รหัสโครงการ [SUT1-104-56-12-16]

รายงานการวิจัย

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันโดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์และอาร์เอพีดี

Evaluation of genetic diversity of sunflower by molecular SSR and RAPD markers

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ [SUT1-104-56-12-16]

รายงานการวิจัย

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันโดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์และอาร์เอพีดี

Evaluation of genetic diversity of sunflower by molecular SSR and RAPD markers

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. หนูเดือน เมืองแสน

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา

นางสาวปัญจมา จรรยาเลิศอดุล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย และท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ช่วยเหลือการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล และหวังว่ารายงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจ

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2560

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางของทานตะวันที่ปรับปรุงพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเทียบกับพันธุ์ลูกผสมทางการค้าและพันธุ์จากต่างประเทศโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ทำการประเมินทานตะวันรวม 24 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แท้ 13 สายพันธุ์ พันธุ์สังเคราะห์ 8 พันธุ์ และพันธุ์ลูกผสม 3 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี 14 ไพรเมอร์และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ 16 ไพรเมอร์ ผลการศึกษาพบว่าทานตะวัน 24 สายพันธุ์ให้ค่าความแตกต่างหรือพอลิมอฟิซึม (PIC) ที่คำนวณด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดีมีค่าอยู่ระหว่าง 0.02-0.74 ค่าเฉลี่ย 0.40 ต่ำกว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.46-0.81 ค่าเฉลี่ย 0.64 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์มีความสามารถในการให้ความแตกต่างหรือพอลิมอฟิซึมสูงกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดี เดนโดรแกรมที่สร้างขึ้นด้วยวิธี UPGMA จากเครื่องหมายดีเอ็นเอสองชนิดแบ่งทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์เป็นสองกลุ่มหลักอย่างชัดเจน เดนโดรแกรมที่จำแนกด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์แสดงความสอดคล้องกับข้อมูลแหล่งที่มาของสายพันธุ์ การจัดกลุ่มจากทั้งสองระบบเครื่องหมายยังแสดงให้เห็นว่าพันธุ์ลูกผสมทางการค้าและพันธุ์จากต่างประเทศแยกออกจากสายพันธุ์แท้และพันธุ์สังเคราะห์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นอกจากนี้ การวิเคราะห์พีซีโอเอ (PCoA) ยังบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์พีซีโอเอสอดคล้องกับการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยเดนโดรแกรม ยืนยันได้จากการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันระหว่างค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมซึ่งมีค่าไปทางบวก (0.85) ความสัมพันธ์ที่สูงนี้แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มที่เกิดจากทั้งสองระบบเครื่องหมายนี้มีความสอดคล้องกัน ข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ไม่เพียงแต่มีประโยชน์มากสำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมและการระบุสายพันธุ์แท้ แต่ยังมีประโยชน์ต่อการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมในทานตะวัน

Abstract

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity and genetic relationships among 24 sunflower genotypes using two different DNA-based markers, random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Simple sequence repeats (SSRs). Thirteen inbred lines, 8 synthetic and 3 hybrid varieties were assessed with 14 RAPD and 16 SSR markers. The results found that, among the set of 24 genotypes, the calculated PIC value for RAPD (0.02-0.74 with average 0.40) was lower than SSR (0.46-0.81 with average 0.64). This indicates that SSR markers have a higher polymorphic capability than RAPD markers. In addition, SSR markers had higher genetic similarity range (average 0.31) compared with RAPD markers (average 0.22), suggesting that SSR markers had lower genetic variation among 24 sunflower genotypes than that RAPD markers. The dendrograms using the UPGMA algorithm based on both marker systems divided tested sunflower genotypes into two main groups completely. The dendrogram based on SSR markers appears conserved with their relative history data. The clusters from both markers system clearly showed that the commercial hybrid varieties and sunflower accessions from abroad were completely distinguished from the inbred lines and synthetic varieties developed by SUT. The results of PCoA, indicating the genetic relationships among the inbred lines, corresponded to those obtained through UPGMA cluster analysis. The results obtained with RAPD and SSR markers were consistent in this study, estimated by the high positive Pearson's correlation (r = 0.85) between the similarity matrices. The high correlation indicated that clusters produced based on the two marker systems were conserved. The genetic diversity and relationships data among inbred lines and varieties may be useful for germplasm conservation and inbred line identification, as well as for the selection of parental lines for sunflower hybrid breeding.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
สถานที่ทำการวิจัย	3
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	
ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน	4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน	4
คุณค่าทางอาหารและการนำไปใช้ประโยชน์	5
การปลูกทานตะวันในประเทศไทย	7
การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทย	7
เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)	8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)	9
เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR, Simple Sequence Repeat)	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
สายพันธุ์ทานตะวันและการเตรียมตัวอย่าง	13
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช	15
การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ	15
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์	16
การตรวจสอบผลิตพีซีอาร์โดยเจลอิเล็กโทโฟรีซิส	18
การวิเคราะห์ผลการศึกษา	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ	24
RAPD marker analysis	26
SSR marker analysis	35
เปรียบเทียบเครื่องหมาย RAPD และ SSR ในการประเมินความ polymorphism ในทานตะวัน	45
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	51
ประวัติผู้วิจัย	56

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

2.1 องค์ประกอบของน้ำมันทานตะวัน 6

3.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการศึกษา, เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และการจัดกลุ่ม 14

3.2 ไพรเมอร์ชนิดอาร์เอพีดีทั้ง 14 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง 17

3.3 ส่วนประกอบของการเตรียมปฏิกิริยา PCR 18

3.4 จำนวนรอบและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 18

3.5 ลำดับดีเอ็นเอไพรเมอร์และจำนวนอัลลีลของเครื่องหมาย SSR 21

3.6 ส่วนประกอบของการเตรียมปฏิกิริยา PCR-SSR 23

4.1 คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์ 25

4.2 ไพรเมอร์อาร์เอพีดี ลำดับเบส จำนวนอัลลีล ขนาดของแถบดีเอ็นเอ polymorphic bands และ monomorphic bands และค่า PIC 27

4.3 Jaccard's coefficient similarity matrix ในการใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดีในทานตะวัน 24 สายพันธุ์ 33

4.4 ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ ลำดับเบส, จำนวนอัลลีล, ขนาดของแถบดีเอ็นเอ, polymorphic และ monomorphic bands และค่า polymorphic information content (PIC) 41

4.5 Jaccard's coefficient similarity matrix โดยใช้เครื่องหมาย SSR 43

4.6 เปรียบเทียบเครื่องหมาย RAPD และ SSR ในการประเมินความ polymorphism ในทานตะวัน 47

4.7 ความสัมพันธ์ RAPD และ SSR correlation โดย Pearson correlations 48

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

	หน้า
2.1 ลักษณะของพืชวงศ์ Asteraceae และองค์ประกอบของดอก	6
2.2 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพืช A และ พืช B ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	10
2.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชนิดพืชโดยการใช้เครื่องหมาย SSR	12
3.1 ต้นกล้าทานตะวันอายุ 1 สัปดาห์ (a) และ 2 สัปดาห์ (b)	13
4.1 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของทานตะวันจำนวน 24 ตัวอย่าง	24
4.2 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S5	28
4.3 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S10	28
4.4 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S23	28
4.5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S29	29
4.6 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF4	29
4.7 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF10	29
4.8 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF13	30
4.9 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF19	30
4.10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPJ20	30
4.11 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX1	31
4.12 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX2	31
4.13 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX12	31
4.14 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX13	32
4.15 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX14	32

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

4.16 Dendrogram ของทานตะวันจำนวน 24 สายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis และ Jaccard's similarity coefficients ที่ได้จากเครื่องหมาย RAPD 34
4.17 Principal coordinates analysis (PCoA) โดย RAPD markers 35
4.18 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS160 37
4.19 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS371 37
4.20 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ha4149 37
4.21 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS331 38
4.22 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS488 38
4.23 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS598 38
4.24 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS822 39
4.25 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS878 39
4.26 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS899 39
4.27 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS920 40
4.28 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS988 40
4.29 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS1088 40
4.30 Dendrogram ของทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis และ Jaccard's similarity coefficients โดยใช้เครื่องหมาย SSR 44
4.31 Principal Coordinates Analysis (PCoA) โดยเครื่องหมาย SSR 45
4.32 พล็อตการกระจายแสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง genetic similarity coefficients 49

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันอันดับ 4 ที่มีความสำคัญในตลาดโลก เมล็ดทานตะวัน ให้น้ำมันที่มีคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำพวกกรดโอเลอิก ลิโนเลนิค และอราชิโนอิก อยู่ประมาณ 60-70% นอกจากจะมีการนำทานตะวันมาใช้เพื่อการบริโภคโดยตรง ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม เช่น ทำเนยเทียม สี น้ำมันชักเงา สบู่ เครื่องสำอาง ยา น้ำมันหล่อลื่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทำเชื้อเพลิง ทำกระดาษ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งท่องเที่ยวเพิ่มรายได้ให้กับประเทศ ประเทศไทยได้มีการปลูกทานตะวันไม่น้อยกว่า 200,000 ไร่ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศ จึงทำให้เสียรายได้จากการนำเข้า ทั้งการสั่งซื้อน้ำมันและเมล็ดพันธุ์ทานตะวันจากต่างประเทศปีละไม่น้อยกว่า 500 ล้านบาท (สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

เพื่อลดการนำเข้าพันธุ์ทานตะวันลูกผสมจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง นักวิจัยไทยได้ผลิตพันธุ์สังเคราะห์เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้เมล็ดพันธุ์มีราคาถูก และเหมาะสมกับสภาพการปลูกทานตะวันในประเทศไทย ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ (2546; 2548; 2550) ได้พัฒนาพันธุ์สังเคราะห์และคัดเลือกพันธุ์ที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีปริมาณน้ำมันต่างกันตั้งแต่ 21.42% -42.81 % จำนวน 30 สายพันธุ์ ทำการผสมตัวเองหลายชั่วรุ่นและคัดเลือกสายพันธุ์แท้ที่มีน้ำมันสูงจำนวน 12 สายพันธุ์ เนื่องจากทานตะวันเป็นพืชที่มีความสำคัญในการผลิตน้ำมันในประเทศไทย แต่ผลผลิตยังต่ำ ต่อมา ได้ทำการผลิตพันธุ์สังเคราะห์โดยการผสมเปิดของพันธุ์ที่มีน้ำมันสูง ผลิตเมล็ดพันธุ์สังเคราะห์ ได้แก่ สุรนารี 473 (S473) โดยมีคุณสมบัติเด่น เช่น ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้ง เปอร์เซ็นน้ำมันสูง และสามารถเก็บเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ในการปลูกครั้งต่อไปได้ จึงช่วยให้เกษตรกรสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อเมล็ดพันธุ์เพื่อการเพาะปลูกในครั้งต่อไป และยังพบว่าอัตราผลผลิตอยู่ที่ประมาณ 180 – 300 กิโลกรัมต่อไร่ เปอร์เซ็นต์น้ำมันอยู่ที่ 39 – 41 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนับว่าเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงเทียบเท่ากับพันธุ์ลูกผสมในท้องตลาด โดยเมล็ดพันธุ์ดอกทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 ยังได้รับความสนใจจากบริษัทผู้ผลิตน้ำมันดอกทานตะวันในไต้หวัน

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการบ่งชี้ความแตกต่างหรือความหลากหลาย (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นลักษณะทางด้านปริมาณ (quantitative traits) หรือลักษณะทางด้านคุณภาพ (qualitative traits) เครื่องหมายดีเอ็นเอนับได้ว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าระหว่างหรือภายในชนิด (species) ประชากร (populations) พันธุ์ (varieties) และสายพันธุ์ (breeding lines) ได้อย่างถูกต้อง

และแม่นยำกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างหรือสัณฐานของพืช (morphological marker) ที่มักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม หรือ เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) ที่การตรวจสอบขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีนลักษณะเด่น (วิชัย บุญแสง, 2541; สุรีพร เขตงาม, 2546)

เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิดได้นำมาใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ถั่วเหลืองและพืชอีกจำนวนมาก รวมทั้งทานตะวัน โดยการใช้เทคนิค RFLP, RAPD, AFLP รวมทั้ง SSR เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชนิดพันธุ์ สายพันธุ์ ระบุจีโนไทป์ (Berry et al., 1994) จำแนกกลุ่มเฮทเทอโรซิส (Cheres and Knapp, 1998) และศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Solodenko and Sivolap, 2005)

ในส่วนของโครงการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นในการนำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอได้แก่เครื่องหมาย SSR และ RAPD มาช่วยในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้และสายพันธุ์สังเคราะห์ที่พัฒนาโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อพัฒนาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ไว้ในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืชและเพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้และสายพันธุ์สังเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดเอสเอสอาร์ (SSR)

2.เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้และสายพันธุ์สังเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดอาร์เอพีดี (RAPD)

3.เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ทานตะวันและแยกกลุ่มสายพันธุ์ทานตะวันที่พัฒนาโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อประโยชน์ในการจดสิทธิบัตรรับรองพันธุ์พืชและโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้การวิจัยต่อไป กลุ่มเป้าหมาย: สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยต่างๆ

2. บริการความรู้แก่ประชาชน กลุ่มเป้าหมาย: เกษตรชุมชน องค์การบริหารส่วนตำบล

3. เป็นประโยชน์ต่อประชาชนกลุ่มเป้าหมาย กลุ่มเป้าหมาย: เกษตรกร

4. อื่นๆ (ระบุ) ลดการนำเข้าเมล็ดและน้ำมันทานตะวันจากต่างประเทศ กลุ่มเป้าหมาย: ธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและใช้น้ำมัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอบเขตของโครงการวิจัย

รวบรวมเมล็ดทานตะวันสายพันธุ์แท้ สายพันธุ์สังเคราะห์ และ สายพันธุ์ลูกผสมที่มีในประเทศไทย ปลูกทานตะวันในระยะต้นอ่อน นำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์และอาร์เอพีดี และ วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ทานตะวัน สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและจำแนกพันธุกรรม

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีววิทยา สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน

ทานตะวัน (sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* L.ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ตอนใต้ของทวีปอเมริกาเหนือ และเม็กซิโก รัสเซียเป็นประเทศแรกที่เริ่มพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1800 จนในปี ค.ศ. 1830-1840 สามารถผลิตน้ำมันทานตะวันเพื่อการค้าและกลายเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก ทั้งด้านการบริโภคเมล็ดโดยตรง และการบริโภคน้ำมันจากเมล็ด ปัจจุบันมีแหล่งปลูกที่สำคัญคือ ประเทศรัสเซีย อินเดีย สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส อาร์เจนตินา โรมาเนีย และออสเตรเลีย (เสาวรี ตังสกุล และคณะ, 2544; จิราพร แซ่ต่าง, 2553)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน

พืชในสกุล *Helianthus* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 34 มีทั้งเป็นพืชฤดูเดียวและข้ามปีรวมกันประมาณ 68 ชนิด (species) แต่มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ใช้ปลูกเป็นอาหารคือ แก่นตะวัน (*H. tuberoses*) เป็นพวกข้ามปีใช้ประโยชน์จากหัวซึ่งสะสมอาหารในรูปแป้งในส่วนรากและทานตะวัน (*H. annuus*) เป็นพืชฤดูเดียวมีทั้งชนิดบริโภคเมล็ดและชนิดสกัดน้ำมัน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปของทานตะวันมีดังนี้

ราก เป็นระบบรากแก้วหยั่งลึกลงไปประมาณ 150-270 เซนติเมตร มีรากแขนงค่อนข้างแข็งแรงแผ่ขยายไปด้านข้างได้ยาวถึง 60-150 เซนติเมตรเพื่อช่วยค้ำจุนลำต้นได้ดีและสามารถใช้ความชื้นระดับผิวดินได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงทำให้ทานตะวันเป็นพืชที่ทนทานต่อความแห้งแล้ง

ลำต้น ทานตะวันมีลำต้นตั้งตรงเป็นไม้เนื้ออ่อนมีขนอ่อนปกคลุมอยู่ทั่วไป ลำต้นส่วนใหญ่ไม่มีการแตกแขนงแต่บางพันธุ์มีการแตกแขนงขนาดของลำต้นความสูง การแตกแขนงขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อมความสูงของต้นอยู่ระหว่าง 50-500 เซนติเมตร ความสูงขึ้นอยู่กับจำนวนปล้องและความยาวของปล้อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-10 เซนติเมตร

ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้ามหลังจากที่มีใบเกิดแบบตรงกันข้ามอยู่ 5 คู่แล้วใบที่เกิด หลังจากนั้นจะมีลักษณะวนมีขนหยาบปกคลุมทั่วไปจำนวนใบบนต้นอาจมีตั้งแต่ 8-70 ใบรูปร่างของใบแตกต่างกันตามพันธุ์สีของใบอาจมีตั้งแต่เขียวอ่อนเขียวและเขียวเข้มใบที่เกิดออกมาจากตายอดใหม่ๆ ก้านใบจะอยู่ในแนวตั้งจนกระทั่งใบมีความยาว 1 เซนติเมตร ปลายยอดจะค่อยๆ โค้งลงจนเมื่อใบแก่แล้วก็จะโค้งลงมาเป็นรูปตัวยู (U) การสร้างใบจะมีมากจนกระทั่งดอกบานหลังจากนั้นการสร้างใบจะลดน้อยลง

ดอก เป็นดอกรวม แต่ละจานดอก (inflorescence หรือ capitulum หรือ head) ประกอบด้วยดอกย่อย (florets) 700-3,000 ดอกสำหรับพันธุ์น้ำมันหรืออาจมีจำนวนถึง 8,000 ดอกสำหรับพันธุ์ที่ไม่ใช่

เป็นพันธุ์น้ำมันมีเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกอยู่ระหว่าง 6-37 เซนติเมตร ซึ่งขึ้นกับพันธุ์และสภาพแวดล้อมใน แต่ละจานดอกมีดอก 2 ประเภท คือ ray flowers และ disk flowers (ภาพที่ 2.1)

