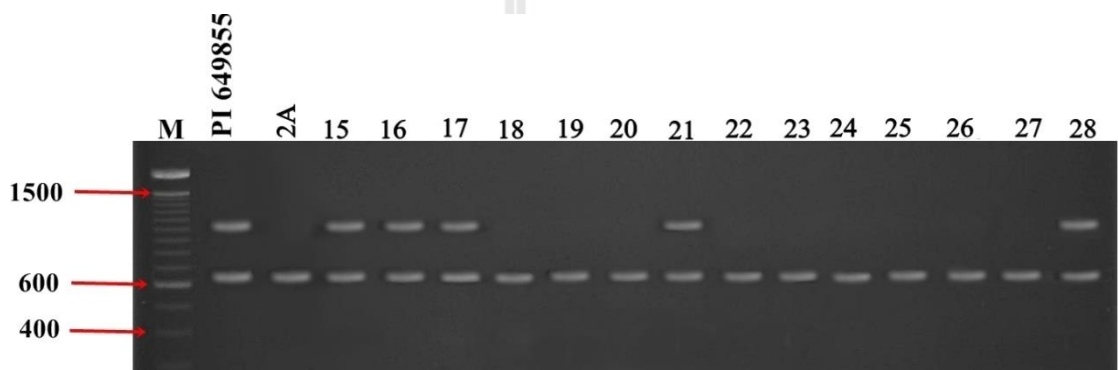
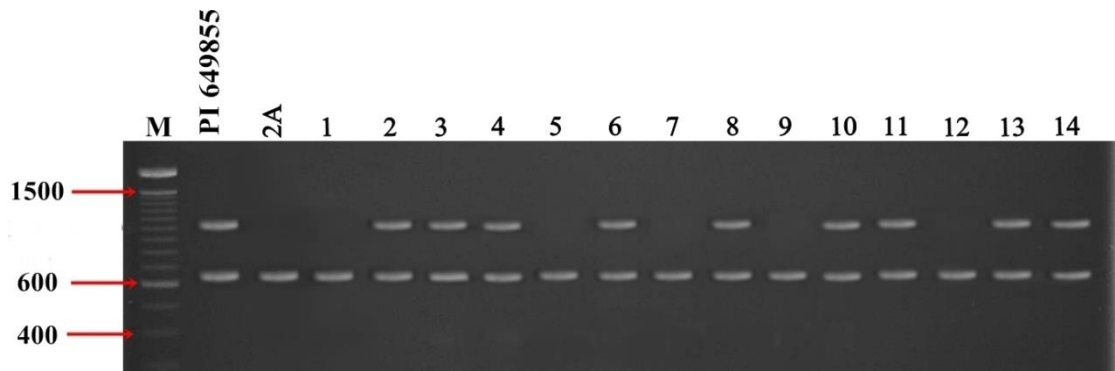
- Iqbal, A., Sadaqat, H.A., Khan, A.S. and Amjad, M. (2010). Identification of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae) hybrids using simple sequence repeat markers. **Genet. Mol. Res.** 10: 102-106.
- Izquierdo, N., Aguirrezabal, L., Andrade, F. and Pereyra, V. (2002). Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. **Field Crop Res.** 77: 115-126.
- Jung, S., Powell, G., Moore, K. and Abbott, A.G. (2000a). The high oleate trait in the cultivated peanut *Arachis hypogaea* L. II. Molecular basis and genetics of the trait. **Mol. Gen. Genet.** 263: 806-811.
- Jung, S., Swift, D., Sengoku, E., Patel, M., Teule, F., Powell, G., Moore, K. and Abbott, A. (2000b). The high oleate trait in the cultivated peanut *Arachis hypogaea* L. I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases. **Mol. Gen. Genet.** 263: 796-805.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. and Newbur, G.L. (1987). Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics.** 1: 174-181.
- Liu, Q., Singh, S. and Green, A. (2002). High-oleic and high-stearic cotton seed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. **J. Am. Coll. Nutr.** 21: 205s-211s.
- Mensink, R.P., Temple, E.H.M. and Hornstra, G. (1994). Dietary saturated and trans fatty acids and lipoprotein metabolism. **Ann. Med.** 26: 461-464.
- Miller, J.F. and Fick, G.N. (1997). The genetics of sunflower. *In*: **A.A. Schneiter (ed) Sunflower Technology and Production.** CSSA. Madison. WI. USA. pp. 441-495.
- Miller, J.F., Zimmerman, D.C., Vick, B.A. and Roath, W.W. (1987). Registration of sixteen high oleic sunflower germplasm lines and bulk population. **Crop Sci.** 27(6): 1,323-1,323.
- Moore, K.M. and Knauff, D.A. (1989). The inheritance of high oleic acid in peanut. **J. Hered.** 80: 252-253.
- Nagarathna, T.K., Shadakshari, Y.G. and Ramanappa, T.M. (2011). Molecular analysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high oleic acid using microsatellite markers. **Helia.** 34: 63-68.