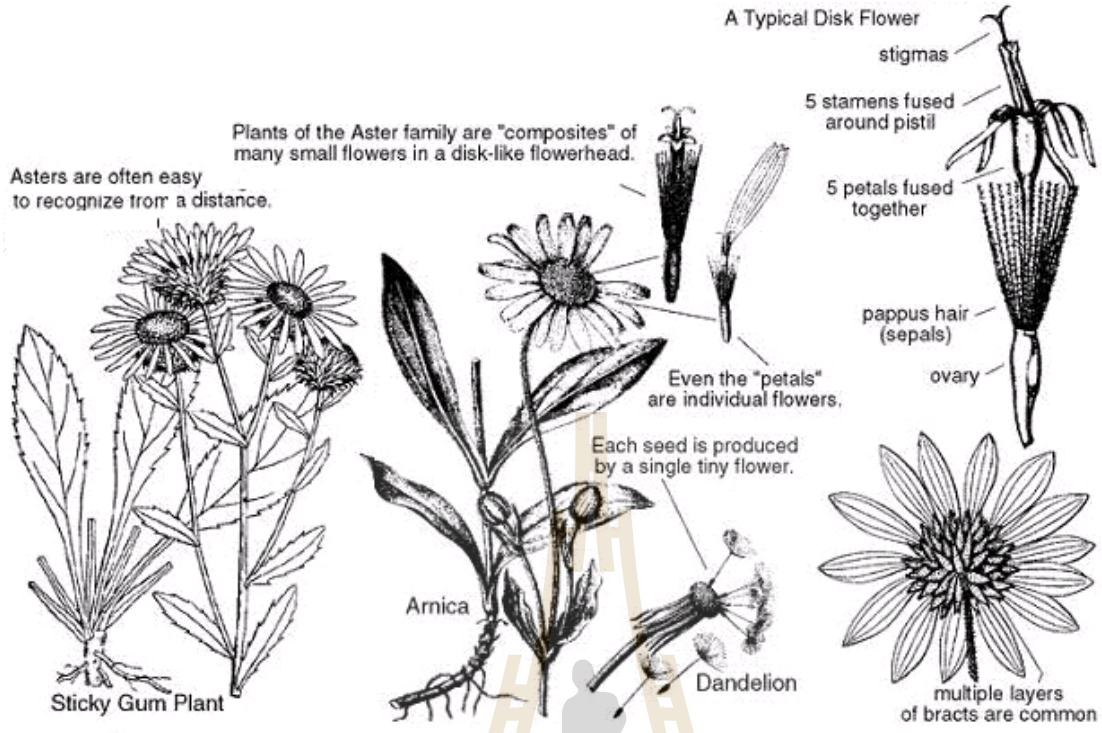
Ray flowers เรียงอยู่บริเวณรอบนอกสุดของจานดอกมีจำนวน 2 แถว เป็นดอกที่เป็นหมันมีสีต่างๆกันตั้งแต่สีเหลืองสีส้มและสีแดง

Disk flowers มีจำนวน 30-50 แถวมีการเรียงตัวของแถวเป็นแบบ concentric rows แต่ละดอกประกอบด้วยกลีบรองดอก (pappus/calyx) 2 อัน กลีบดอก (corolla petals) 5 อันที่เชื่อมติดกันอับเกสร (anthers) 5 อัน เกสรตัวเมีย (stigma) 1 อันเกสรตัวเมียนี้จะยาวกว่าเกสรตัวผู้เมื่อดอกบานเต็มที่และจะแยกเป็น2 แฉกตรงปลายและโค้งลง

เมล็ด เป็นแบบ achene ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อของเมล็ดเรียกว่า kernel และส่วนที่เป็นเปลือกเรียกว่า pericarp เมล็ดมีความยาวตั้งแต่ 7-25 มิลลิเมตร กว้าง 4-13 มิลลิเมตร มีน้ำหนักผันแปรตั้งแต่ 40-60 กรัมต่อ 1000 เมล็ด รูปร่างลักษณะของเมล็ดอาจเป็นเหลี่ยมหรือรูปไข่สีของเมล็ดมีทั้งเป็นแบบแถบขาวสลับดำหรือเทาหรือสีดำล้วนๆ ขนาดของเมล็ดส่วนที่อยู่ใกล้กับขอบของจานดอกจะใหญ่กว่าเมล็ดที่อยู่กลางของจานดอกและขนาดของเมล็ดที่เล็กที่สุดจะอยู่ตรงกลางจานดอกส่วนเมล็ดที่อยู่ตรงใจกลางของจานดอกมักจะลีบเสมอ

3. คุณค่าทางอาหารและการนำไปใช้ประโยชน์

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่นิยมปลูกเป็นอันดับที่สี่จากทั่วโลก รองลงมาจากปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง และเรปซีด (Stefansson, 2007) เนื่องจากเมล็ดและน้ำมันทานตะวันประกอบด้วยแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) เหล็ก (Fe) แมกนีเซียม (Mg) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) และมีวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินบี 1 บี 2 วิตามินซี วิตามินอี และวิตามินเค โดยเฉพาะวิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยไม่ให้มีกลิ่นหืน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารในกลุ่มโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบของไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fat) ได้แก่ กรดไขมันโอเลอิก (oleic) กรดไขมัน (linolenic) และกรดไขมันอราชิโนอิก (arachinoic) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และช่วยลดโคเลสเตอรอล (cholestero) ได้ (สุพจน์ แสงประทุม, 2543; National Sunflower Association, 2011) ดังนั้นเมล็ดทานตะวันและน้ำมันทานตะวันจึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเพื่อการบริโภคและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เนยเทียม เครื่องสำอาง สบู่ น้ำมันชักเงา ไบโอดีเซล น้ำมันหล่อลื่น สีทาบ้าน เป็นต้น ส่วนกากทานตะวันหลังจากสกัดน้ำมันแล้วยังมีปริมาณโปรตีนสูง สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้อีกด้วย (ไพจิตร จันทรวงค์, 2538)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของพืชวงศ์ Asteraceae และองค์ประกอบของดอก (United States Department of Agriculture, 2013)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของน้ำมันทานตะวัน (National sunflower association, 2011).

คุณค่าทางอาหาร ต่อ 100 กรัม	**น้ำมันทานตะวัน**		
	โอเลอิกสูงมากกว่า 70%	**โอเลอิกปานกลาง**	**โอเลอิกต่ำ**
พลังงาน	884 กิโลแคลอรี่	884 กิโลแคลอรี่	884 กิโลแคลอรี่
คาร์โบไฮเดรต	0 กรัม	0 กรัม	0 กรัม
ไขมัน	100 กรัม	100 กรัม	100 กรัม
ไขมันอิ่มตัว	9.748 กรัม	10.3 กรัม	9.009 กรัม
ไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว	83.594 กรัม	19.5 กรัม	57.344 กรัม
ไขมันไม่อิ่มตัวพันธะคู่	3.798 กรัม	65.7 กรัม	28.962 กรัม
วิตามิน อี	41.08 มิลลิกรัม	41.08 มิลลิกรัม	41.08 มิลลิกรัม
วิตามิน เค	5.4 ไมโครกรัม	5.4 ไมโครกรัม	5.4 ไมโครกรัม

4. การปลูกทานตะวันในประเทศไทย

ทานตะวันจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยมีพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากทานตะวันเป็นพืชที่ทนแล้ง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (Laosuwan, 1997) ปี 2549 ประเทศไทยมีพื้นที่ในการปลูกทานตะวันประมาณ 208,000 ไร่ ผลผลิตประมาณ 24,000 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ซึ่งมีแนวโน้มลดลงจากปีก่อนหน้า ทำให้มีการนำเข้าน้ำมันทานตะวันอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี 2543-2546 โดยนำเข้ามากถึง 18,720 ตัน ในปี 2548 ซึ่งคิดเป็นมูลค่า 600 ล้านบาท นอกจากนั้นเมล็ดพันธุ์ทีเกษตรกรใช้ปลูกเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ โดยมีปริมาณการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ 4,000 ตัน/ปี คิดเป็นมูลค่าปีละประมาณ 80-130 ล้านบาท เฉพาะปี 2552 นำเข้าเมล็ดพันธุ์ 4,200 ตัน คิดเป็นมูลค่า 139 ล้านบาท และปี 2554 นำเข้าเมล็ดพันธุ์ 11,093 ตัน คิดเป็นมูลค่า 550 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ทั้งนี้เกิดจากการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ และเมล็ดพันธุ์มีราคาแพง เนื่องจากเมล็ดทานตะวันที่เกษตรกรใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้เกษตรกรต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ในราคาแพงกิโลกรัมละ 360 บาท และเพิ่มสูงขึ้นถึงกิโลกรัมละ 425 บาท ในปี 2556 (บริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์ ประเทศไทย, 2556)

แหล่งปลูกที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดลพบุรี สระบุรี เพชรบูรณ์ และบางจังหวัดในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่เป็นลูกผสมจากต่างประเทศ ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์ขึ้นในประเทศหลายสายพันธุ์ เช่น เชียงใหม่1 สุรนารี471 และสุรนารี473 เป็นต้น ซึ่งพันธุ์เหล่านี้กำลังได้รับการส่งเสริม และเผยแพร่สู่เกษตรกร อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการปลูกทานตะวันในประเทศไทยคือ มีผลผลิตต่ำ ไม่ต้านทานโรค และมีการหักล้มสูง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550)

5. การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทย

ส่วนใหญ่การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันมักมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิต และเปอร์เซ็นต์น้ำมัน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ (1) การนำพืชมาจากแหล่งอื่นซึ่งอาจมาจากภายในหรือต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นพันธุ์ปลูกทันที หรืออาจใช้เป็นแหล่งของยีนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทยเริ่มต้นด้วยการปลูกทดสอบระหว่างพันธุ์ท้องถิ่นและพันธุ์ผสมเปิดที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อศึกษาลักษณะต่างๆของทานตะวันและการให้ผลผลิต จนกระทั่งได้พันธุ์ Saratroskij ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ พบว่ามีการเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดี ให้ผลผลิต 200-300 กก./ไร่ แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำคือ 27.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่อมาใช้เป็นพันธุ์ส่งเสริมชื่อว่า สว.1 (2) การคัดเลือกพันธุ์ โดยนำพันธุ์ท้องถิ่นหรือพันธุ์จากแหล่งอื่นมาปลูกทดสอบและเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ แล้วคัดเลือกใช้เป็นพันธุ์ปลูก เช่น การพัฒนาพันธุ์ทานตะวันขึ้นใช้เองโดยกรมวิชาการเกษตร โดยคัดเลือก

และสกัดสายพันธุ์แท้จากพันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่น ได้สายพันธุ์แท้ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4 - lines) จำนวน 62 สายพันธุ์ และหลังจากทดสอบความสามารถในการรวมตัว (combining ability) พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่มีลักษณะการรวมตัวจำเพาะสูง จึงนำมาสร้างพันธุ์ทานตะวัน ได้ทานตะวันพันธุ์ผสมรวม (composite varieties) 9 พันธุ์ และพันธุ์สังเคราะห์ 1 พันธุ์ จากการเปรียบเทียบลักษณะต่างๆและผลผลิต พบว่า พันธุ์สังเคราะห์ (พันสังเคราะห์ #1) ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำกว่าพันธุ์ลูกผสม ซึ่งต่อมาได้รับรองพันธุ์และให้ชื่อว่า พันธุ์เชียงใหม่ 1 (3) การผสมพันธุ์ เป็นการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ ที่มีสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca) เพื่อผลิตพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) ซึ่งทำได้โดยนำสายพันธุ์ต่างๆมาปลูกรวมกัน หรือผสมกันให้ครบทุกพันธุ์ และการผลิตพันธุ์ลูกผสม (hybrid) ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์จำนวนน้อยเพียง 2-4 สายพันธุ์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2547)

นอกจากนี้มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ทำการวิจัยโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน เพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ โดยใช้สายพันธุ์ที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 12 สายพันธุ์มาแยกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ปานกลาง และต่ำ แล้วผลิตพันธุ์สังเคราะห์ภายในแต่ละกลุ่ม จนกระทั่งได้พันธุ์สังเคราะห์ที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คือ ทานตะวันพันธุ์ สุรนารี 471 และ สุรนารี 473 ซึ่งให้ผลผลิต 335 และ 314 กก./ไร่ และมีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน 39.08 และ 37.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม (แปซิฟิก 33) (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2548) และโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มศักยภาพของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์และสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง (จุฑามาศ เพียซ้าย และไพศาล เหล่าสุวรณ, 2544)

6. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)

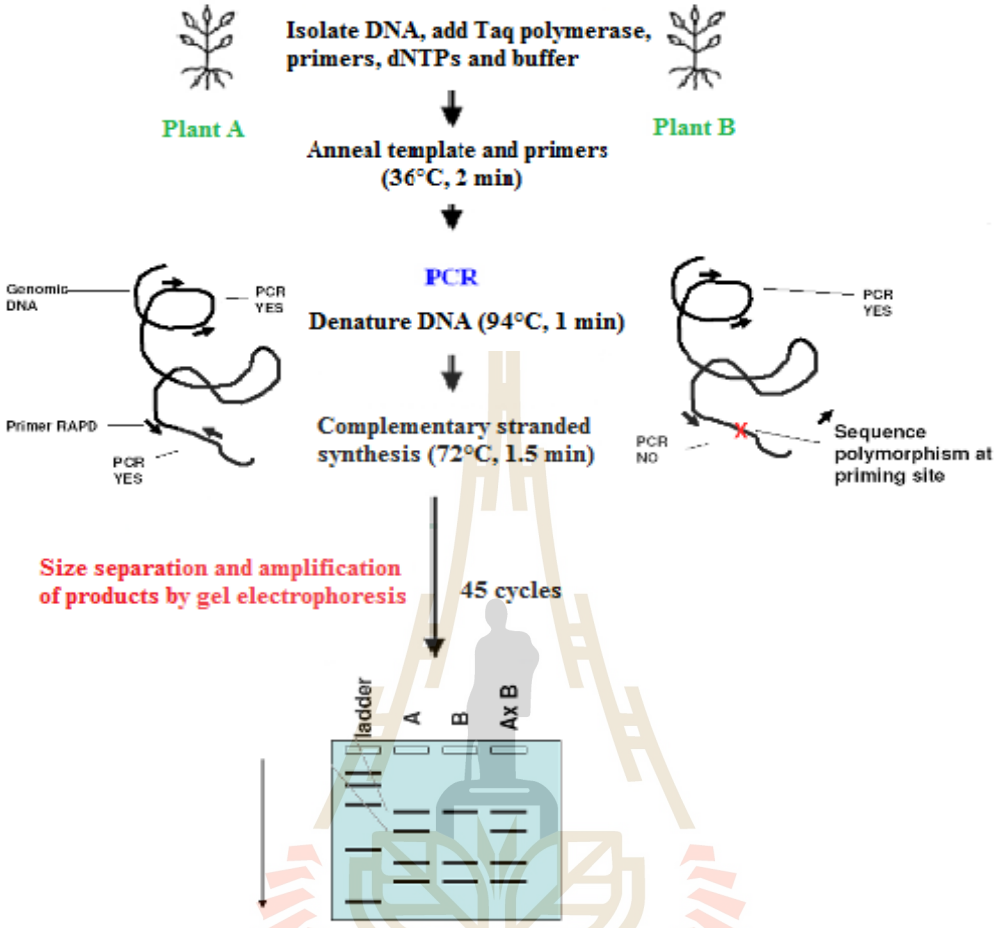
เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี่เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ สามารถนำมาตรวจสอบ

ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุรีพร เกตุงาม, 2546)

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ต้องตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) เช่น restriction fragment length polymorphisms (RFLP) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ได้แก่ เครื่องหมาย RAPD, amplified fragment length polymorphisms (AFLP) และ microsattelite (สุรีพร เกตุงาม, 2546) ซึ่งเครื่องหมายที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นเครื่องหมายที่อาศัยหลักการของพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องเลือกใช้เครื่องหมายให้เหมาะสมกับการทดลอง ซึ่งเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ เครื่องหมาย RAPD เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย และความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดีมักเกิดในลักษณะมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เครื่องหมายอาร์เอพีดีจึงถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

7. เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)

อาร์เอพีดี เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสขนาดสั้น 8-12 เบส อาร์เอพีดีพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า พีซีอาร์ (PCR) (Welsh และ McClean, 1990; William et al., 1990) พืชแต่ละชนิดจะมี การจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม หรือ “arbitrary primer” (ซึ่งหมายถึงส่วนรหัสเริ่มต้นของดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบส) หากอาร์เอพีดีไพร์เมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นใช้ arbitrary primer ดังนั้นไพร์เมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง เมื่อการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ ดังนั้นถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือเป็นคนละชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกัน ทำให้ได้จำนวนและชิ้นของ ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ (cultivar identification) ได้ (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพืช A และ พืช B ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (ดัดแปลงจาก สุรีพร เกตุงาม, 2546)

เนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ อาร์เอพีดีถูกนำมาใช้เพื่อจำแนกและติดตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชและสัตว์หลายชนิด (Bharathiraja et al., 2008) ถึงแม้ว่าอาร์เอพีดีจะมีข้อเสียเรื่องการทำซ้ำ แต่งานวิจัยของ Rajput et al. (2006) ได้แสดงให้เห็นว่าประมาณ 80% ของการทำซ้ำด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจะให้ผลเหมือนเดิม โดยงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 60 ชนิด ในมะเขือเทศป่า (*Lycopersicon hirsutum*) นอกจากนี้เทคนิคอาร์เอพีดียังถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดด้วย เช่น ใน *Verbesina helianthoides* (Encheva et al., 2005) ไม้ไผ่ (Ramanayake et al. 2007) และ,ลูกใต้ใบ (Theerakulpisut et al., 2008)