- Pérez-Vich, B., Velasco, L. and Fernández-Martínez, J. (1998). Determination of seed oil content

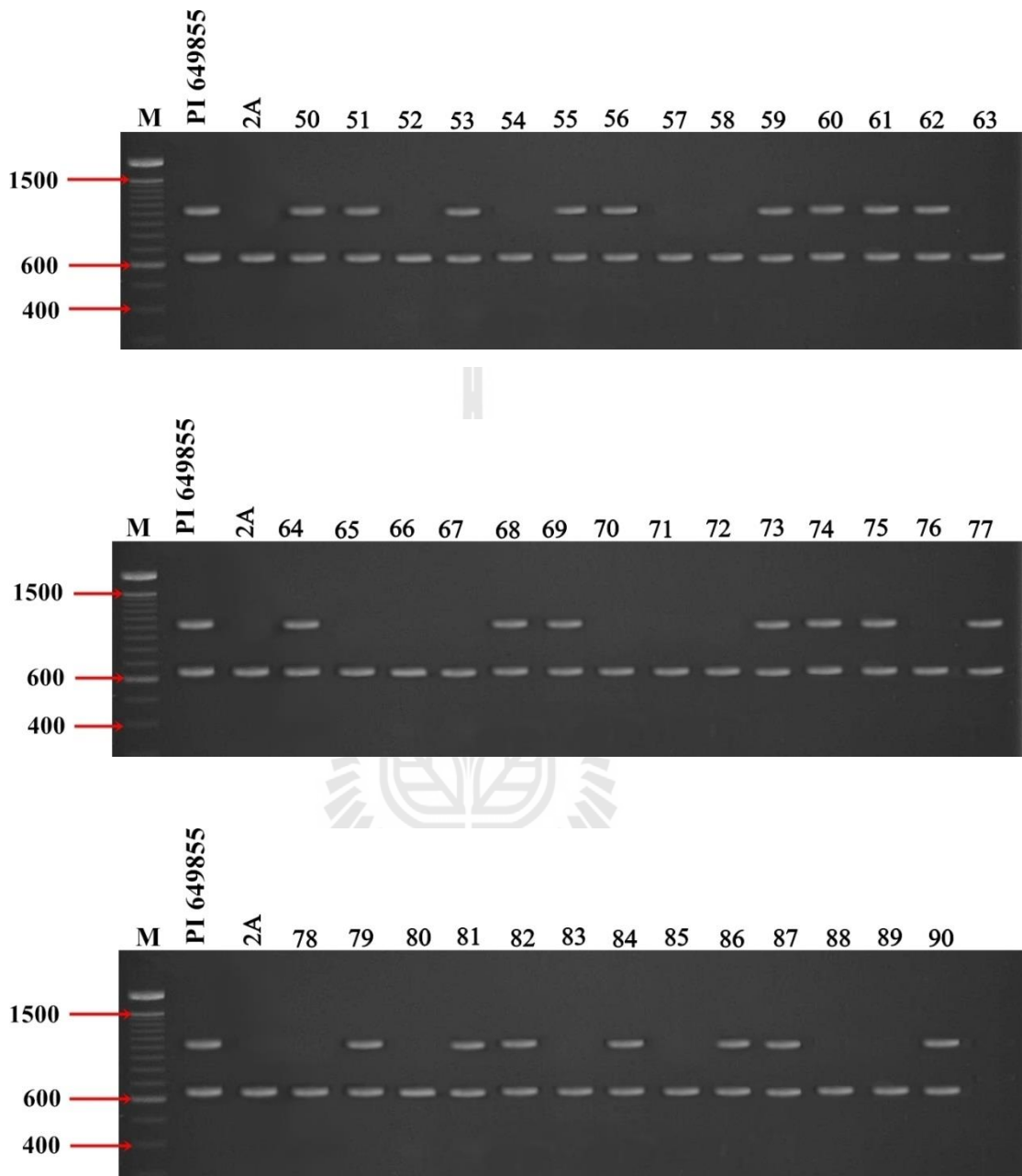
- and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by nearinfrared reflectance spectroscopy. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** 75(5): 547-555.
- Poormohammad, K.S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniego, N. and Sarrafí, A. (2007). Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. **Plant Science**. 172: 773-787.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Mol. Biol.** 5: 69-76.
- Schierholt, A., Becker, H.C. and Ecke, W. (2000). Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Theor. Appl. Genet.** 101: 897-901.
- Schierholt, A. and Becker, H.C. (2001). Environmental variability and heritability of high oleic acid content in winter oilseed rape. **Plant Breeding**. 120: 63–66.
- Severine, L., Sandrine, L., Francois, K. and Andre, B. (2002). Inheritance of oleic acid content in F₂ and a population of recombinant inbred lines segregating for the high oleic trait in sunflower. **Helia**. 25: 85-94.
- Soldatov, K.I. (1976). Chemical mutagenesis in sunflower breeding. *In* **Proceeding of the VII International Sunflower Conference**. pp. 352-357.
- SPSS Inc. (2005). **SPSS for Windows**, v.14.0. Chicago, SPSS.
- Tang, S., Yu, J., Slabaugh, M., Shintani, D. and Knapp, S. (2002). Simple sequence repeat map of the sunflower genome. **Theor. Appl. Genet.** 105: 1,124-1,136.
- Tshediso, A.M. (2013). The application of DNA fingerprinting and marker-assisted backcross selection in breeding for sunflower high oleic acid content lines. Dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree master of science (botany). 90 pp.
- Urie, A.L. (1985). Inheritance of high oleic acid in sunflower. **Crop Sci.** 25: 986–989.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4,407-4,414.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with consensus tRNA gene primers. **Nucl. Acids Res.** 19: 861-866.
- Willet, W.C. (1994). Diet and health: What should we eat?. **Science**. 264: 532-537.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 18: 6,531-6,535.