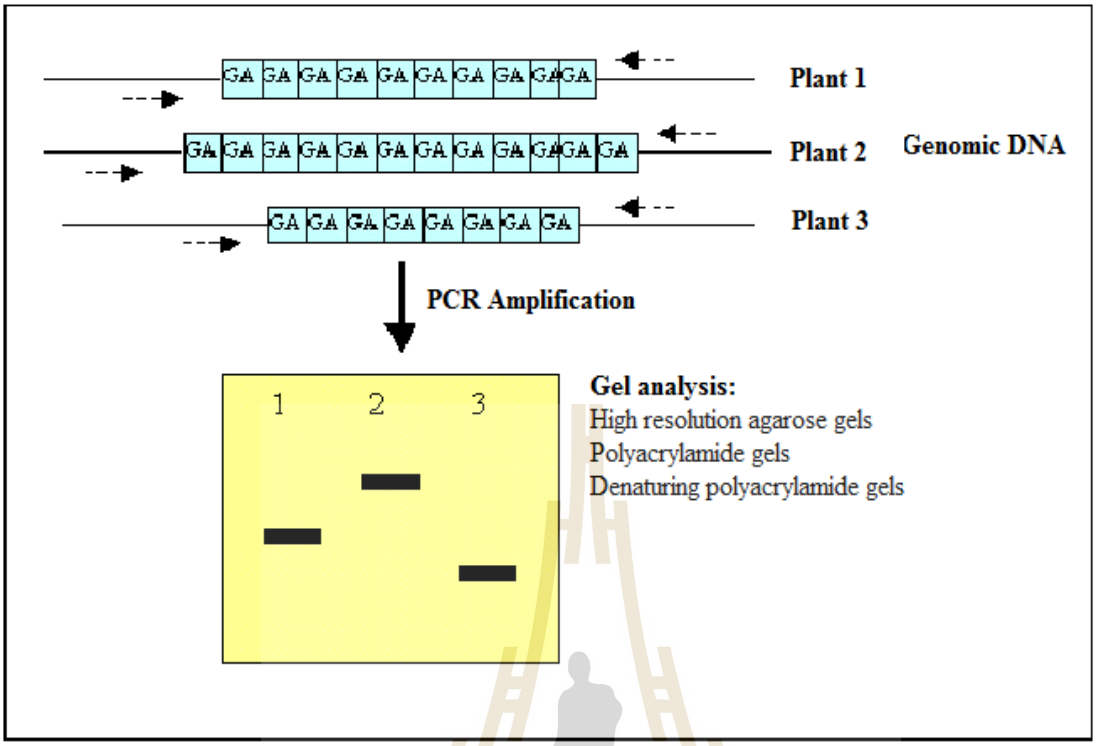
เครื่องหมายอาร์เอพีดีจึงถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิดรวมถึงทานตะวันด้วย ยกตัวอย่างเช่น

Popov et al. (2002) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไอโซไซม์ ศึกษาพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์ลูกผสมในทานตะวัน 30 สายพันธุ์ พบว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีมีประสิทธิภาพดีในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของลูกผสมได้ Issaacs et al. (2003) ศึกษาพันธุกรรมของทานตะวัน 16 สายพันธุ์ ลูกผสมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ในประเทศอินเดีย พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 164ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความคล้าย 69.51% หากมีการผสมระหว่างสายพันธุ์ทานตะวันที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากนี้จะมีความเป็น heterosis สูง นอกจากนี้แล้ว Iqbal et al. (2008) ใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ 20 ชนิด เพื่อจำนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของทานตะวัน 8 สายพันธุ์ในประเทศปากีสถาน พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 156ชิ้น เฉลี่ย 7.8 แถบต่อไพรเมอร์ มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายระหว่าง 51.59%- 77.78% ซึ่งการมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธ์เหล่านี้มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์

8. **เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR)**

เครื่องหมายโมเลกุล SSR หรือ microsatellite เป็นลำดับดีเอ็เอที่มีจำนวนลำดับเบสซ้ำเป็น 2, 3, 4 หรือ 5 นิวคลีโอไทด์ เช่น CACACACACACACA.., CARCATCATCATCAT.., ACGTACGTACGT... หรือ TAAAATAAAATAAAA... และลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนม โดยรูปแบบความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ที่เกิดจากการจับกันอย่างจำเพาะของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสั้นๆที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ โดยผ่านทำพีซีอาร์และแยกความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ได้บนเจลอะกาโรสหรือโพลีอคิลาไมด์ ซึ่งจำนวนซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์จะผันแปรไปตามแต่ละจีโนไทป์ โดยเครื่องหมายโมเลกุล SSR สามารถแยกความแตกต่างได้สูง และสามารถแสดงลักษณะการข่มร่วมกัน(codominant) ได้ดังภาพที่ 2.3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชนิดพืชโดยการใช้เครื่องหมาย SSR (Kate-ngam, 2003).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์ทานตะวันและการเตรียมตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างทานตะวันจำนวน 24 สายพันธุ์โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามเปอร์เซ็นต์น้ำมันออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ ตามตารางที่ 3.1 เตรียมเพาะเมล็ดตัวอย่างโดยนำเมล็ดมาแช่น้ำและเพาะให้งอกในถาดดิน เมื่อครบสองสัปดาห์ เลือกเก็บใบทานตะวันที่เป็นใบอ่อนอายุประมาณ 2 สัปดาห์ นำมาล้างทำความสะอาดโดย การเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% และตัดช่างน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม แช่ลงในไนโตรเจนเหลว เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน (ภาพที่ 3.1)

ภาพที่ 3.1 ต้นกล้าทานตะวันอายุ 1 สัปดาห์ (a) และ 2 สัปดาห์ (b)

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการศึกษา เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และการจัดกลุ่ม

Sunflower line/variety	Name	Origin	Oil content (%)
Inbred line	1A	SUT	37.25[1]
	2A	SUT	36.26[1]
	3A	SUT	35.72[1]
	4A	SUT	35.99[1]
	5A	SUT	39.02[1]
	6A	SUT	37.39[1]
	7A	SUT	39.43[1]
	8A	SUT	36.86[1]
	9A	SUT	38.34[1]
	10A	SUT	41.40[1]
	11A	SUT	40.73[1]
	12A	SUT	42.81[1]
	HA429	USDA	35.36[3]
Synthetic variety	Suranaree 471 (S471)	SUT	41.33[2]
	Suranaree 473 (S473)	SUT	39.46[2]
	Suranaree 475 (S475)	SUT	nd
	High Oil Cross (HOC)	SUT	42.80[1]
	Medium Oil Cross (MOC)	SUT	37.12[1]
	Medium Oil Open (MOO)	SUT	37.58[1]
	Low Oil Open (LOO)	SUT	37.88[1]
	Chiang Mai 1	Department of Agriculture	33.86[1]
Hybrid variety	Prado Red	USDA	nd
	Pacific 33	Pacific Seeds (Thai) Ltd.	39.00[5]
	Pacific 77	Pacific Seeds (Thai) Ltd.	44.00[4]

Note: Oil content described by [1]Laosuwan (2000); [2]Laosuwan (2005); [3]Laura (2011);
[4]Pacific Seeds (Thai) (2013); [5] Department of Agriculture (2009); nd = no data

***** การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร วิเคราะห์โดยรวมเปลือกและ kernel (กิตติ สัจจาวัฒนา, 2548)

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทานตะวันที่เตรียมไว้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

(1) บดใบทานตะวันที่หั่นเป็นชิ้นแล้ว 100 mg ด้วยไนโตรเจนเหลวย้ายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

(2) เติม buffer AP1 400 ไมโครลิตรและ 100mg/ml RNaseA 4 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน

(3) นำไปบ่มที่ 65°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 10นาที พร้อมกลับหลอดไปมาทุก 3 นาที

(4) เติม buffer AP2 130 ไมโครลิตรบ่มบนในน้ำแข็งเป็นเวลา5 นาที

(5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(6) ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอด QIAshredder Mini Spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(7) ย้ายส่วน flow-through ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม 1.5 volumesของ buffer AP3/Eผสมให้เข้ากัน

(8) ย้ายส่วนผสมจากข้อ (7) 650 ไมโครลิตรใส่หลอด DNeasy Mini Spin column

(9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(10) นำ DNeasy Mini Spin column ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer AW 150 ไมโครลิตร

(11) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(12) นำ DNeasy Mini Spin column ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer AE 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

(13) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(14) ทำซ้ำข้อ 12 และ 13 แล้วเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

3. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

3.1 การวัดคุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Gel electrophoresis)

การวัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยเตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 1 %

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(1) ชั่งอะกาโรส 1 กรัมใน 0.5x TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปละลายโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้เตาไมโครเวฟเขย่าเป็นครั้งคราวจนกระทั่งผงอะกาโรสหลอมละลายจนหมดตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส

(2) เทอะกาโรสที่หลอมละลายลงในถาดเจลที่เสียบหวี (comb) ลงไปตรงตำแหน่งที่ทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตรแล้วปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

(3) ย้ายเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเลคโทรโฟรีซิสโดยให้ด้านที่มีช่องหวีอยู่ด้านขั้วลบแล้วเท 0.5x TAE buffer ลงจนท่วมเจลโดยให้สูงกว่าผิวเจล 3 มิลลิเมตร

(4) ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างกับ loading buffer ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 หยอดตัวอย่างลงในช่องหวีด้วยไมโครปิเปตพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

(5) ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที

(6) นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นาน 10 นาทีจากนั้นล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกโดยน้ำประมาณ 10 นาที

(7) นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV light transillumination Fluor-S^{TM} Multilmager

3.2 ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer จากการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่ A_{260} 1 หน่วยจะเท่ากับ 50 ไมโครกรัม ของดีเอ็นเอสายคู่ ต่อ 1 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

4.1 PCR-RAPD คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นอำนวน 14 ไพรเมอร์จากรายงานวิจัยโดย Tang et al. (2006) และ Darvishzadeh et al. (2010) ตามตารางที่ 3.2 สำหรับ PCR-RAPD โดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในส่วนผสมสำหรับพีซีอาร์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้ PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP, ไพรเมอร์, *Taq* polymerase และ DNA template ตามอัตราส่วนในตารางที่ 3.3 และจำนวนรอบของอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามตารางที่ 3.4

4.2 PCR-SSR คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นอำนวน 16 ไพรเมอร์จากรายงานวิจัยโดย Tang et al. (2002) และ Darvishzadeh et al. (2010) ตามตารางที่ 3.5 สำหรับ SSR โดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในส่วนผสมสำหรับพีซีอาร์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้ PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP, ไพรเมอร์, *Taq* polymerase และ DNA template ตามอัตราส่วนในตารางที่ 3.6 และจำนวนรอบของอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 14 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง

Primer	Sequence 5' - 3'
S5	TGCGCCCTTC
S10	CTGCTGGGAC
S23	AGTCAGCCAC
S29	GGGTAACGCC
OPF4	GGTGATCAGG
OPF10	GGAAGCTTGG
OPF13	GGCTGCAGAA
OPF19	CCTCTAGACC
OPJ20	AAGCGGCCTC
OPX1	CTGGGCACGA
OPX2	TTCCGCCACC
OPX12	TCGCCAGCCA
OPX13	ACGGGAGCAA
OPX14	ACAGGTGCTG

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอพีดี

Content	Stock	Final concentration	Volume for 1 tube
TopTaq master mix	2x	1x	12.5 µl
Primer	100 µM	0.2 µM	0.8 µl
DNA template	10 ng/µl	10 ng/µl	3 µl
de-ionized water			8.7 µl
Total			25 µl

ตารางที่ 3.4 จำนวนรอบของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอพีดี

ขั้นตอน	องศาเซลเซียส	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Heat-denaturation	95	5	1
Denaturation	94	1	40
Annealing	40	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	7	1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Gel electrophoresis)

5.1 RAPD gel electrophoresis นำ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR-RAPD มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel เตรียมใน 0.5x TAE buffer รันในกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และย้อมด้วย MeestroSafe™ dye (Maestrogen, USA) นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงสีขาวแล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV light transillumination FluorS™ MultiImager

5.2 SSR gel electrophoresis นำ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR-SSR มาตรวจสอบด้วย 3% agarose gel เตรียมใน 0.5x TAE buffer รันในกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และย้อมด้วย MeestroSafe™ dye (Maestrogen, USA) นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงสีขาวแล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV light transillumination FluorS™ Multilmager ทำการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมภาพจากเครื่อง UV light transillumination FluorS™ Multilmager

6. การวิเคราะห์ผลการศึกษา

การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบในแต่ละตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดแตกต่างกันนั้นจะกำหนดให้เป็น 1 และ 0 ตามลาดับ โดยบันทึกในโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 เพื่อใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc และ SPSS

6.1 โปรแกรม NTSYSpc

นำข้อมูลที่ได้มาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc (Numerical Taxnomy and Multivariate Analysis System) version 2.10p โดยอาศัยสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธี Jaccard (1908) หลังจากนั้นนำค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) เพื่อทำการจัดกลุ่มทานตะวัน 10 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Unweighted pair group method with arithemetic averages (UPGMA) และวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) โดยแผนภาพการกระจายและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการจัดกลุ่ม มีหลักการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ ค่า r จะมีค่าอยู่ในช่วง $-1 \leq r \leq 1$ ไม่มีหน่วย โดยที่แกน x คือค่า correlation coefficient แกน y คือค่า Similarity coefficient โดยมีความสัมพันธ์กันคือ ถ้าค่า r มีค่าเป็นลบหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันนั้นคือถ้าค่า correlation coefficient เพิ่มขึ้นค่า similarity coefficient จะลดลง หรือถ้าค่า correlation coefficient ลดลง และค่า similarity coefficient จะเพิ่มขึ้น และค่า $r = -1$ หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันกันอย่างสมบูรณ์ ถ้าค่า r มีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันและค่า $r = 1$ แสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันอย่าสมบูรณ์ ถ้าค่า $r = 0$ หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient ไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่ค่า correlation coefficient และค่า Similarity coefficient อาจมีความสัมพันธ์กันในรูปอื่นหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (ชัชวาล เรืองประพันธ์, 2543)

6.2 โปรแกรม SPSS

วิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) เพื่อให้ได้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูล โดยใช้ค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) เพื่อทำการจัดกลุ่มทานตะวัน 24 สายพันธุ์ โดยใช้ multidimensional scaling (MDS) (Gower, 1966) และเพื่อเปรียบเทียบกับผลของการจัดกลุ่มที่ได้จากวิธี Unweighted pair group method with arithemetic averages (UPGMA) ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc

6.3 คำนวณ Polymorphism information content (PIC)

ค่า Polymorphism information content (PIC) ใช้บอกค่าความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิด ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$PIC = 1-\sum_{i=1}^{n} Pi^2$$

โดย *P*i คือ ความถี่ของอัลลีล i ในประชากรทานตะวันที่ศึกษา (Anderson et al., 1992)

6.4 Principle coordinate analysis (PCoA)

PCoA เป็นการคำนวณหาจากจำนวนแถบดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายทั้งหมดที่เกิดจากทานตะวัน 24 สายพันธุ์เพื่อดูรูปแบบการประจายในหลายมิติเพื่อบ่งถึงความหลากหลาย วิธีการนี้นำมาใช้ในการแยกแยะความเหมือนและความต่าง โดยมีพื้นฐานโปรแกรม IBM SPSS STATISTIC version 16 (IBM, USA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.5 ลำดับดีเอ็นเอไพรเมอร์และจำนวนอัลลีลของเครื่องหมาย SSR

Primers	Forward sequences (5'-3')	Reverse sequences (5'-3')	Number of alleles	References
ORS 160	TCCCTTCCTTTCATCGTCTGCT	TGGCAATTTGCCAAGGACC	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 16	GAGGAAATAAATCTCCGATTCA	GCAAGGACTGCAATTTAGGG	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 920	CGTTGGACGAAGAACTTGATTT	ACTTCCGTTTGTTCCGAGCTT	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ha4149	CAAAAACCTCTCTCCGTTGGC	GACTCCAAAGTCCACCAAATC	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ha2879	CATACCGTTCTTGTTC	CAACCTCCTAGGTCA	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 988	TTGATTTGGTGAAAGTGTGAAGC	CGAACATTATTTACATCGCTTTGTC	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 899	GCCACGTATAACTGACTATGACCA	CGAATACAGACTCGATAAACGACA	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 1088	ACTATCGAACCTCCCTCCAAAC	GGATTTCTTTCATCTTTGTGGTG	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 598	CCAAATGTGAGGTGGGAGAA	ATAGTCCCTGACGTGGATGG	3	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 822	CAATGCCATCTGTCATCAGCTAC	AAACAAACCTTTGGACGAAACTC	2	Darvishzadeh *et al*. (2010)
ORS 1068	AATTTGTCGACGGTGACGATAG	TTTTGTCATTTCATTACCCAAGG	nd	Tang *et al*. (2006)
ORS 188	CTTCGTAGCCAACTCCCACC	CAATGGTTGACAATGGGTTTGC	nd	Tang *et al*. (2006)
ORS 371	GTGTCTTCACACCACCAAACATCAACC	GGTGCCTTCTCTTCCTTGTG	nd	Tang *et al*. (2006)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 3.5 (continued).