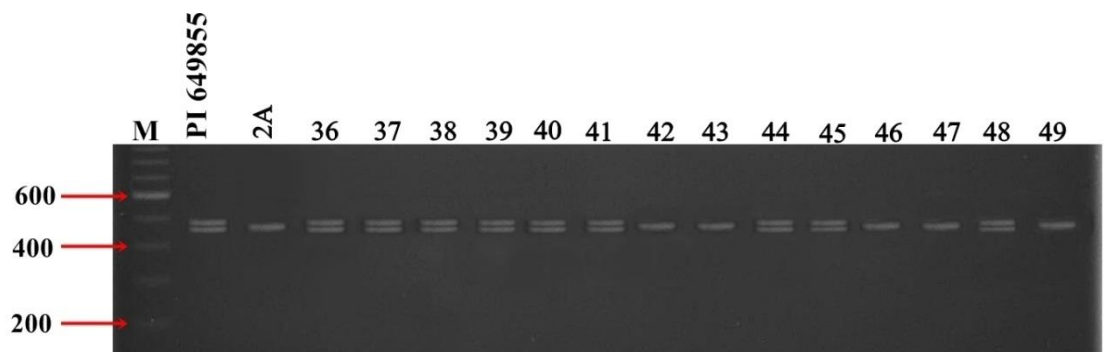
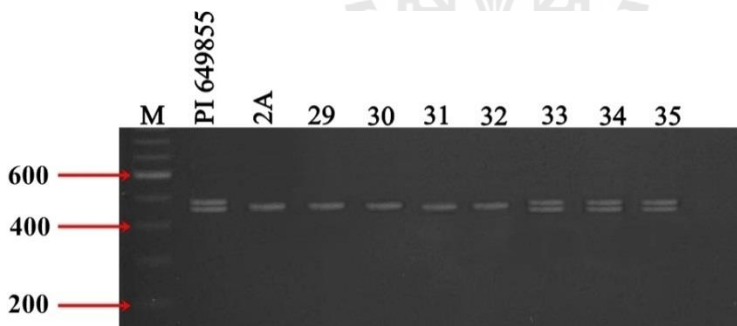
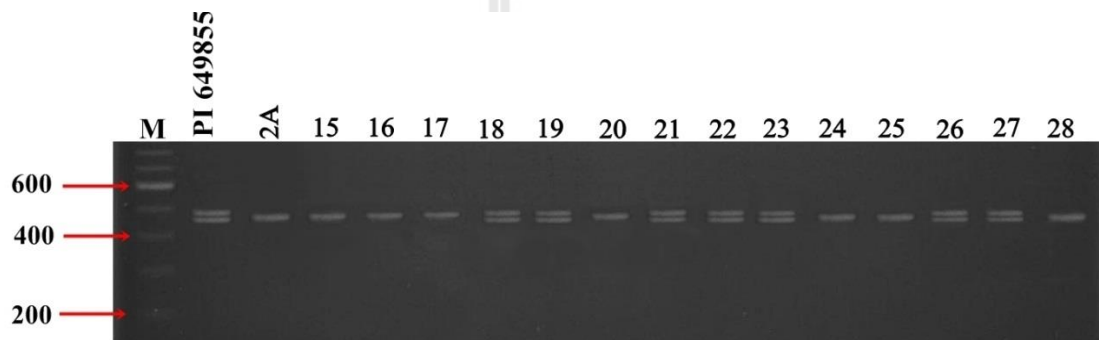
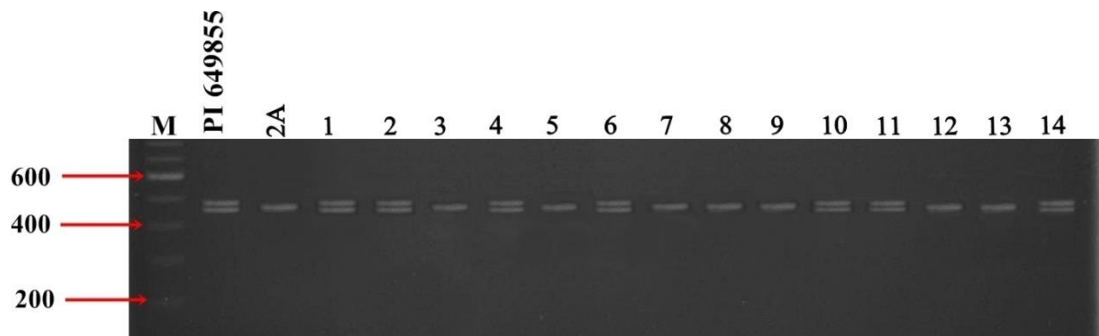


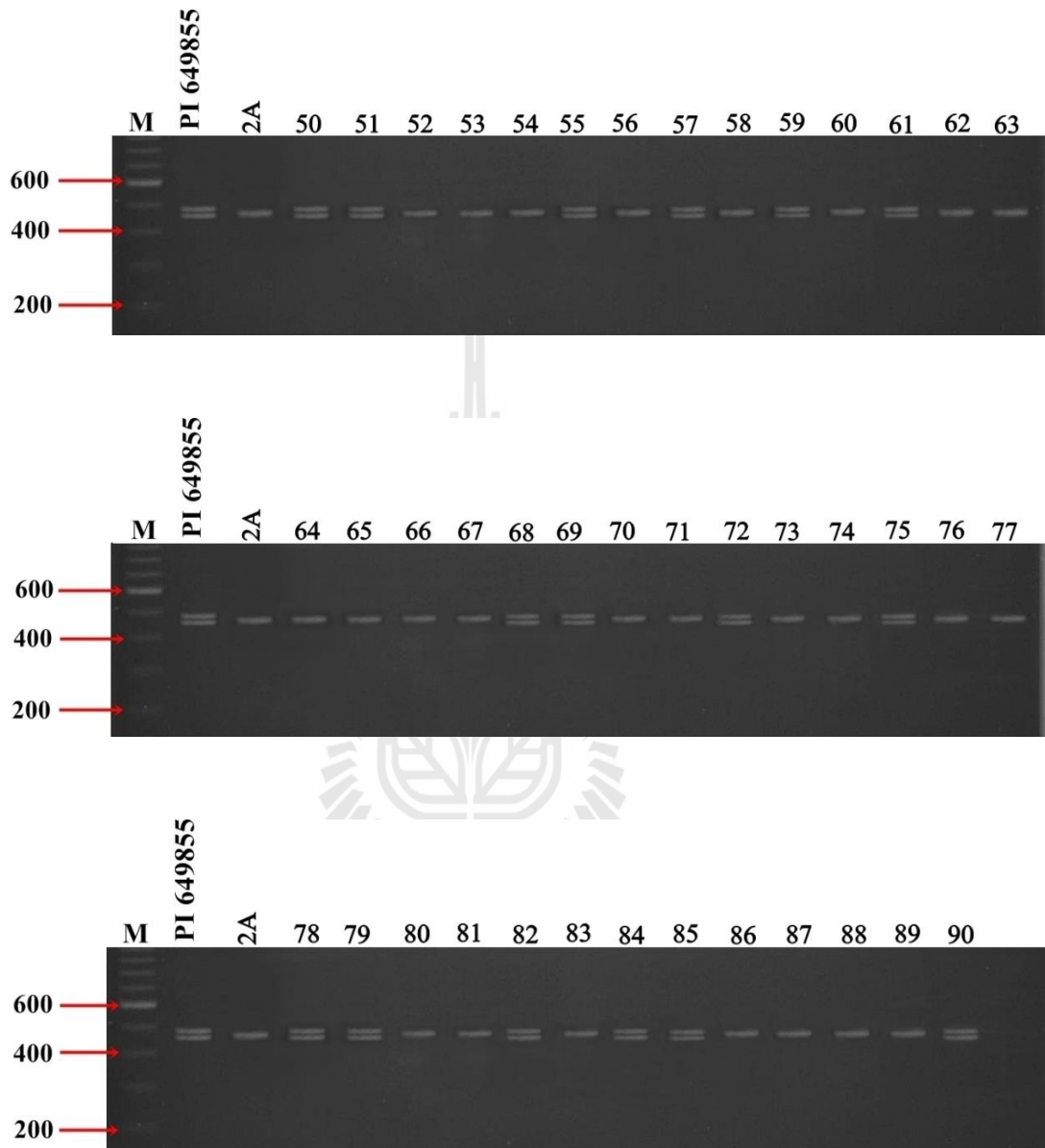




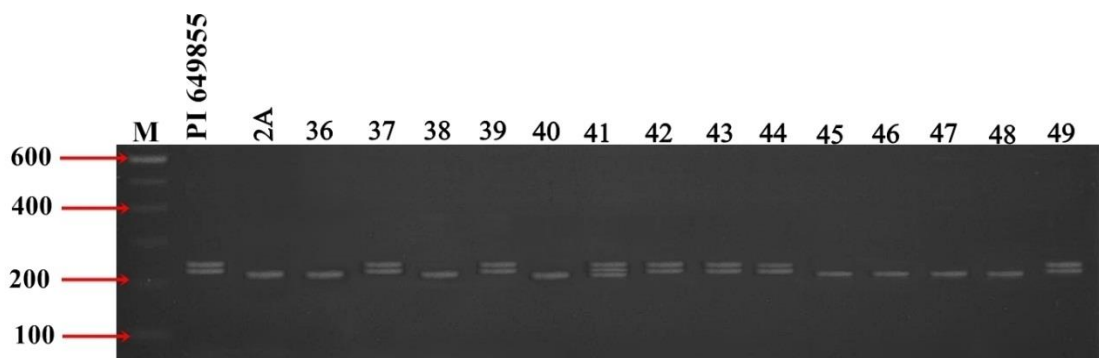
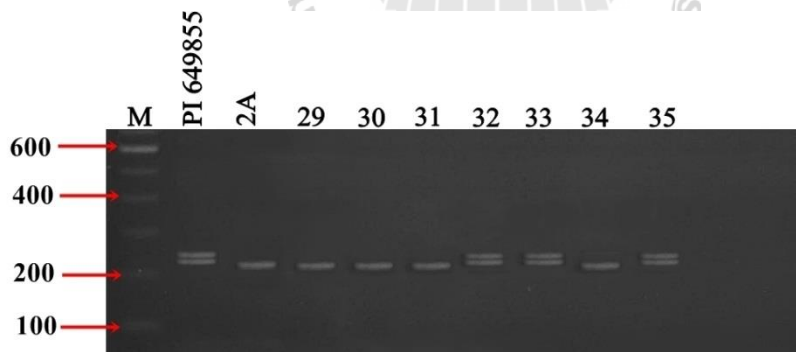
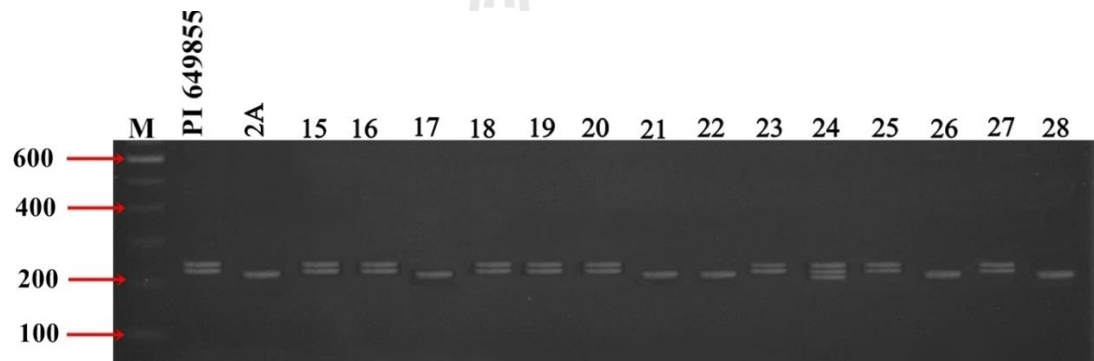
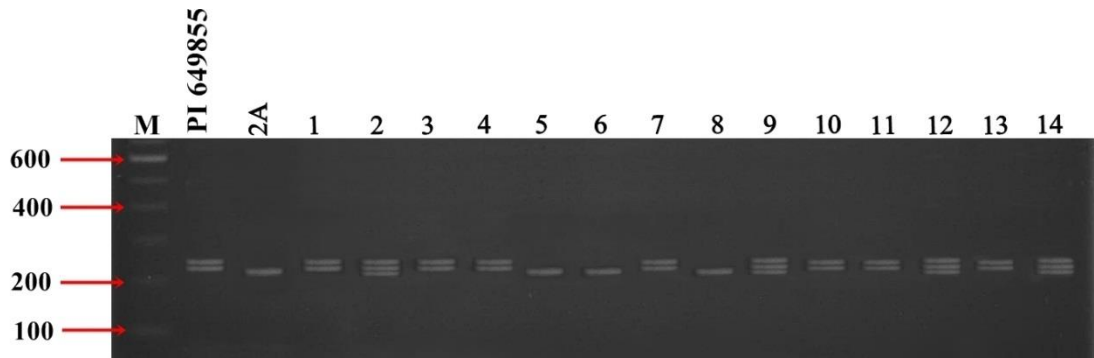


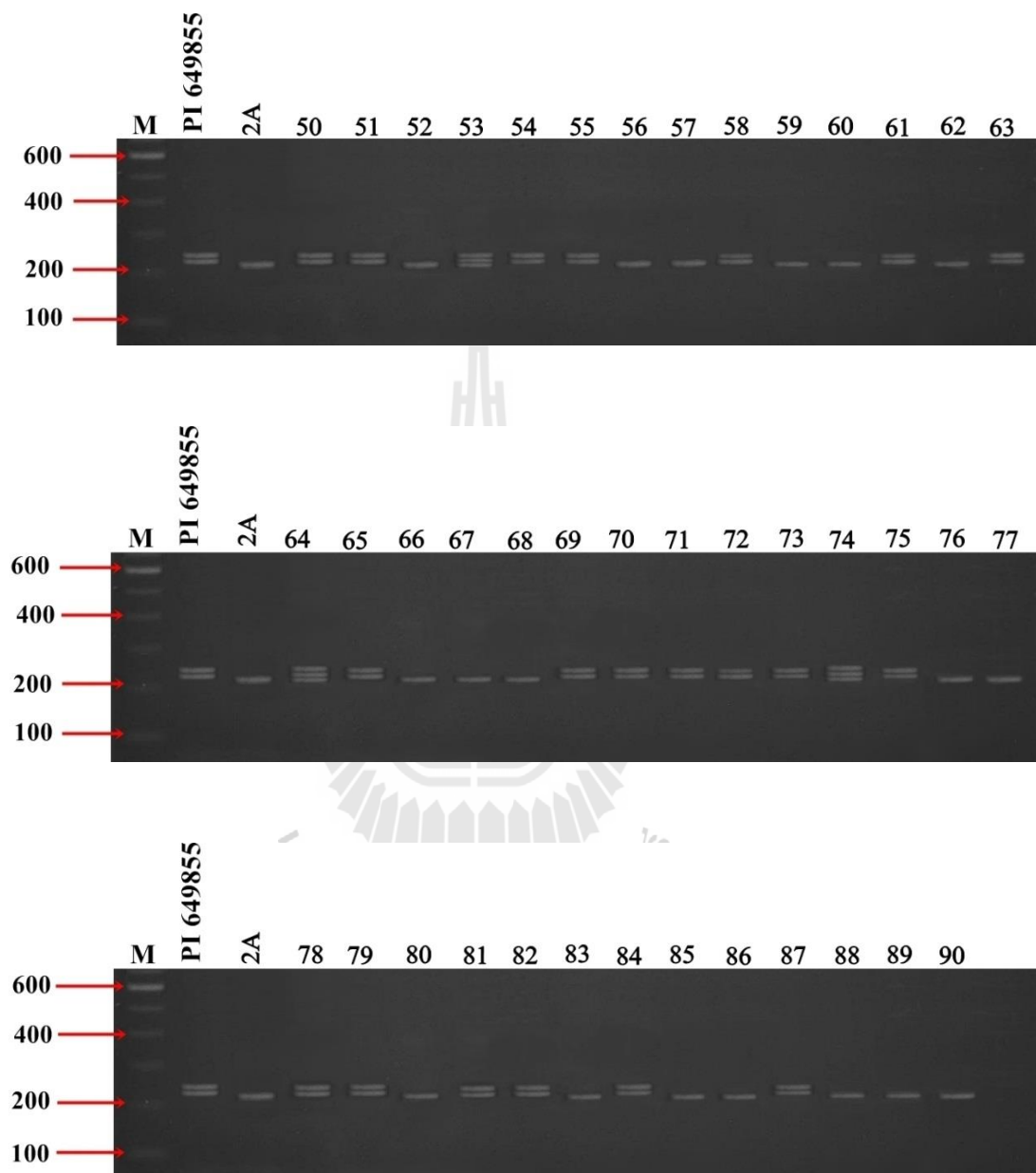