Primers	Forward sequences (5'-3')	Reverse sequences (5'-3')	Number of alleles	References
ORS 331	TGAAGAAGGGTTGTTGATTACAAG	GCATTGGGTTCACCATTTCT	2	Tang *et al*. (2006)
ORS488	CCCATTCACTCCTGTTTCCA	CTCCGGTGAGGATTTGGATT	3	Tang *et al*. (2006)
ORS878	TGCAAGGTATCCATATTCCACAA	TATACGCACCGGAAAGAAAGTC	2	Tang *et al*. (2006)

Note: nd, no data

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 3.6 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์- เอสเอสอาร์

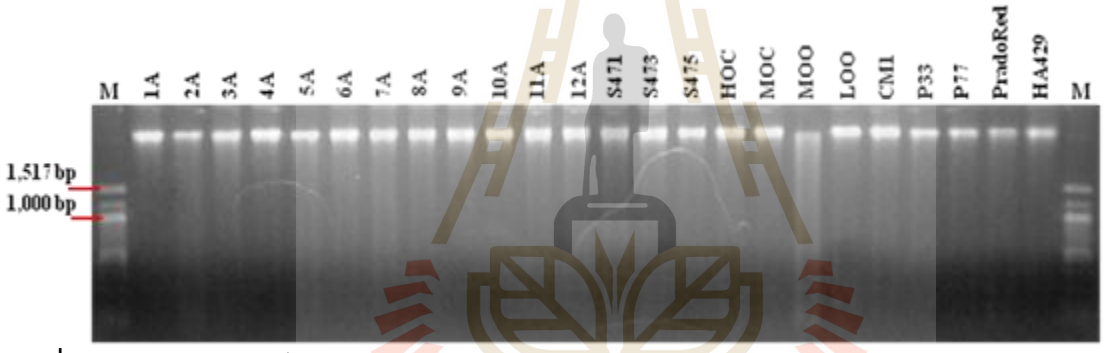
Content	Stock	Final concentration	Volume for 1 tube
TopTaq master mix	2x	1x	12.5 µl
Forward primer	2.5 µM	2.5 µM	1 µl
Reverse primer	2.5 µM	2.5 µM	1 µl
DNA template	50 ng/µl	50 ng/µl	1 µl
de-ionized water			9.5 µl
Total			25 µl

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (Gel electrophoresis) ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย MeestroSafe™ dye ร่วมกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาหาอัตราส่วน OD260/280 สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 1.8 และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีอัตราส่วน OD260/280 อยู่ระหว่าง 1.6-1.9 มีค่าเฉลี่ย 1.78 และมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 170.1 -1454.5 ng/ul (ภาพที่ 4.1 ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 แถบจีโนมิกดีเอ็นเอของทานตะวันจำนวน 24 ตัวอย่าง (M = 100 bp DNA ladder).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.1 คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์

Line/Variety	260/230 nm	260/280 nm	DNA quantity (ng/µl)
1A	2.0	1.9	738.8
2A	1.2	1.6	590.5
3A	1.6	1.9	464.6
4A	1.7	1.8	532.4
5A	1.1	1.6	477.1
6A	1.5	1.8	570.5
7A	1.6	1.8	371.8
8A	1.5	1.7	387.1
9A	1.6	1.8	784.0
10A	1.4	1.7	792.7
11A	1.8	1.8	1454.5
12A	1.5	1.8	425.0
S471	1.3	1.8	205.4
S473	1.3	1.8	199.5
S475	1.6	1.9	596.8
HOC	1.3	1.8	248.2
MOC	1.6	1.8	308.2
MOO	1.0	1.6	200.8
LOO	1.1	1.8	170.1
CM1	1.4	1.8	186.4
P33	1.3	1.7	913.8
P77	1.3	1.7	594.4
PradoRed	0.9	1.8	316.0
HA429	1.4	1.8	171.7

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 RAPD marker analysis

จากจำนวนไพร์เมอร์ที่นำมาคัดเลือก 48 ไพรเมอร์ พบจำนวน 14 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในทานตะวันได้ ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เหล่านี้ พบจำนวนแถบดีเอ็นเอ 158 แถบ และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เป็น monomorphic (ตารางที่ 4.1 ภาพที่ 4.2-4.15) จำนวนอัลลีลต่อโลคัสอยู่ระหว่าง 3 สำหรับ OPF10 และ 19 สำหรับ OPF4 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.29 (ตารางที่ 4.2) ขนาดของแถบดีเอ็นเอต่ำสุด 196 bp สำหรับไพรเมอร์ S5 และมีขนาดใหญ่สุด 1586 bp สำหรับไพรเมอร์ OPX13 ประสิทธิภาพในการแยกแยะนั้นพิจารณาจากค่า PIC ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.02 สำหรับไพรเมอร์ OPF19 ถึง 0.74 สำหรับไพรเมอร์ S23 และ OPX14 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40 จากการรายงานของ Yu et al. (2012) ค่า PIC มีประสิทธิภาพสูงมีค่ามากกว่า PIC >0.5 ประสิทธิภาพปานกลาง 0.25<PIC<0.50 และมีประสิทธิภาพต่ำ เมื่อ PIC <0.25 จากผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์จำนวน 6 จาก 14 ไพรเมอร์มีค่า PIC สูงกว่า 0.5 ไพรเมอร์จำนวน 5 ตัวมีประสิทธิภาพปานกลาง และไพรเมอร์ 3 ตัวมีประสิทธิภาพต่ำ ไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงได้แก่ S23, OPF10, OPF13, OPX1, OPX13 และ OPX14 (ตารางที่ 4.2) ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนจากทานตะวันทั้งหมดมีค่าแปรปรวนสุงสุด 0.49 (ระหว่าง 7A และ 8A) และมีค่าต่ำสุดระหว่าง 2A กับ Pacific 77, 5A กับ Pacific 77, 9A กับ Prado Red, 11A กับ Prado Red โดยมีค่าเฉลี่ย 0.22

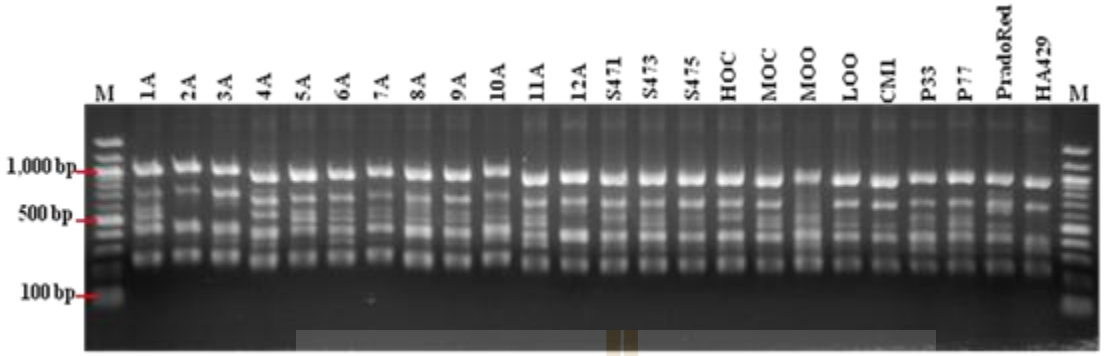
จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยนำแมทริกซ์ความเหมือนตัวแทนสัมประสิทธิ์แจคคาร์ด (Jaccard's coefficient) เพื่อจัดกลุ่มข้อมูลโดยการใช้โปรแกรม UPGMA และโปรแกรม NTSYSpc version 2.0 ทำให้แบ่งกลุ่มทานตะวันออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกมีพันธุ์แท้ 12 สายพันธุ์ (1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A, 12A) และพันธุ์สังเคราะห์อีก 7 สายพันธุ์ที่พัฒนาโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยกลุ่มที่สองมีพันธุ์ลูกผสม CM1 พันธุ์ลูกผสมทางการค้า Pacific33 และ Pacific 77 และสายพันธุ์จากต่างประเทศ ได้แก่ PradoRed และ HA429 นอกจากนี้ ไพรเมอร์ S23 และ OPX14 ให้ค่า PIC สูงสุดและมีศักยภาพที่จะแยกแยะความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4.3, ภาพที่ 4.16)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

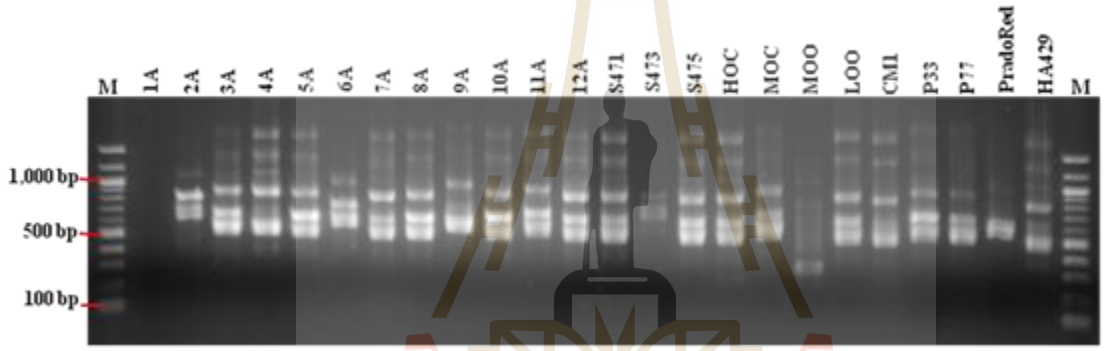
ตารางที่ 4.2 ไพรเมอร์อาร์เอพีดี ลำดับเบส จำนวนอัลลีล ขนาดของแถบดีเอ็นเอ polymorphic bands และ monomorphic bands และค่า PIC

Primer name	Sequence 5' - 3'	Number of alleles	Band range (bp)	Polymorphic bands	Monomorphic bands	PIC
S5	TGCGCCCTTC	18	196 - 1077	18	-	0.09
S10	CTGCTGGGAC	10	433 - 956	10	-	0.36
S23	AGTCAGCCAC	6	206 - 560	6	-	0.74
S29	GGGTAACGCC	17	300 - 1500	17	-	0.28
OPF4	GGTGATCAGG	19	300 - 1500	19	-	0.11
OPF10	GGAAGCTTGG	3	545 - 647	3	-	0.66
OPF13	GGCTGCAGAA	12	593 - 1450	12	-	0.62
OPF19	CCTCTAGACC	15	321 - 1468	15	-	0.02
OPJ20	AAGCGGCCTC	10	212 - 714	10	-	0.27
OPX1	CTGGGCACGA	13	323 - 1200	13	-	0.65
OPX2	TTCCGCCACC	7	400 - 1016	7	-	0.25
OPX12	TCGCCAGCCA	12	365 - 1174	12	-	0.29
OPX13	ACGGGAGCAA	8	400 - 1586	8	-	0.57
OPX14	ACAGGTGCTG	8	592 - 1538	8	-	0.74

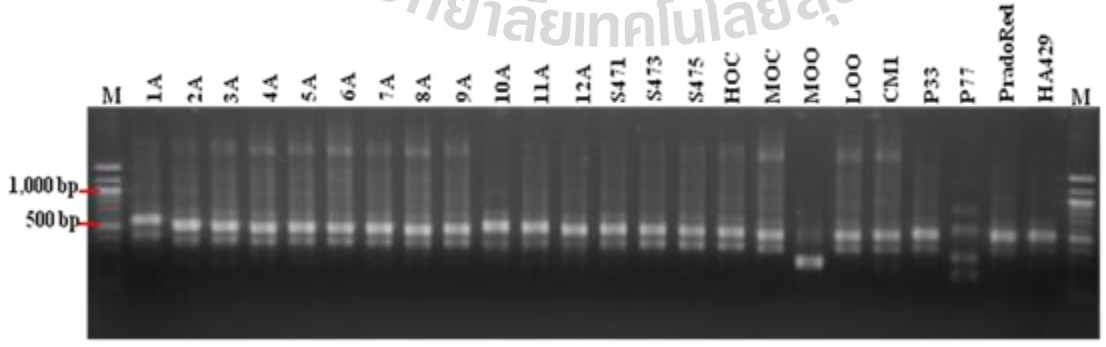
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



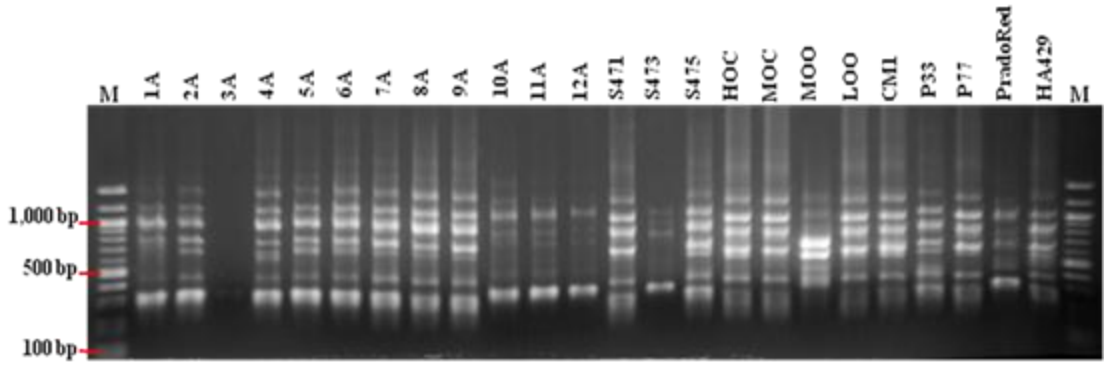
ภาพที่ 4.2 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S5 (M = 100 bp DNA ladder).



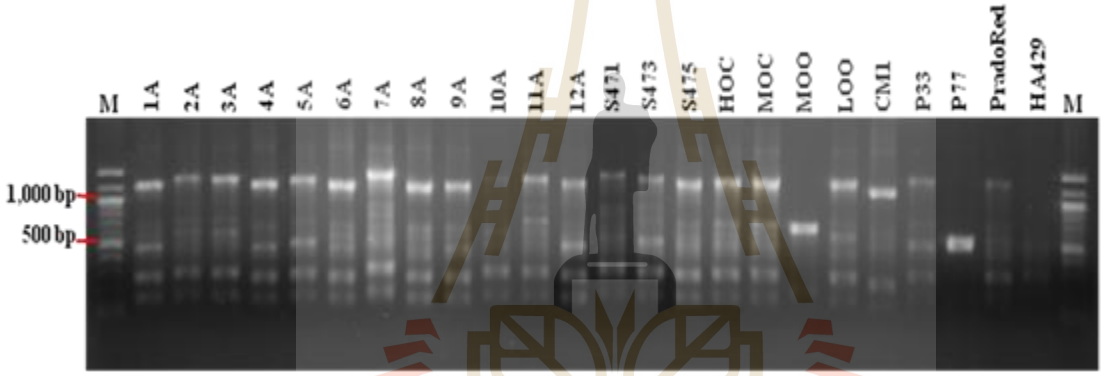
ภาพที่ 4.3 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S10 (M = 100 bp DNA ladder).



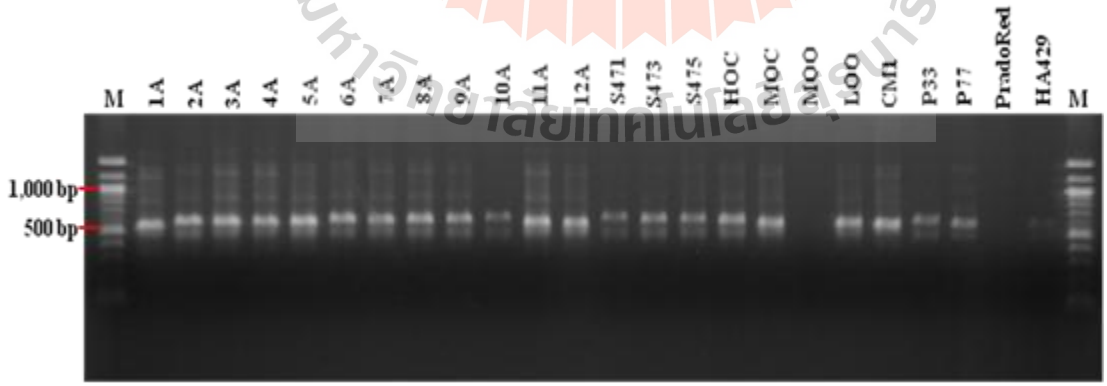
ภาพที่ 4.4 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S23 (M = 100 bp DNA ladder).



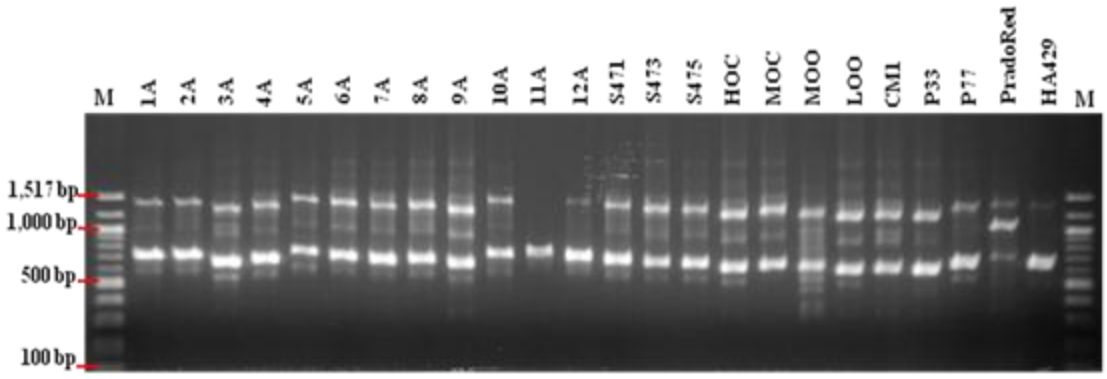
ภาพที่ 4.5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S29 (M = 100 bp DNA ladder).



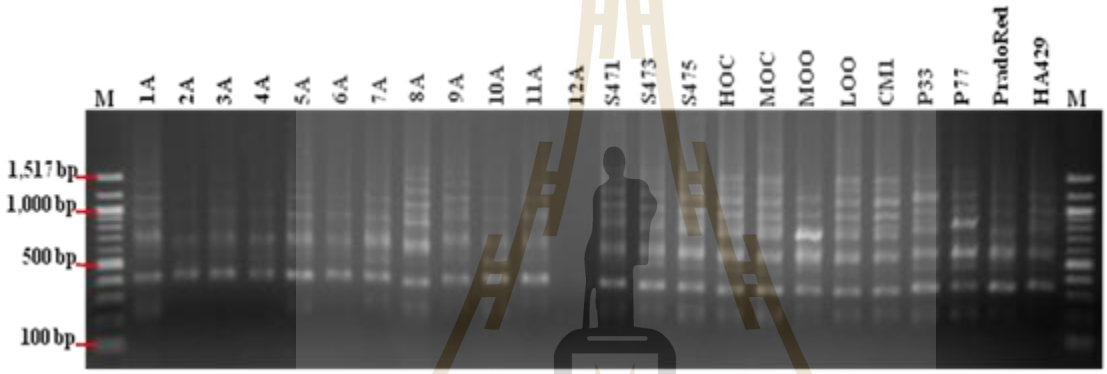
ภาพที่ 4.6 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF4 (M = 100 bp DNA ladder).



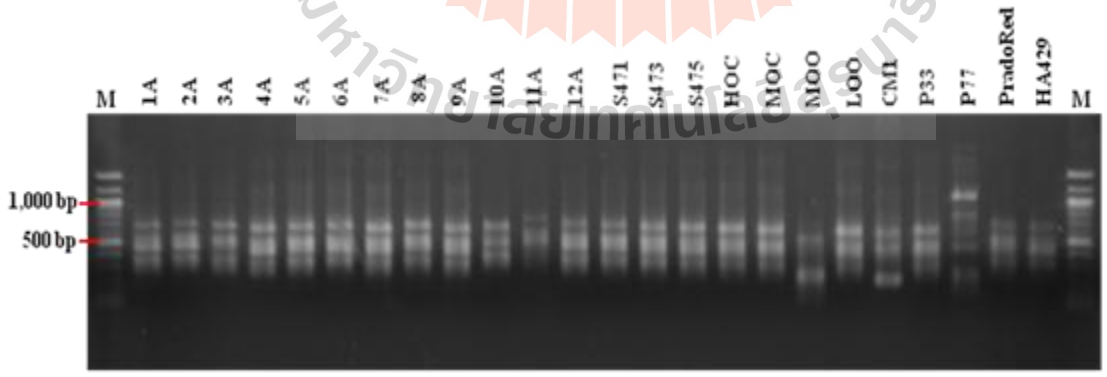
ภาพที่ 4.7 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF10 (M = 100 bp DNA ladder).



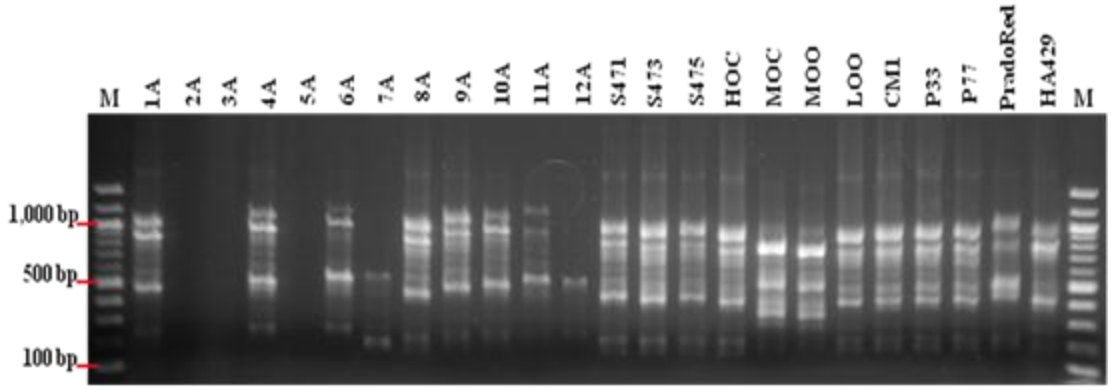
ภาพที่ 4.8 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF13 (M = 100 bp DNA ladder).



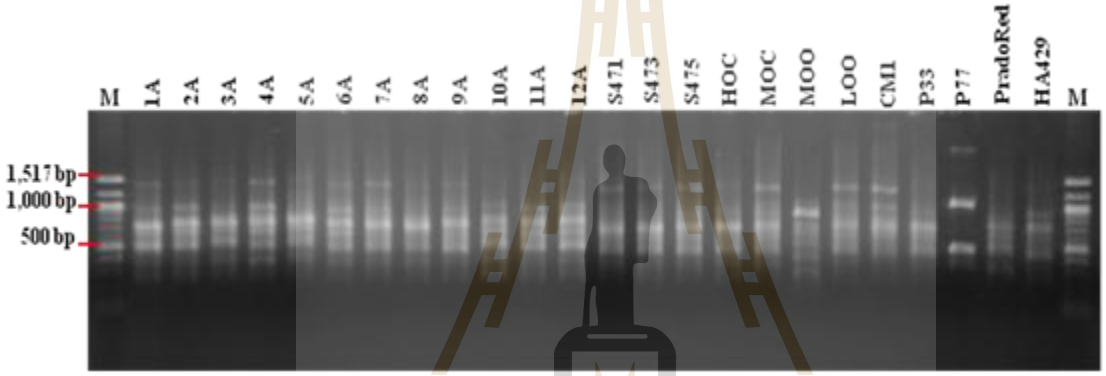
ภาพที่ 4.9 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF19 (M = 100 bp DNA ladder).



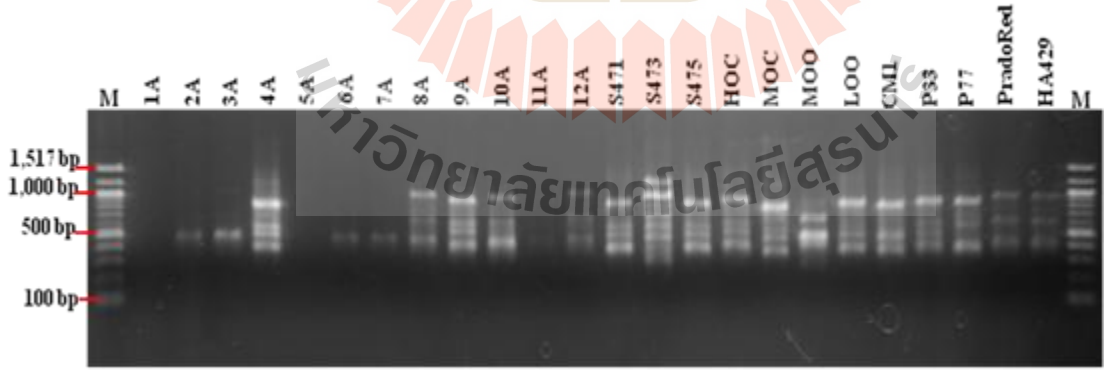
ภาพที่ 4.10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPJ20 (M = 100 bp DNA ladder).



ภาพที่ 4.11 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX1 (M = 100 bp DNA ladder).

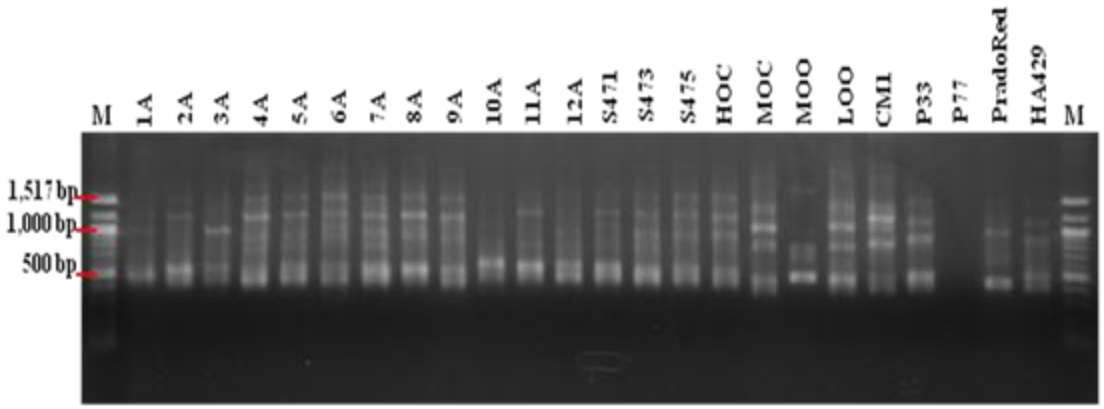


ภาพที่ 4.12 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX2 (M = 100 bp DNA ladder).

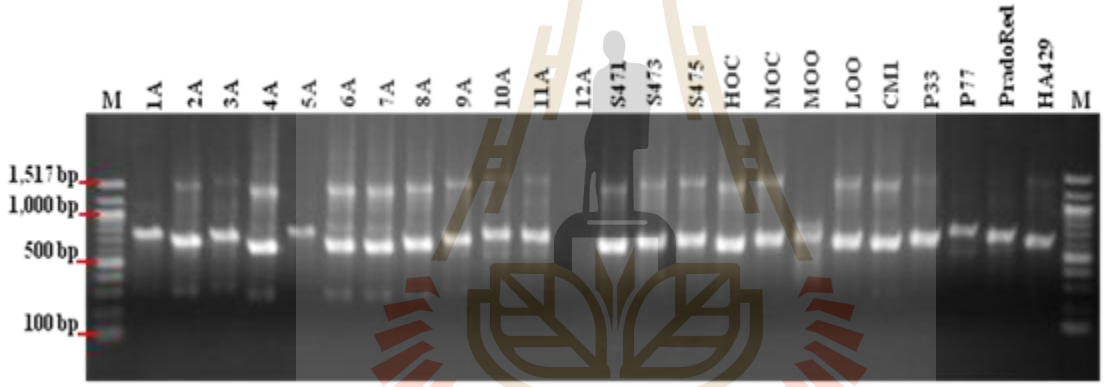


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.13 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX12 genotypes (M = 100 bp DNA ladder).



ภาพที่ 4.14 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX13 (M = 100 bp DNA ladder).



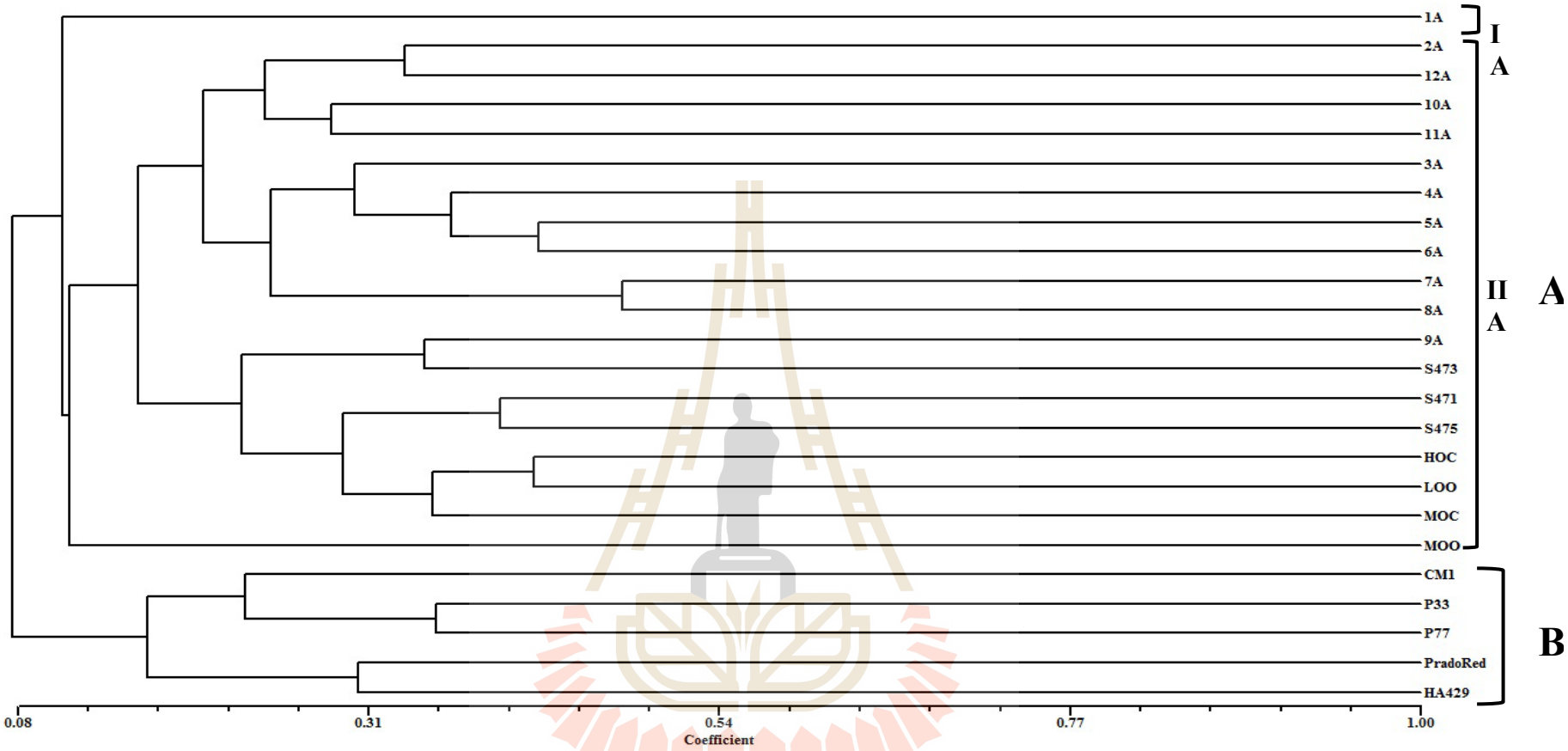
ภาพที่ 4.15 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX14 (M = 100 bp DNA ladder).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 Jaccard's coefficient similarity matrix ในการใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดีในทานตะวัน 24 สายพันธุ์

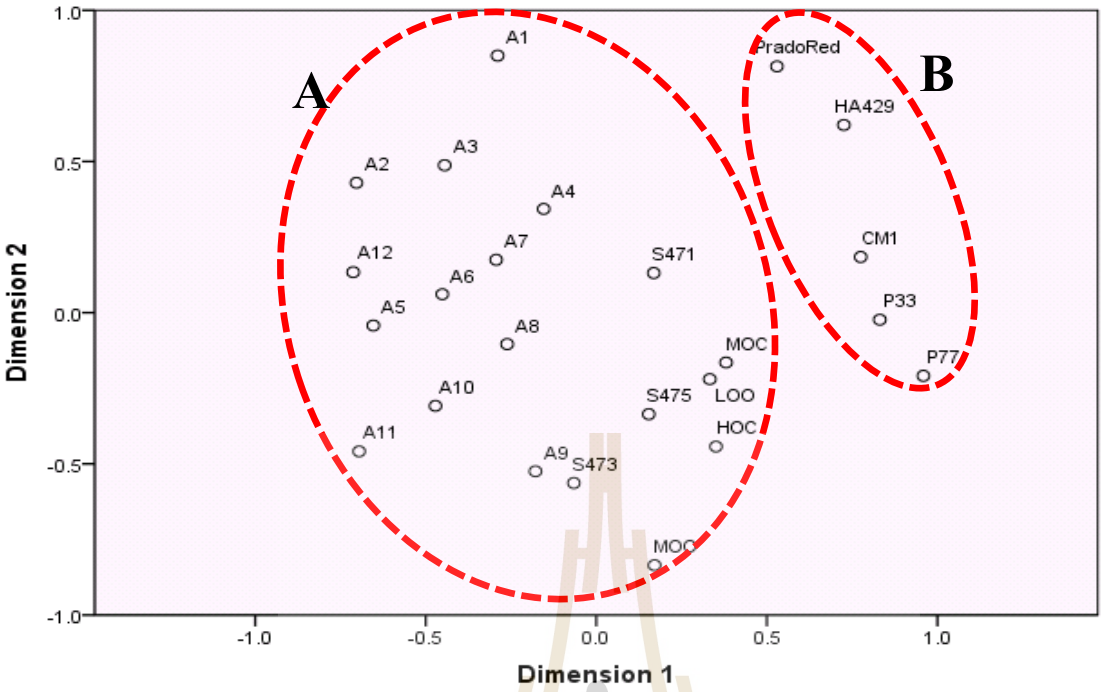
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1.00																							
2	0.21	1.00																						
3	0.19	0.24	1.00																					
4	0.08	0.12	0.27	1.00																				
5	0.15	0.14	0.33	0.35	1.00																			
6	0.15	0.24	0.30	0.38	0.42	1.00																		
7	0.18	0.27	0.27	0.32	0.29	0.32	1.00																	
8	0.10	0.12	0.13	0.16	0.22	0.28	0.49	1.00																
9	0.05	0.13	0.13	0.23	0.17	0.25	0.23	0.29	1.00															
10	0.12	0.28	0.28	0.20	0.33	0.27	0.23	0.22	0.29	1.00														
11	0.10	0.18	0.16	0.13	0.22	0.23	0.13	0.17	0.20	0.27	1.00													
12	0.16	0.31	0.19	0.08	0.15	0.29	0.20	0.20	0.13	0.22	0.29	1.00												
13	0.10	0.10	0.16	0.19	0.15	0.22	0.27	0.31	0.17	0.16	0.10	0.20	1.00											
14	0.10	0.11	0.17	0.23	0.16	0.20	0.20	0.20	0.36	0.24	0.10	0.14	0.18	1.00										
15	0.02	0.09	0.13	0.25	0.15	0.25	0.17	0.20	0.38	0.24	0.09	0.15	0.38	0.33	1.00									
16	0.07	0.07	0.07	0.13	0.07	0.17	0.09	0.14	0.28	0.22	0.07	0.15	0.25	0.28	0.40	1.00								
17	0.08	0.05	0.10	0.19	0.10	0.10	0.12	0.14	0.18	0.16	0.17	0.17	0.31	0.20	0.29	0.38	1.00							
18	0.14	0.13	0.08	0.05	0.05	0.12	0.14	0.10	0.18	0.17	0.16	0.14	0.05	0.15	0.14	0.23	0.15	1.00						
19	0.12	0.12	0.15	0.16	0.12	0.20	0.22	0.17	0.23	0.21	0.21	0.21	0.26	0.15	0.29	0.45	0.39	0.26	1.00					
20	0.02	0.07	0.02	0.08	0.02	0.07	0.08	0.06	0.13	0.08	0.06	0.06	0.12	0.10	0.18	0.18	0.12	0.10	0.36	1.00				
21	0.06	0.06	0.02	0.11	0.06	0.11	0.13	0.10	0.08	0.05	0.04	0.06	0.15	0.08	0.19	0.18	0.12	0.08	0.23	0.30	1.00			
22	0.02	0.00	0.06	0.03	0.00	0.02	0.03	0.06	0.04	0.05	0.02	0.02	0.14	0.10	0.13	0.14	0.12	0.10	0.14	0.16	0.35	1.00		
23	0.05	0.05	0.08	0.04	0.02	0.06	0.06	0.06	0.00	0.06	0.00	0.05	0.11	0.06	0.07	0.05	0.13	0.06	0.07	0.13	0.13	0.13	1.00	
24	0.05	0.04	0.07	0.08	0.02	0.06	0.04	0.04	0.03	0.02	0.02	0.05	0.04	0.06	0.11	0.07	0.10	0.09	0.10	0.22	0.17	0.22	0.30	1.00

Remark; 1=1A, 2=2A, 3=3A, 4=4A, 5=5A, 6=6A, 7=7A, 8=8A, 9=9A, 10=10A, 11=11A, 12=12A, 13=S471, 14=S473, 15=S475, 16=HOC, 17=MOC, 18=MOO, 19=LOO, 20=CM1, 21=P33, 22=P77, 23=PradoRed, 24=HA429.