ภาพที่ 1 การแยกความแตกต่างของประชากร F₂ เป็นรายต้นด้วยไพรมอร์ N1-3F ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder)



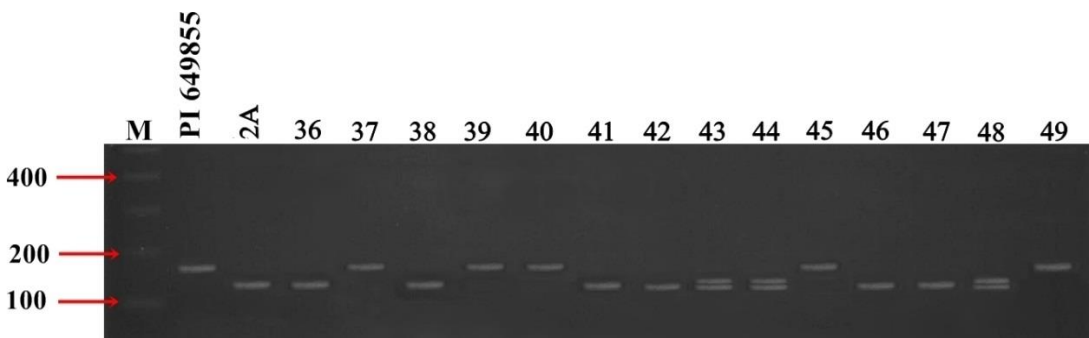
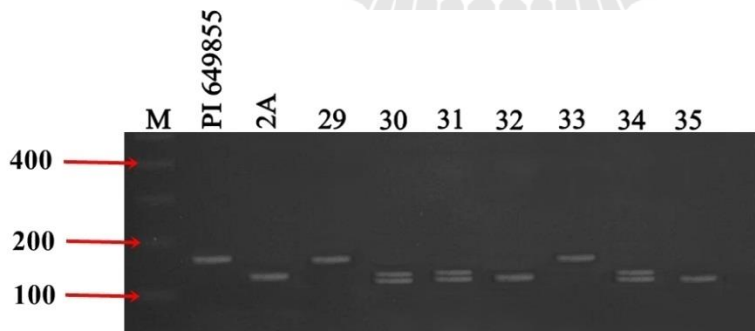
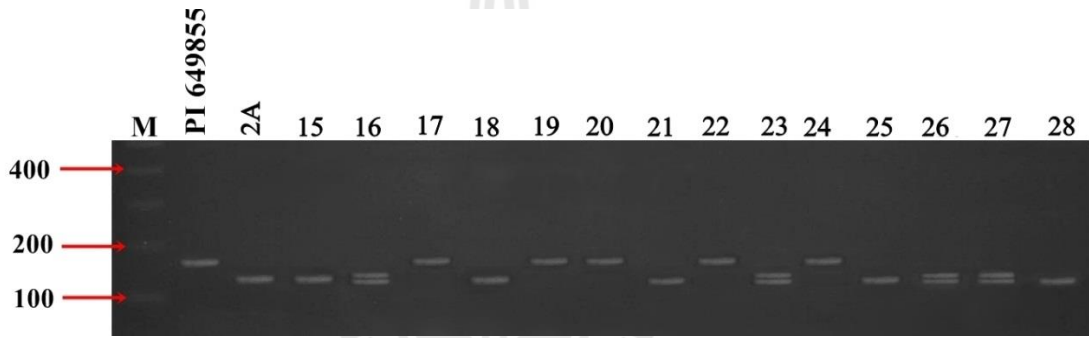
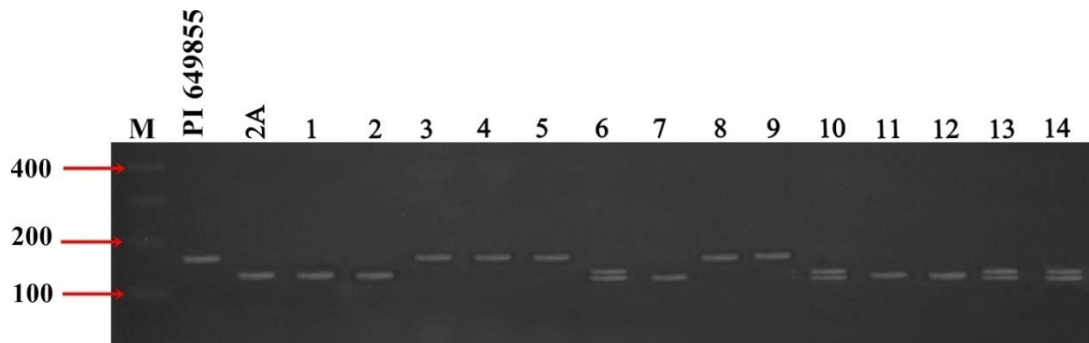


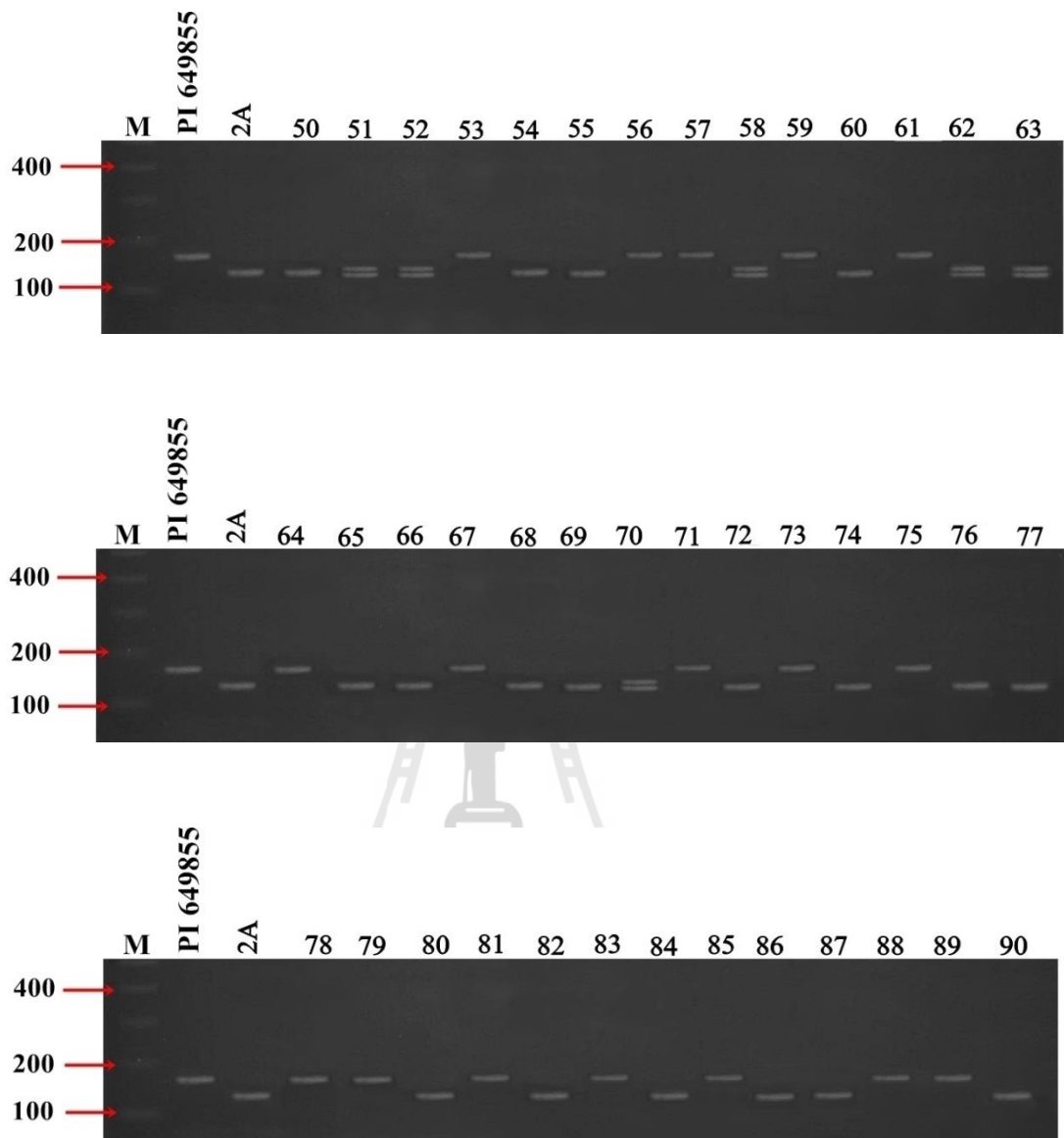
ภาพที่ 2 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นด้วยไพรเมอร์ ORS 311
ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder)



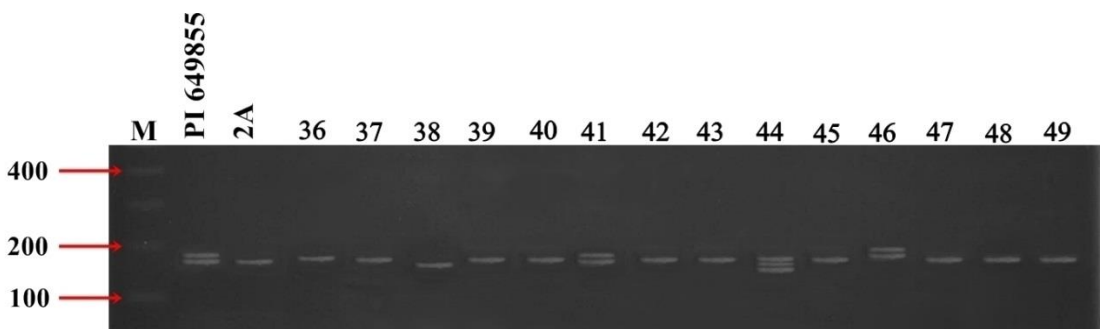
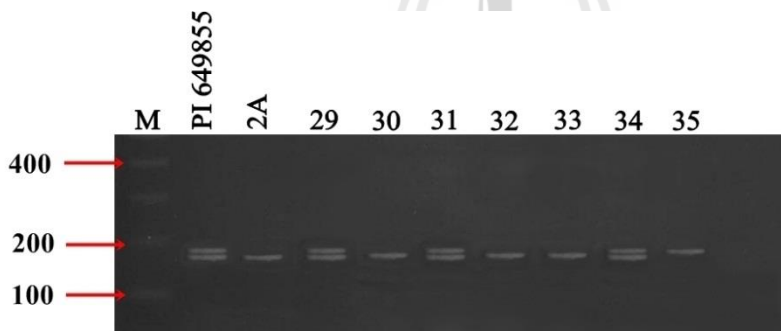
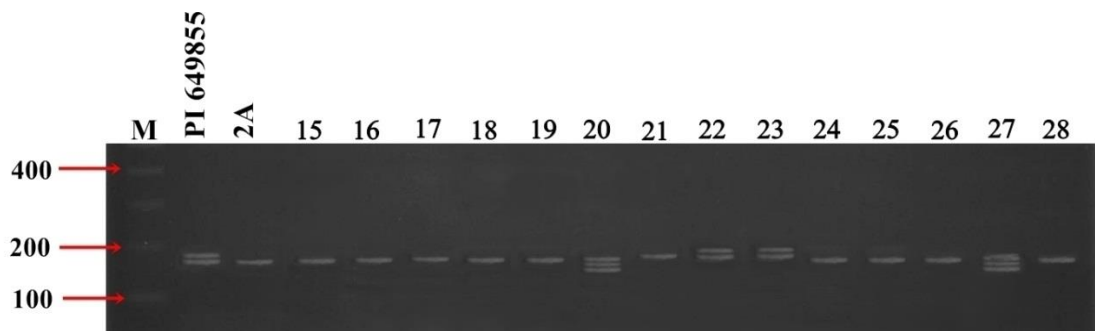
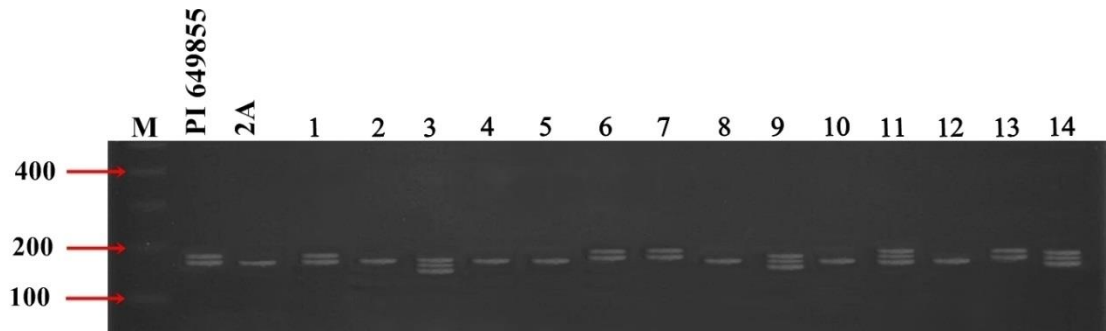


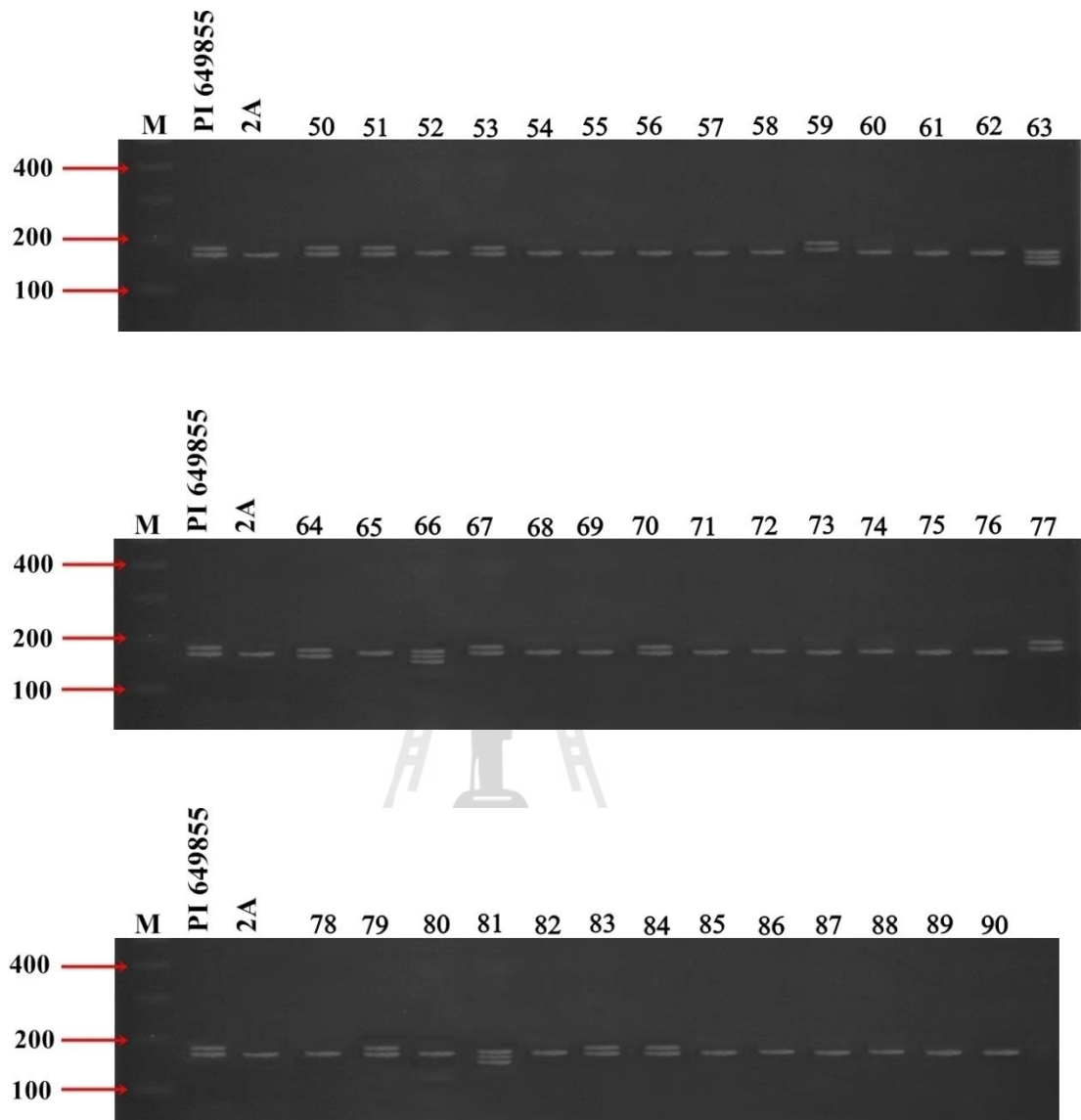
ภาพที่ 3 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นด้วยไพรเมอร์ ORS 339
ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder)





ภาพที่ 4 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นด้วยไพรมอร์ ORS 1088
ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder)





ภาพที่ 5 การแยกความแตกต่างของประชากร F_2 เป็นรายต้นด้วยไพรเมอร์ ha 4149
ใน 2% agarose gel (M = 100 bp ladder)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอาทิตย์ยา สิงห์ชัย เกิดเมื่อวันที่ 10 กรกฎาคม พ.ศ. 2531 อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาและมัธยมศึกษาตอนต้นศึกษาจากโรงเรียนเซนต์ปอลคอนแวนต์ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ในปีการศึกษา 2546 เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายที่ โรงเรียนศรีราชาอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ต่อมาในปีการศึกษา 2549 เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยในขณะศึกษาได้ปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ บริษัท มิตรผลวิจัยพัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด (งานด้านปรับปรุงพันธุ์) และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2552 ด้วยเกียรตินิยมอันดับ 2 หลังจากนั้น เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษาในปีการศึกษา 2553 สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยได้รับทุนเรียนดีจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและทุนสนับสนุนการวิจัยส่วนหนึ่งจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