ภาพที่ 4.16 Dendrogram ของทานตะวันจำนวน 24 สายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis และ Jaccard's similarity coefficients ที่ได้จากเครื่องหมาย RAPD

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.17 Principal coordinates analysis (PCoA) โดยเครื่องหมาย RAPD

ผลการกระจาย PCoA based scatter plot ดังภาพที่ 4.17 พบว่าสามารถแบ่งทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์ออกเป็นสองกลุ่มหลัก บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามแหล่งที่มาในการนำมาผสมละอองเกสร ผลการกระจายโดย PCoA สนับสนุนผลการจัดกลุ่มโดย UPGMA

4.3 SSR marker analysis

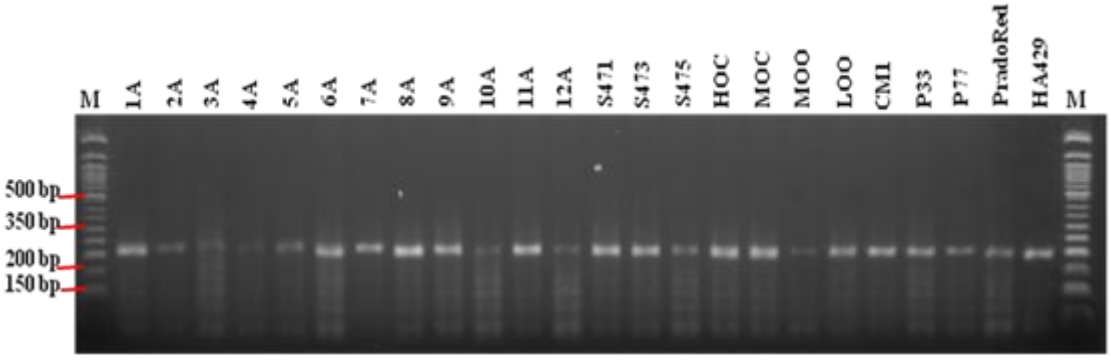
เครื่องหมาย SSR ได้เริ่มต้นนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์แหล่งพันธุกรรมในทานตะวัน (Tang et al., 2002; Paniego et al., 2002; Yu et al., 2002; Tang and Knapp, 2003; Zhang et al., 2005; Hvarleva et al., 2007) โดย Darvishzadeh et al. (2010) ได้รายงานการใช้ไพรเมอร์ SSR 38 ตัว ว่าเพียงพอและครอบคลุมทั่วทั้งจีโนมทานตะวัน หากพิจารณาถึงค่า PIC มีไพรเมอร์จำนวน 16 จาก 38 ไพรเมอร์ ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษา polymorphism ในการศึกษาครั้งนี้ มีเพียง 12 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นในทางตะวันที่ศึกษา โดยพบจำนวน 54 อัลลีล และไม่มีอัลลีลใดเป็น monomorphic band ดังแสดงในภาพ 4.18-4.29 จำนวนอัลลีลต่อโลคัสค่าเท่ากับ 3 ในไพรเมอร์ ORS331 ถึง 6 ในไพรเมอร์ ha4149 โดยมีค่าเฉลี่ย 4.50 (ตารางที่ 4.4) แถบดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ระหว่าง 146 bp -456 bp การประเมินประสิทธิภาพในการแยกแยะโดยค่า PIC มีค่า 0.46 สำหรับไพรเมอร์ ORS920 และ 0.81 สำหรับไพรเมอร์ ORS160 และมีค่าเฉลี่ย 0.64 นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนไพรเมอร์ 11 จาก 12 ตัวมีค่า PIC สูง และมีแค่

ไพรเมอร์เพียงตัวเดียวที่มีประสิทธิภาพปานกลาง ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับผลที่รายงานโดย Darvjszadeh et al. (2010) ซึ่งได้รายงานค่าเฉลี่ยของอัลลีลต่อโลคัสเท่ากับ 2.32 และค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.09-0.62 และมีค่าเฉลี่ย 0.41 ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเครื่องหมาย SSR เหล่านี้มีประสิทธิภาพที่ดีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

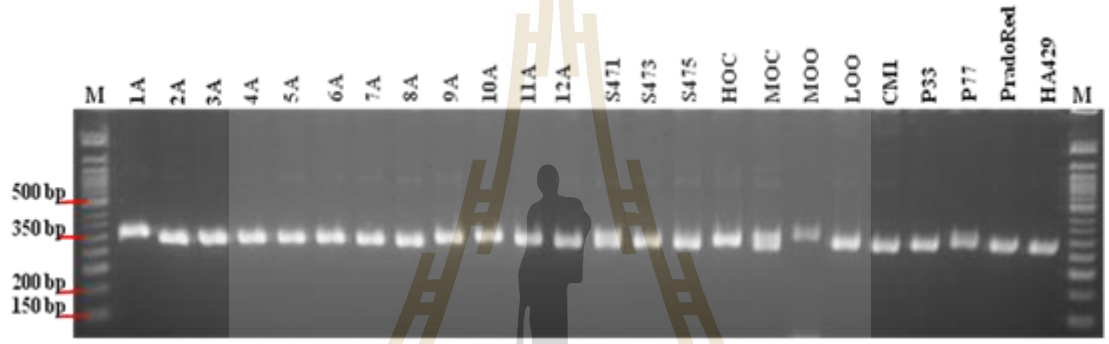
ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) มีค่าสูงสุด 0.85 ระหว่างสายพันธุ์ S471 กับ HOC และมีค่าต่ำสุดระหว่างสายพันธุ์ 1A กับ S475 และระหว่าง 1A กับ PradoRed, 5A กับ PradoRed, 6A กับ PradoRed, 7A กับ PradoRed, S473 กับ PradoRed, LOO กับ PradoRed โดยมีค่าเฉลี่ย 0.31 (ตารางที่ 4.5, ภาพที่ 4.30) สิ่งที่น่าสนใจคือไพรเมอร์ ORS1088 ให้แถบดีเอ็นเอสองแถบในพันธุ์ Pacific 33 และ Pacific 77 แสดงว่า พันธุ์ทานตะวันนี้เป็นพันธุ์ลูกผสม นอกจากนี้บางไพรเมอร์ เช่น ha4149, ORS899, ORS988 ให้แถบสองแถบในพันธุ์แท้ แสดงว่า พันธุ์แท้ที่พัฒนาโดยมหาวิทยาลัยยังไม่ใช่ isogenic line อาจอธิบายได้ว่า ความเป็น heterozygocity ของพันธุ์แท้เหล่านี้ได้รับอิทธิพลจากพ่อแม่ซึ่งเป็นพันธุ์ทาง หรือ มีจำนวน SSR สองชุดในทานตะวันจีโนม ซึ่งมีรายงานลักษณะเดียวกันนี้ใน Akai et al. (1998) และ Paniego et al. (2002) การวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ cluster analysis ทำให้แบ่งทานตะวันออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่ม A ประกอบด้วย 12 inbred line และ 7 synthetic lines ส่วนกลุ่ม B ประกอบไปด้วย CM1, Pacific 33, Pacific 77, Prado red และ HA429

ผลการวิเคราะห์จากแผนภาพการกระจายและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ PCoA สามารถแบ่งพันธุ์ทานตะวันออกเป็นสองกลุ่ม (ภาพที่ 4.31) โดยกลุ่มแรกมี 12 สายพันธุ์ ได้แก่กลุ่ม inbred lines และ 7 synthetic lines ส่วนกลุ่มที่สองได้แก่ CM1, Pacific33, Pacific 77, Pradored, HA429 โดยผลการวิเคราะห์ PCoA ให้ผลสนับสนุนการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์แบบ UPGMA เช่นกัน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการใช้เครื่องหมาย SSR และ AFLP ในถั่ว อัลมอลด์ ทานตะวัน (Sorkheh et al., 2007; Kumar et al., 2009; Darvishzadeh, 2012)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

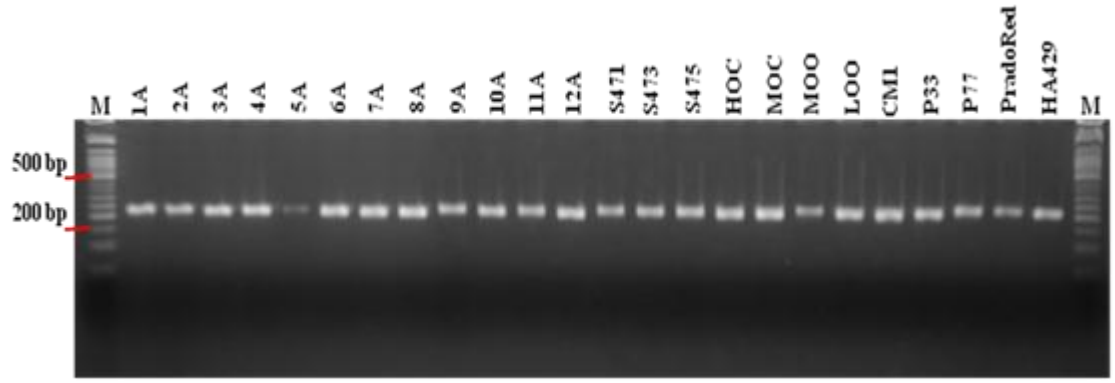


ภาพที่ 4.18 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 160 (M = 50 bp DNA ladder).

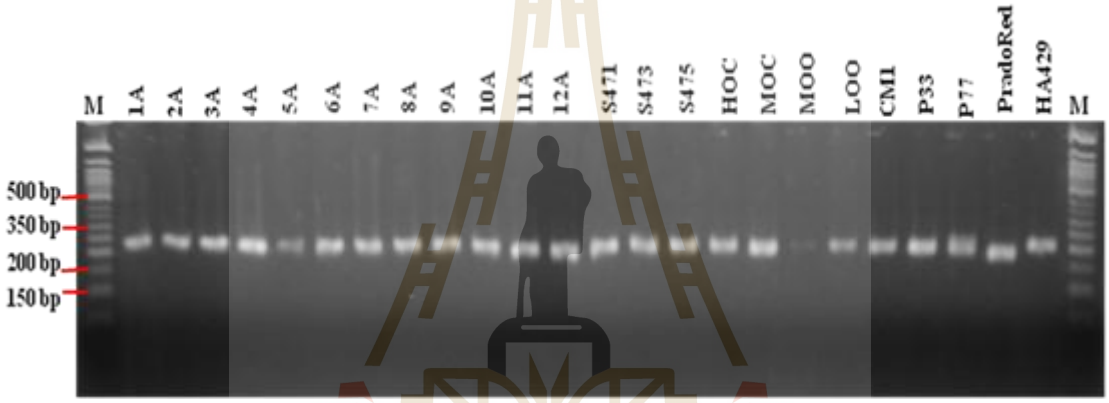


ภาพที่ 4.19 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 371 (M = 50 bp DNA ladder).

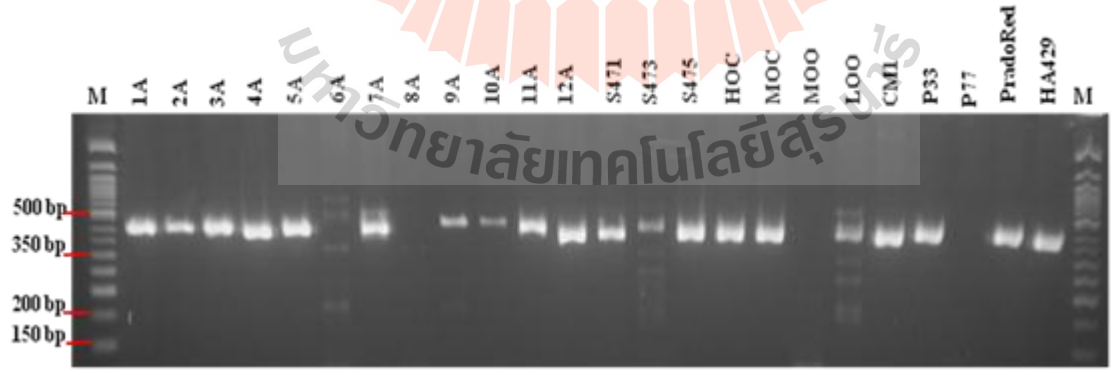
ภาพที่ 4.20 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ha4149 (M = 50 bp DNA ladder).



ภาพที่ 4.21 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 331 (M = 50 bp DNA ladder).

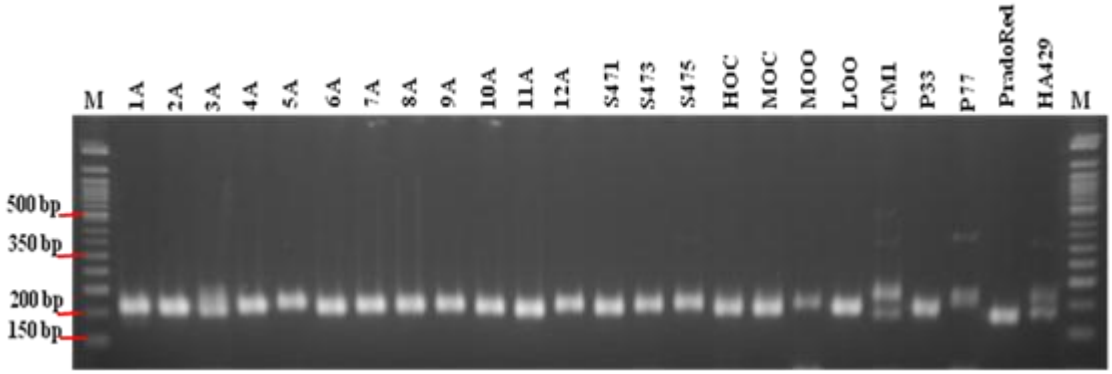


ภาพที่ 4.22 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 488 (M = 50 bp DNA ladder).

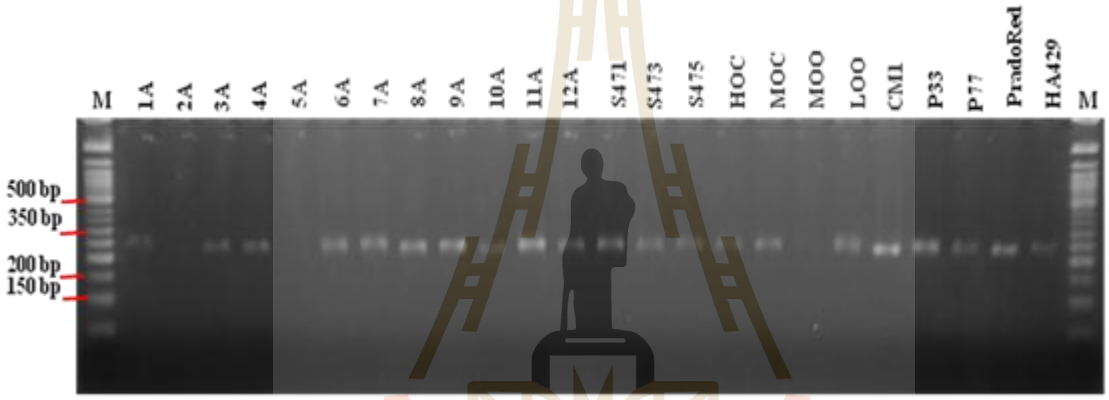


ภาพที่ 4.23 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 598 (M = 50 bp DNA ladder).

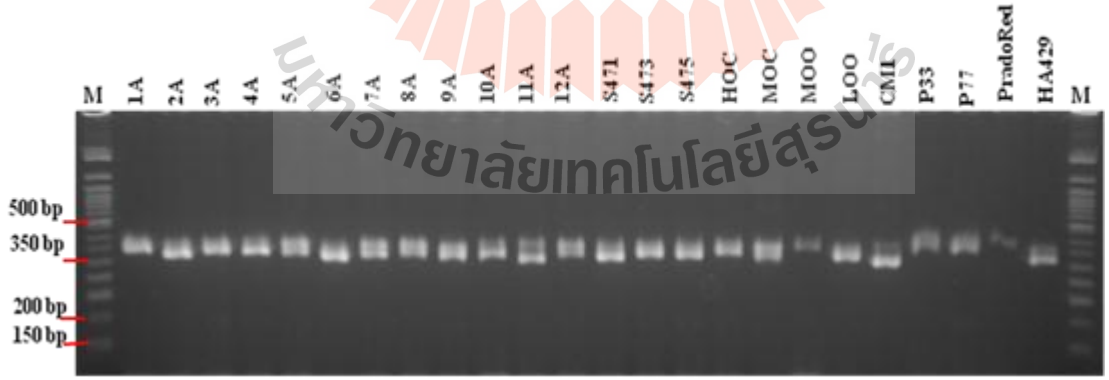
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.24 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 822 (M = 50 bp DNA ladder).

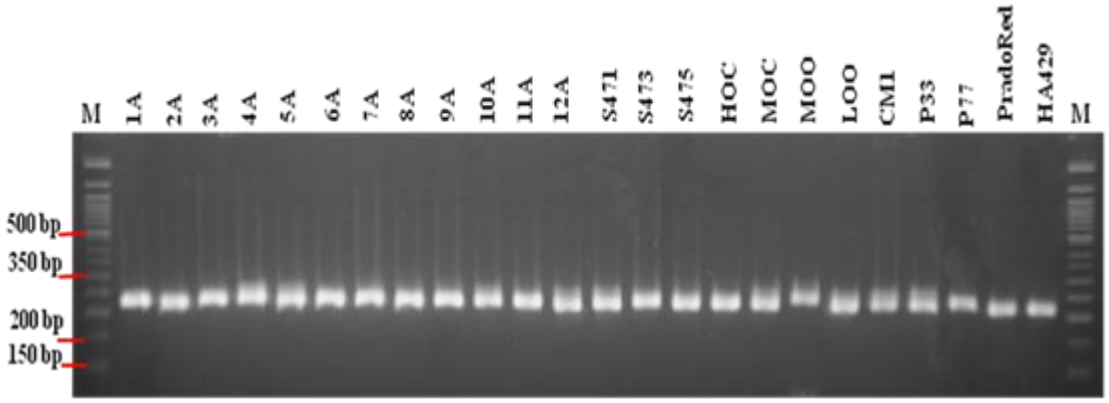


ภาพที่ 4.25 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 878 (M = 50 bp DNA ladder).

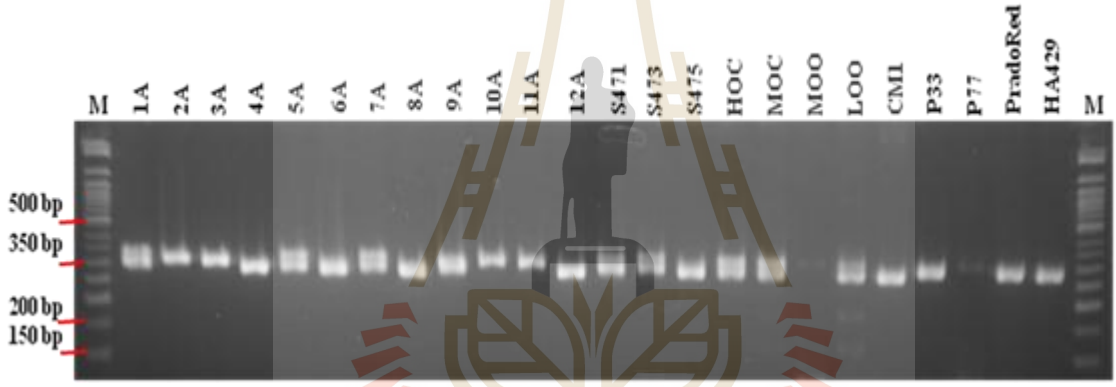


ภาพที่ 4.26 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 899 (M = 50 bp DNA ladder).

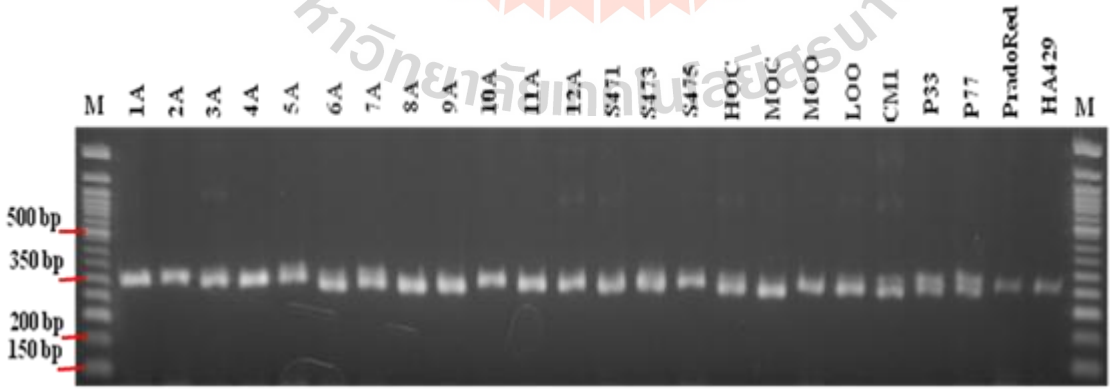
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.27 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ primer ORS 920 (M = 50 bp DNA ladder).



ภาพที่ 4.28 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 988 (M = 50 bp DNA ladder).



ภาพที่ 4.29 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ ORS 1088 (M = 50 bp DNA ladder).

ตารางที่ 4.4 ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ ลำดับเบส, จำนวนอัลลีล, ขนาดของแถบดีเอ็นเอ, polymorphic และ monomorphic bands และค่า polymorphic information content (PIC)

Primer name	Forward sequence 5'-3'	Reverse sequence 5'-3'	Linkage group	Number of alleles	Band range (bp)	Polymorphic bands	Monomorphic bands	PIC
ORS 160	TCCCTTCCTTTCATCGTCTGCT	TGGCAATTTGCCAAGGACC		4	207-230	4	-	0.81
ORS 920	CGTTGGACGAAGAACTTGATTT	ACTTCCGTTTGTTCCGAGCTT	LG16[1]	4	215-241	4	-	0.46
ha4149	CAAAAACCTCTCTCCGTTGGC	GACTCCAAAGTCCACCAAATC		6	146-200	6	-	0.68
ORS 988	TTGATTTGGTGAAAGTGTGAAGC	CGAACATTATTTACATCGCTTTGTC	LG17[1]	5	266-336	5	-	0.57
ORS 899	GCCACGTATAACTGACTATGACCA	CGAATACAGACTCGATAAACGACA	LG16[1]	5	324-405	5	-	0.59
ORS 1088	ACTATCGAACCTCCCTCCAAAC	GGATTTCTTTCATCTTTGTGGTG	LG10[1]	5	237-304	5	-	0.71
ORS 598	CCAAATGTGAGGTGGGAGAA	ATAGTCCCTGACGTGGATGG	LG1[1]	5	356-436	5	-	0.78
ORS 822	CAATGCCATCTGTCATCAGCTAC	AAACAAACCTTTGGACGAAACTC	LG1[1]	4	172-234	4	-	0.62

ตารางที่ 4.4 (continued).

Primer name	Forward sequence 5'-3'	Reverse sequence 5'-3'	Linkage group	Number of alleles	Band range (bp)	Polymorphic bands	Monomorphic bands	PIC
ORS 371	GTGTCTTCACACCA CCAAACATCAACC	GGTGCCTTCTCTTCC TTGTG	LG1[2]	4	291-344	4	-	0.61
ORS 331	TGAAGAAGGGTTGT TGATTACAAG	GCATTGGGTTCACC ATTTCT	LG7[1]	3	250-288	3	-	0.55
ORS488	CCCATTCACTCCTGT TTCCA	CTCCGGTGAGGATT TGGATT	LG3[1]	5	245-290	5	-	0.74
ORS878	TGCAAGGTATCCAT ATTCCACAA	TATACGCACCGGAA AGAAAGTC	LG10[1]	4	273-310	4	-	0.58

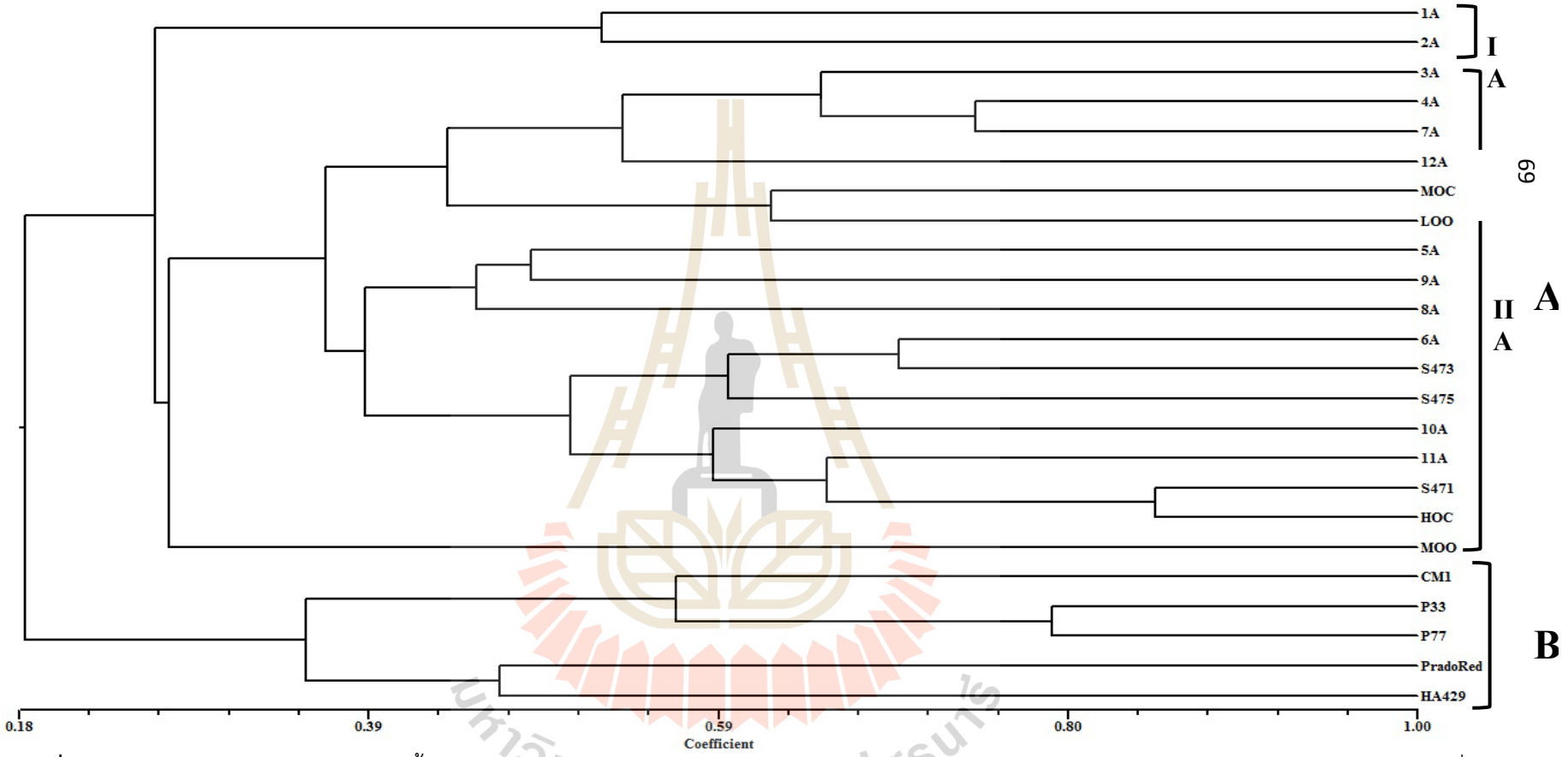
Note; [1]Tang *et al*. (2002); [2]Tang *et al*. (2006)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

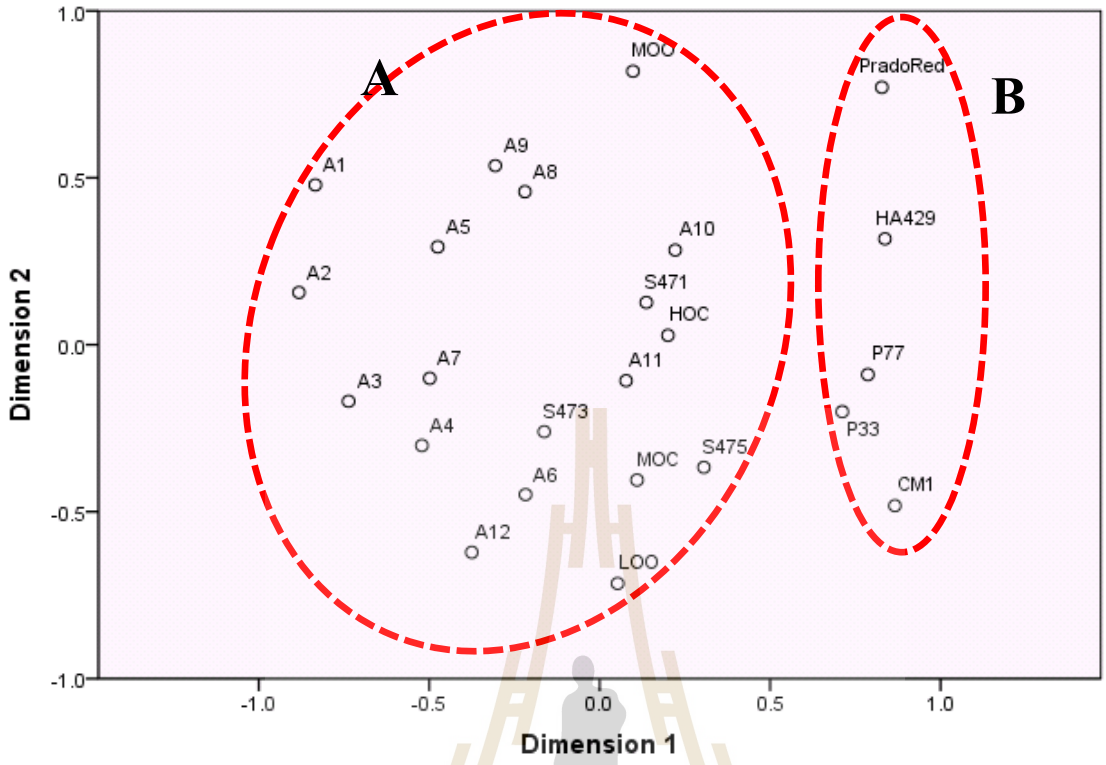
ตารางที่ 4.5 Jaccard's coefficient similarity matrix ในทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมาย SSR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1.00																							
2	0.52	1.00																						
3	0.58	0.57	1.00																					
4	0.40	0.45	0.61	1.00																				
5	0.48	0.27	0.43	0.42	1.00																			
6	0.08	0.29	0.27	0.52	0.35	1.00																		
7	0.43	0.48	0.69	0.74	0.67	0.54	1.00																	
8	0.24	0.18	0.35	0.42	0.42	0.35	0.52	1.00																
9	0.31	0.35	0.17	0.40	0.48	0.58	0.43	0.48	1.00															
10	0.24	0.27	0.26	0.25	0.33	0.35	0.37	0.42	0.40	1.00														
11	0.23	0.26	0.33	0.32	0.40	0.42	0.43	0.32	0.23	0.56	1.00													
12	0.08	0.29	0.45	0.61	0.17	0.45	0.54	0.43	0.25	0.17	0.42	1.00												
13	0.15	0.26	0.17	0.32	0.40	0.50	0.36	0.32	0.54	0.56	0.62	0.25	1.00											
14	0.16	0.27	0.35	0.42	0.42	0.70	0.52	0.33	0.56	0.50	0.56	0.43	0.56	1.00										
15	0.00	0.09	0.17	0.33	0.33	0.61	0.30	0.33	0.32	0.42	0.48	0.35	0.56	0.58	1.00									
16	0.08	0.17	0.25	0.32	0.32	0.50	0.36	0.40	0.38	0.64	0.69	0.42	0.85	0.56	0.64	1.00								
17	0.20	0.22	0.36	0.41	0.28	0.36	0.44	0.21	0.27	0.41	0.53	0.50	0.47	0.48	0.48	0.60	1.00							
18	0.30	0.08	0.16	0.23	0.38	0.08	0.28	0.23	0.30	0.15	0.22	0.24	0.37	0.15	0.31	0.37	0.58	1.00						
19	0.16	0.18	0.43	0.50	0.17	0.35	0.37	0.25	0.24	0.25	0.40	0.43	0.40	0.33	0.42	0.40	0.62	0.23	1.00					
20	0.00	0.00	0.10	0.19	0.19	0.20	0.17	0.19	0.09	0.19	0.18	0.20	0.09	0.19	0.29	0.18	0.23	0.09	0.19	1.00				
21	0.15	0.08	0.24	0.31	0.15	0.24	0.28	0.23	0.07	0.46	0.37	0.24	0.30	0.23	0.38	0.37	0.39	0.14	0.38	0.61	1.00			
22	0.22	0.08	0.24	0.31	0.31	0.16	0.28	0.15	0.15	0.31	0.22	0.16	0.22	0.15	0.38	0.22	0.32	0.21	0.31	0.52	0.79	1.00		
23	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.16	0.17	0.08	0.09	0.16	0.00	0.08	0.24	0.07	0.15	0.00	0.19	0.31	0.38	1.00	
24	0.00	0.17	0.08	0.08	0.08	0.16	0.07	0.08	0.15	0.23	0.30	0.16	0.37	0.15	0.31	0.44	0.26	0.29	0.23	0.35	0.43	0.43	0.46	1.00

Remark; 1=1A, 2=2A, 3=3A, 4=4A, 5=5A, 6=6A, 7=7A, 8=8A, 9=9A, 10=10A, 11=11A, 12=12A, 13=S471, 14=S473, 15=S475, 16=HOC, 17=MOC, 18=MOO, 19=LOO, 20=CM1, 21=P33, 22=P77, 23=PradoRed, 24=HA429.



ภาพที่ 4.30 Dendrogram ของทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis และ Jaccard's similarity coefficients โดยใช้เครื่องหมาย SSR



ภาพที่ 4.31 Principal Coordinates Analysis (PCoA) โดยเครื่องหมาย SSR

4.4 เปรียบเทียบเครื่องหมาย RAPD และ SSR ในการประเมินความ polymorphism ในทานตะวัน

ผลการเปรียบเทียบเครื่องหมาย RAPD และ SSR ในการประเมินความ polymorphism ในทานตะวันในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เครื่องหมายเอสเอสอาร์ตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมหรือให้ค่า PIC =0.64 ซึ่งสูงกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดีซึ่งมีค่า PIC= 0.4 นอกจากนี้พบว่า เครื่องหมายเอสเอสอาร์ยังแสดงให้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเฉลี่ย (genetic similarity) =0.31 ซึ่งสูงกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดีซึ่งมีค่า genetic similarity= 0.22 (ตารางที่ 4.6-4.7) ผลการศึกษาครั้งนี้คล้ายกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้เครื่องหมาย RAPD, SSR และ cytochrome P450 gene ในการวิเคราะห์ *Eleusine coracana* (finger millet) จำนวน 52 จีโนไทป์ และยังมีการประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกีวี (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) โดยใช้เครื่องหมาย SSR และ RAPD และพบว่าเฉพาะเครื่องหมาย SSR สามารถตรวจพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในต้นกีวีที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Palombi and Damiano, 2002) และ Cholastova et al. (2011) ยืนยันเช่นกันว่าเครื่องหมายเอสเอสอาร์มีประสิทธิภาพดีกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดี ดังนั้นเพื่อข้ามข้อจำกัดของการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี แถบดี

เอ็นเอบางแถบที่ตรวจพบและมีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะจีโนไทป์หรือกลุ่มพืช สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่เรียกว่า SCAR marker (Sequence characterized amplified region) ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าไพรเมอร์ S23, S29 และ OPF4 มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะและพบในจีโนไทป์ MOO ซึ่งแถบเหล่านี้สามารถนำมาออกแบบและพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR ได้

เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองแสดงความแตกต่างเล็กน้อยซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการจัดกลุ่มใหญ่โดยแบ่งทานตะวันทั้ง 24 สายพันธุ์ออกเป็นสองกลุ่มหลัก ซึ่งรูปแบบของกลุ่มย่อยต่างกันที่ subgroup IA และ IIA โดยเดนโดรแกรมที่จัดแบบ UPGMA ที่ได้จากการใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์ปรากฏสอดคล้องกับข้อมูลประวัติพันธุกรรมแหล่งที่มาในการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองแสดงผลสอดคล้องกันว่า สานพันทางการค้าและสายพันธุ์จากต่างประเทศแยกจากกลุ่มสายพันธุ์ที่พัฒนาโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีอย่างชัดเจน ซึ่งผลที่ได้นี้ยังมีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์แบบ PCoA (ภาพที่ 4.31) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ทานตะวันในครั้งนี้ จะให้ข้อมูลที่มีประโยชน์เพื่อช่วยนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีความเหมาะสมในการผสมพันธุ์และอาจนำไปพัฒนาต่อยอดในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบเครื่องหมาย RAPD และ SSR ในการประเมินความ polymorphism ในทานตะวัน

	RAPD	SSR
Number of primers used	14	16
Polymorphic bands	158	54
Average number of alleles per locus	11.29	4.50
Average number of polymorphic bands	11.29	4.50
PIC range	0.02 - 0.74	0.46 - 0.81
Average PIC	0.40	0.64
Similarity coefficient range	0.00 - 0.49	0.00 - 0.85
Average of similarity coefficient	0.22	0.31

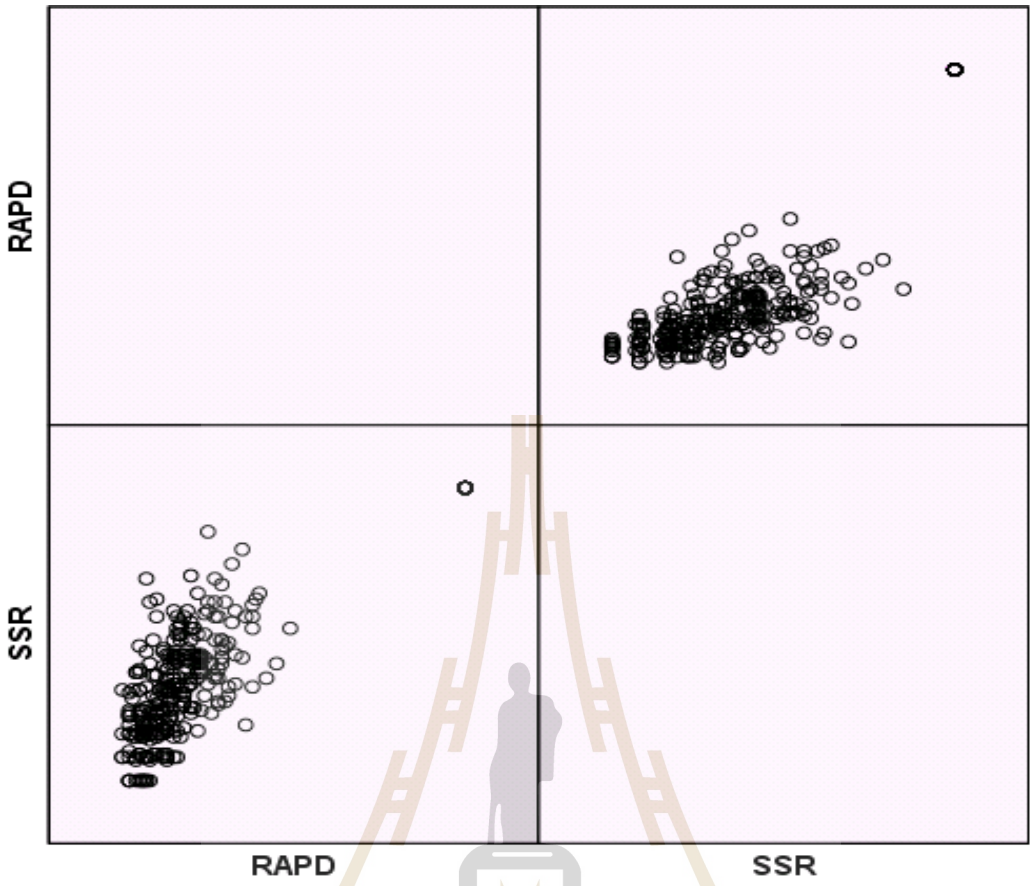
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.7 RAPD and SSR correlation using Pearson correlations.

	Correlations	RAPD	SSR
RAPD	Pearson Correlation	1	0.850**
	Sig. (2-tailed)		0.000
	Sum of Squares and Cross-products	18.374	15.593
	Covariance	0.061	0.052
	N	300	300
SSR	Pearson Correlation	0.850**	1
	Sig. (2-tailed)	0.000	
	Sum of Squares and Cross-products	15.593	18.317
	Covariance	0.052	0.061
	N	300	300

** Correlation is significant at the 0.01 level.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.32พล็อตการกระจายแสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง genetic similarity coefficients

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของทานตะวันจำนวน 24 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR based marker 2 ชนิด ได้แก่ RAPD และ SSR เลือกใช้ RAPD primer แบบสุ่มจำนวน 14 ชนิดและ SSR primer จำนวน 16 ชนิด พบว่าสามารถเกิดการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ DNA ได้ โดยให้แถบ DNA ที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) เมื่อศึกษาลายพิมพ์ DNA ที่เกิดขึ้นจากเครื่องหมายดีเอ็นเอสองชนิด พบว่า ทั้งเครื่องหมาย RAPD และ SSR สามารถนำมาใช้ในการระบุความแตกต่าง โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดมีจุดเด่น โดย RAPD นิยมนำมาใช้กว้างขวางในการศึกษาความหลากหลายเพราะมีราคาถูก และสามารถแยกแยะความแตกต่างทางพันธุกรรม ในขณะที่ SSR มีประโยชน์มากเพราะพบมาก กระจายทั่วทั้งจีโนม มีค่าโพลีมอร์ฟิกสูง มีลักษณะ co-dominant และง่ายต่อการวิเคราะห์ผล

ผลจากการศึกษานี้พบว่าค่า PIC ซึ่งแสดงความแตกต่างพันธุกรรม ที่ได้จากการ RAPD มีค่าต่ำกว่าค่า PIC ที่ได้จาก SSR แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR มีความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างพันธุกรรมสูงกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD การจัดกลุ่มโดยเดนโดรแกรมจากการใช้เครื่องหมายทั้งสองแสดงความแตกต่างเล็กน้อย แต่ไม่ได้ทำให้การจัดกลุ่มใหญ่ต่างกัน โดยเดนโดรแกรมที่ได้แบ่งทานตะวันทั้ง 24 จีโนไทป์ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ โดยการจัดกลุ่มจากเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองต่างกันที่ subgroup IA และ subgroup IIA โดยเดนโดรแกรมที่ได้จากเครื่องหมาย SSR จะสอดคล้องกับข้อมูลประวัติแหล่งที่มาของทานตะวัน ดังแสดงใน subgroup IIA โดย S471 ใกล้ชิด HOC โดยมีค่าความคล้ายกันสูงสุด 0.85 การจัดกลุ่มสามารถแยกพันธุ์ทางการค้าและพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศแยกออกจากพันธุ์แท้และพันธุ์สังเคราะห์ที่พัฒนาจาก SUT

เครื่องหมาย SSR มีความเหมาะสมในการระบุจีโนไทป์ ในขณะที่ เครื่องหมาย RAPD เหมาะสมในการจัดกลุ่มแสดงความเหมือน อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย RAPD ทำให้มีแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะจำเพาะกับพันธุ์ที่สามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับจีโนไทป์ เช่น พัฒนา sequence characterized amplified region (SCAR) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้จัดกลุ่ม germplasm ตามค่า heterosis ซึ่งสำคัญสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2550). **ข้อมูลพืชไร่: ทานตะวัน**. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.doae.go.th/plant/sun.htm.

กรมวิชาการเกษตร. (2550). พืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญ [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.doae.go.th/.

กิตติ สัจจาวัฒนา. (2548). การพัฒนาทานตะวันลูกผสมเดี่ยวที่ให้ผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 105 หน้า.

จุฑามาศ เพียซ้าย และไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2544). การพัฒนาพันธุ์สังเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.geocities.com/ubfcrc/15.doc.

จิราพร แซ่ต่าง. (2553). **การปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์และการประเมินสมรรถนะของลูกผสมในทานตะวัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีกาผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสรุนารี. 126 หน้า.

วิชัย บุญแสง และคณะ. 2541. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ : จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพ. 86 หน้า.

สุพจน์ แสงประทุม. (2543). **ทานตะวัน**. 22 หน้า. (จุลสาร).

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

สุรีพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **ว. วิชาการ ม.อบ**. 5(2): 37-58.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). สถิติส่งออก-นำเข้าสินค้าที่สำคัญของไทย [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/ import_result.php.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, กิตติ ศรีสะอาด และ กิตติ สัจจาวัฒนา. 2546. การวิจัยทานตะวันโดย มทส. การประชุมวิชาการ งา ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 3 วันที่ 11-12 ธันวาคม 2545. ณ. ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์ วรัญญูวัฒก์ และปิยะดา ทิพยผ่อง. (2547). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 9. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 381 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, ปิยะดา ทิพยผ่อง, กิตติ สัจจาวัฒนา, มนตรี แหนงใหม่, ชัยยะ แสงอุ่น, ยศศักดิ์ แก้มค้างพลู, ยุพยงค์ จันทร์ขำ, จุฑามาศ เพียซ้าย, ภาคภูมิ ศรีหมื่นไวย และฐิติพร มะชิโกวา. (2548).

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. รายงานการวิจัยโครงการพัฒนาการผลิตทานตะวัน ระยะที่ 2. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 46 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2550. โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน. การปรับปรุงทานตะวันลูกผสมที่ให้ผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ รายงานต่อ สกว.

ไพจิตร จันทรวงศ์. (2538). **เทคโนโลยีการสกัดน้ำมัน**. งานวิจัยพืชน้ำมัน. กองเกษตรเคมี. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

เสาวรี ตังสกุล, ศุภชัย แก้วมีชัย, สมยศ พิชิตพร, เพิ่มศักดิ์ สุภาพรเหมินทร์, สมศักดิ์ ศรีสมบุญ และเสน่ห์ เครือแก้ว. (2544). ความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เบอร์ 1. **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ งา ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 2 วันที่ 16-17 สิงหาคม 2544 ณ วังรี รีสอร์ท จังหวัดนครนายก**.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2550). **พื้นที่การเกษตรที่ใช้ในการเพาะปลูกทานตะวัน**. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.oae.go.th.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). **ปริมาณการนำเข้า-ส่งออกสินค้าเกษตร**. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.oae.go.th.

บริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์. (2556). ราคาสินค้าเกษตร-เมล็ดพันธุ์. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.pacthai.co.th.

ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์. (2543). **สถิติพื้นฐาน (ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 5)**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., and Sorrells, M. E. (1992). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**. 36: 181-186.

Berry, S., Leon, A., Hanfrey, C., Challis, P., Burkholz, A., Barnes, S., and Caligari, P. (1995). Molecular marker analysis of Helianthus annuus L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. Theoretical and Applied Genetics. 91(2): 195-199.

Bharathiraja, B., Jayamuthunagai, J., Haritharini, V., and Ramya, K. (2008). An approach to suggest the possibilities of interspecific hybridization using RAPD analysis of some commercial fruits and vegetables for improving the genetic characteristics. **Advanced Biotechnology**. 6: 18-21.

Cheres, M. T., and Knapp, S. J. (1998). Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: coancestry analysis of public germplasm. Crop science. 38(6): 1476-1482.

Cholastova, T., Soldanova, M., and Pokorny, R. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) marker efficacy for maize hybrid identification. African Journal of Biotechnology. 10(24): 4794-4801.

Darvishzadeh, R., Azizi, M., Hatami-Maleki, H., Bernousi, I., Abdollahi, B., Jafari, M., Sarrafi, A. 2010. Molecular characterization and similarity relationships among sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines using some mapped simple sequence repeats. African journal of biotechnology. 9(43): 7280-728.

Dolye, J.J., and Dolye, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12; 1-14

Dorrell, D. G., and Vick, B. A. (1997). **Properties and processing of oilseed sunflower**. In*:* Schneiter, A.A. (Eds), Sunflower technology and production American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. 709-744.

Encheva, J., Kohler, H., Christov, M., and Friedt, W. (2005). Intergeneric hybrids between cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) and *Verbesina helianthoides* (genus *Verbesina*) - RAPD analysis. **Helia**. 42: 37-44.

Gower, J. C. (1966): Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**. 53: 325-338.

Iqbal, M., Sadaqat, H., and Khan, I. (2008). Estimation of genetic diversity among sunflower genotypes through amplified polymorphic DNA analysis. **Genetics and Molecular Research**. 7(4): 1408-1413.

Isaacs, S. M., Manivannan, N., and Muralidharan, V. (2003). Genetic diversity analysis using RAPD marker in inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Helia**. 26(39): 59-66.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches surla distribution florale. **Bulletin de la Societe des Sciences Naturelles**. 44: 223-270.

Laosuwan, P. (1997). Sunflower production and result in Thailand. **Suranaree Journal of Science and Technology**. 4(3): 159-167.

National Sunflower Association. (2011). **Sunflower oil**. [Online]. Available: http://www.sunflowernsa.com/oil/what-is-high-oleic-sunflower-oil/. Accessed date: April, 2011.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Palombi, M., and Damiano, C. (2002). Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (Actinidia deliciosa A. Chev). Plant Cell Reports. 20(11): 1061-1066.

Paniego, N., Echaide, M., Munoz, M., Fernandez, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Crrera, M., Zandomeni, R., Syarez, E., Hopp, E. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (Helianthus annuus L.). Genome. 45: 34-43.

Panwar, P., Nath, M., Yadav, V. K., and Kumar, A. (2010). Comparative evaluation of genetic diversity using RAPD, SSR and cytochrome P450 gene based markers with respect to calcium content in finger millet (Eleusine coracana L. Gaertn.). Journal of Genetics. 89(2):121-132.

Popov, V., Urbanovich, O. Y., and Kirichenko, V. (2002). Studying genetic diversity in inbred sunflower lines by RAPD and isozyme analyses. **Russian Journal of Genetics**. 38(7): 785-790.

Rajput, S., Wable, K., Sharma, K., Kubde, P., and Mulay, S. (2006). Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato. **African Journal of Biotechnology**. 5(2): 108-112.

Ramanayake, S. M. S. D., Meemaduma, V. N., and Weerawardene, T. E. (2007). Genetic diversity and relationships between nine species of bamboo in Sri Lanka, using Random Amplified Polymorphic DNA. **Plant Systematics and Evolution**. 269: 55-61.

Sajawattana, K. and Laosuwan, L. (2002). Performance and synthetic varieties of sunflower. **Suranaree Journal Science and Technology**. 9: 278-282.

Sirithunya, P., Roumen, E., Mongkolsomrit, S. Sriprakhon, S., Hutamekalin, P. and Sreewongchai, T. 2001. Instruction manual work shop on molecular genetic analysis on diversity of blast pathogen in Thailand. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.

Solodenko, A., and Sivolap, Y. (2005). Genotyping of Helianthus based on microsatellite sequences. Helia. 42: 19-26.

Stefansson, B. R. (2007). **Oilseed crops**. [Online]. Available: http://www. thecanadianencyclopedia.com. Accessed date: July 18, 2009.

Tang, S., Knapp, S. 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in Native American land races and wild populations of cultivated sunflower. Theor. appl. genet. 106: 990-1003.

Tank, S., Yu, J.-K., Slabaugh, M.B.; Shintani, D.K. and Knapp, S.J. 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. TAG Theoretical and Applied Genetics, vol. 105, no. 8, p. 1124-1136.

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

United States Department of Agriculture. (2013). **Oilseeds: world markets and trade monthly circular**. [Online]. Available: http://www.fas.usda.gov /oilseeds/Current/default.asp. Accessed date: April 26, 2013.

Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers**. Nucleic Acids Research**. 18: 7213-7218.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. U. (1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 8 (22): 6531-6535.

Yu, J. Z., Fang, D. D., Kohel, R. J., Ulloa, M., Hinze, L. L., Percy, R. G., and Jones, D. C. (2012). Development of a core set of SSR markers for the characterization of *Gossypium* germplasm. **Euphytica**. 187: 203-213.

Yu, J., Mangor, J., Thompson, L., Edwards, K., Slabaugh, M., Knapp, S. 2002. Allelic diversity of imple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. Genome. 45: 652-660.

Zhang, L.S.; LE Clerc, V.; LI, S. and Zhang, D. (2005). Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment. Canadian Journal of Botany, January 2005, vol. 83, no. 1, p. 66-72

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ รศ.ดร.หนูเดือน เมืองแสน (Assoc. Prof. Dr. Nooduan Muangsan)

2. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์โทรสารและ E-mail

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224249, โทรสาร 044 – 224633, E-mail : nooduan@sut.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

2546 Ph.D. (Plant Molecular Biology), North Carolina State University, USA

2539 วท.บ. (ชีววิทยา เกียรตินิยม อันดับ 1) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. ผลงานวิชาการ 5 ปีย้อนหลัง

1. Pimchun, O. and **Muangsan, N**. 2011. In Vitro Regeneration of Purple Glutinous Rice (*Oryza sativa* L.). KKU Sci J. 39(4): 621-630 **[In Thai]**
2. Krudnak, A., Muangsan, N. and Machikowa, T. 2013. High frequency callus induction through anther culture in high oil sunflower (*Helianthus annuus* L.). KKU Res J. 18(1):64-72 [In Thai]
3. Saensee K., Machikowa T. and Muangsan N. 2012. Comparative performance of sunflower synthetic varieties under drought stress. International Journal of Agriculture and Biology, vol. 14, pp. 929-.934.
4. Jantasee A., Thumanu K., Muangsan N., Leeanansaksiri W. et al. 2013. Fourier transform infrared spectroscopy for antioxidant capacity determination in colored glutinous rice. Food Analytical Methods, pp. 1-10

ผู้ร่วมวิจัย

1. **ผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา** (Asst. Prof. Dr. Thitiporn Machikowa)

2. สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-224579 โทรสาร 044-224281 อีเมล์ machiko@sut.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วท.บ. (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พ.ศ. 2541

วท.ด. (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พ.ศ. 2547

4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Genetics, Plant Breeding

5. ผลงานวิชาการ 5 ปีย้อนหลัง

Funpeng, K. and **Machikowa, T.** (2010). Correlation and path coefficient analysis on agronomic characters in sunflower. *In* The 11 Agricultural Conference 2010. Khon Kaen University, Thailand, Jan. 25-26, 2010.

Huang, Z., Laosuwan, P., **Machikowa, T.,** and Chen, Z. (2010). Heterosis for seed yield, oil content and other characters in rapeseed *(Brassica napus* L.). Journal of Northeast Agricultural University. 17(1).

Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Thongpae, T., Petkhum, C., Seehalak, W., and **Machikowa, T**. (2010). Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. Afr. J. Biotechnol. 9(27): 4,452-4,464.Huang, Z., Laosuwan, P., **Machikowa, T.** and Chen, Z. (2010). Combining ability for seed yield and other characters in rapeseed. Suranaree J. Sci. Technol. 17(1):39-48.

Saetang, C. and **Machikowa, T.** (2011). Heterosis and inbreeding depression in sunflower. Journal of Agricultural Science.

Machikowa, T. and Saetang, C. (2011). General and specific combining ability for quantitative characters in sunflower. Journal of Agricultural Science and Technology.

ผู้ร่วมวิจัย

1.นางสาวปัญจมา จรรยาเลิศอดุลย์ (Miss. Panjama Janyalert-a-dool)

2.สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224249, โทรสาร 044 – 224633

3.การศึกษา Sirindhorn School in 2003, Bachelor degree in Environmental Science from Khon Kaen University, Khon Kaen in 2007.